

# DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM TUNÍDEOS

**Neide Natacha Frango de Gouveia**

Licenciada em Biologia pela Universidade de Aveiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica Aplicada

Orientação: Prof. Doutor José Sousa Câmara

Funchal, Dezembro de 2009



Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Química da Madeira (CQM) do Departamento de Química da Universidade da Madeira, utilizando o equipamento de LC-MS/MS da Rede Nacional de Espectrometria de Massa (RNEM), e na Direcção de Serviços de Investigação das Pescas (DSIP) da Direcção Regional de Pescas (DRP).

A elaboração desta dissertação teve o apoio do Centro de Ciência e Tecnologia da Madeira (CITMA) através da Bolsa de Mestrado e da Direcção Regional de Pescas (DRP).

## RESUMO

A presença de aminas biogénicas em alimentos é um ponto crítico da segurança alimentar dada a sua implicação em fenómenos de intoxicações alimentares. Com a realização deste trabalho pretendeu-se contribuir para um melhor esclarecimento desta temática, actuando-se a dois níveis: numa primeira fase procedeu-se ao desenvolvimento e validação de uma nova metodologia analítica para a determinação simultânea de quatro aminas biogénicas (histamina, cadaverina, tiramina e triptamina) presentes no pescado; numa segunda fase procedeu-se à quantificação dos teores das aminas biogénicas em amostras de tunídeos.

O desenvolvimento da metodologia quantitativa baseou-se na utilização da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS), tendo a preparação dos extractos para análise envolvido a extracção das aminas biogénicas do músculo de tunídeos com ácido clorídrico e a purificação dos extractos obtidos por SPE.

Como qualquer outro método cromatográfico, a metodologia de LC-MS/MS desenvolvida exigiu a optimização de vários parâmetros como: a concentração do padrão interno, a metodologia de extracção em fase sólida (SPE), composição e fluxo da fase móvel, volume de injeção, determinação dos tempos de retenção, condições de ionização e condições de fragmentação. A validação metodologia foi realizada através da avaliação de alguns parâmetros analíticos, tal como o ajuste do modelo de calibração, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), limite de quantificação, limite de detecção e percentagem de recuperação.

De modo a potenciar a sensibilidade e selectividade permitida pelo equipamento analítico e com o objectivo de efectuar a quantificação dos compostos em análise, a aquisição de dados foi realizada em modo MRM. Uma vez que se utilizou um padrão interno (heptilamina), a proporcionalidade da intensidade do sinal das aminas biogénicas em relação a uma determinada concentração foi dada em termos de áreas relativas, que corresponde à razão da intensidade do sinal da amina biogénica/intensidade do sinal do padrão interno (analito/P.I.).

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à determinação dos teores de aminas biogénicas nas amostras de músculo de tunídeos recolhidas, com uma regularidade semanal, em diferentes estabelecimentos comerciais no decorrer da época intensiva da sua captura (de Abril a Setembro de 2009). Os teores de aminas biogénicas encontrados, entre 2,63 mg/kg (triptamina) e 132,78 mg/kg (tiramina), não ultrapassaram os limites impostos pela Comunidade Europeia para os teores de histamina e para os teores de aminas totais; sendo que, em cerca de 87% das 59 amostras analisadas não foram encontrados teores quantificáveis para as quatro aminas biogénicas.

## ABREVIATURAS

<b>APCI</b>	Ionização química à pressão atmosférica
<b>API</b>	Ionização à pressão atmosférica
<b>CI</b>	Ionização química
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>DAO</b>	Enzima diamino oxidase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CE</b>	Electrofórese capilar
<b>EI</b>	Ionização electrónica
<b>EIC</b>	Cromatograma iónico extraído
<b>ESI</b>	Ionização por <i>electrospray</i>
<b>FAB</b>	Ionização por bombardeamento com átomos rápidos
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GC</b>	Cromatografia de fase gasosa
<b>HMT</b>	Enzima histamina-N-metil transferase
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E (anticorpo)
<b>Intens.</b>	Intensidade
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em <i>tandem</i>
<b><i>m</i></b>	Massa molecular do ião
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M</b>	Molar
<b><i>m/z</i></b>	Razão massa-carga de um ião
<b>MALDI</b>	Ionização por desadsorção laser, assistida por matriz
<b>MAO</b>	Enzima monoamino oxidase
<b>mg</b>	Miligramas
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MRM</b>	<i>Multiple reaction monitoring</i>
<b>MS<sub>q</sub></b>	Referente a analisadores do tipo quadrupolo simples

<b>MS/MS</b>	Referente a analisadores do tipo triplo quadrupolo
<b>MS<sup>n</sup></b>	Referente a analisadores do tipo de armadilhas de iões
<b>L</b>	Litros
<b>OPA</b>	<i>o</i> -ftaldeído
<b>P. I.</b>	Padrão interno
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>RAM</b>	Região Autónoma da Madeira
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlação
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>s</b>	Segundos
<b>S/N</b>	Razão sinal-ruído
<b>SPE</b>	Extracção em fase sólida
<b>SRM</b>	<i>Selected reaction monitoring</i>
<b>TIC</b>	Cromatograma iónico total
<b>TLC</b>	Cromatografia em camada fina
<b>TOF</b>	Referente a analisadores de tempo de voo
<b>UPLC</b>	Cromatografia líquida de ultra eficiência
<b>z</b>	Número de cargas do ião
<b>μL</b>	Microlitros

# ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	3
ABREVIATURAS .....	4
ÍNDICE GERAL.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	10
INTRODUÇÃO .....	11
1. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS .....	12
2. AMINAS BIOGÉNICAS.....	13
2.1 Microrganismos produtores.....	15
2.2 Factores que influenciam a ocorrência destes compostos.....	16
2.3 Funções fisiológicas .....	18
2.4 Toxicologia .....	21
2.5 Intoxicação histamínica.....	24
2.6 Aminas Biogénicas no pescado.....	27
3. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS.....	31
3.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS).....	35
3.1.1 Fontes de Ionização.....	36
3.1.2 Analisadores de Massa .....	38
3.2 Validação de métodos LC-MS/MS.....	41
COMPONENTE EXPERIMENTAL .....	43
4. METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	44
4.1 Amostragem.....	44
4.2 Reagentes e Solventes .....	45
4.3 Método analítico para determinação de aminas biogénicas em tunídeos.....	47
4.3.1 Preparação das soluções mãe dos padrões das aminas .....	47
4.3.2 Preparação das amostras .....	47
4.3.2.1 <i>Extracção das aminas biogénicas da matriz biológica</i> .....	47
4.3.2.2 <i>Isolamento dos analitos por SPE</i> .....	48
4.3.3 Análise por LC-MS .....	48
4.3.3.1 <i>Equipamentos</i> .....	48
4.3.3.2 <i>Calibração das massas</i> .....	49

4.3.3.3 <i>Lavagem do sistema LC</i> .....	49
4.3.3.5 <i>Acondicionamento da coluna</i> .....	50
<b>4.3.4 Parâmetros de validação</b> .....	50
4.3.4.1 <i>Curva de calibração e gama de concentrações</i> .....	50
4.3.4.2 <i>Limite de quantificação e de detecção</i> .....	52
4.3.4.3 <i>Precisão</i> .....	52
4.3.4.4 <i>Recuperação</i> .....	53
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>5. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA LC-MS/MS</b> .....	55
<b>5.1 Optimização dos parâmetros de LC-MS/MS</b> .....	55
<b>5.1.1 Importância e selecção do padrão interno</b> .....	55
<b>5.1.2 Tratamento da amostra</b> .....	58
5.1.2.1 <i>Purificação das amostras utilizando a metodologia SPE</i> .....	58
<b>5.1.3 Componente LC</b> .....	59
5.1.3.1 <i>Fase móvel</i> .....	59
5.1.3.2 <i>Volume de injeção</i> .....	63
5.1.3.3 <i>Tempo de retenção</i> .....	64
<b>5.1.4 Componente MS</b> .....	64
5.1.4.1 <i>Condições de ionização</i> .....	64
5.1.4.2 <i>Condições de fragmentação</i> .....	66
5.1.4.3 <i>Quantificação em modo MRM</i> .....	66
<b>6. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA LC-MS/MS</b> .....	67
<b>6.1 Curvas de calibração</b> .....	67
<b>6.2 Limites de quantificação e de detecção</b> .....	70
<b>6.3 Precisão</b> .....	70
<b>6.4 Percentagem de recuperação</b> .....	71
<b>7. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM AMOSTRAS DE TUNÍDEOS</b> .....	73
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	77
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Vias metabólicas de inactivação da histamina (Fernandes, 2001).....	22
<b>Figura 2</b> – Classificação das reacções de intolerância humana a alimentos, segundo o Subcomité de Reacções Adversas a Alimentos da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (Fernandes, 2001; Ortolani <i>et</i> Pastorello, 2006).....	25
<b>Figura 3</b> - Pescado relacionado com a intoxicação histamínica ( <a href="http://foodsafety.suencs.com">http://foodsafety.suencs.com</a> ).....	27
<b>Figura 4</b> – Componentes do espectrómetro de massa (Siuzdak, 2004).....	36
<b>Figura 5</b> – Protonação das aminas ( <a href="http://www.answers.com/topic/ammonium">www.answers.com/topic/ammonium</a> ).....	36
<b>Figura 6</b> – Formações de iões por ionização através da fonte ESI. À direita, imagem de uma fonte ESI (Siuzdak, 2004).....	37
<b>Figura 7</b> – Tipos de espectrómetros de massa normalmente utilizados nos sistemas LC-MS: Quadrupolo simples ( <i>Single Quadrupole</i> ), Analisadores de Tempo de Voo (TOF) ( <i>Reflectron time-of-flight</i> ), Triplo Quadrupolo (MS/MS) ( <i>Triple quadrupole</i> ) e Armadilha de Iões (MS <sup>n</sup> ) ( <i>Ion-Trap</i> ) (Korfmacher, 2005). ....	39
<b>Figura 8</b> – Modo de operar SRM do espectrómetro de massa em <i>tandem</i> (MS/MS). Selecção do ião precursor no Q1 e a selecção de um ião filho específico no Q3. À direita, o cromatograma do pico resultante da detecção da transição do ião precursor para o ião filho (Politi <i>et al.</i> , 2006). ....	40
<b>Figura 9</b> – Metodologia SPE utilizada para a purificação da amostra; 1º activação do cartucho, 2º eluição da amostra, 3º eliminação das interferências e 4º eluição dos analitos.....	48
<b>Figura 10</b> – Estrutura da heptilamina. ....	56
<b>Figura 11</b> – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) dos padrões das aminas em estudo, em modo varrimento, utilizando o programa de eluição descrito na tabela 13. O volume da injeção foi de 5 µL.....	57
<b>Figura 12</b> – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) dos padrões das aminas biogénicas, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma mistura de 70% de acetoneitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL. ....	57
<b>Figura 13</b> – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) obtidos pela análise, em modo MRM, do extracto de SPE dos padrões das aminas biogénicas (hipótese 6 da tabela 12), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% de acetoneitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL. ....	59
<b>Figura 14</b> – Cromatograma iónico total (TIC) e cromatogramas iónicos extraídos (EIC) dos padrões das aminas biogénicas, em modo MRM, utilizando o programa de eluição descrito na tabela 13, usando o tampão formato com pH 3.....	60
<b>Figura 15</b> – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) dos padrões de aminas biogénicas, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma solução de 70% de acetoneitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL. ....	62
<b>Figura 16</b> – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) obtidos dos padrões das aminas biogénicas, em modo varrimento, utilizando o programa de eluição descrito na tabela 13 e um volume da injeção de 5 µL. ....	64

<b>Figura 17</b> – Regressão não linear da triptamina, da tiramina, histamina e cadaverina.....	<b>68</b>
<b>Figura 18</b> – Gráfico dos resíduos da triptamina, da tiramina, histamina e cadaverina. ....	<b>69</b>
<b>Figura 19</b> – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) obtidos da amostra recolhida a 17 de Abril no supermercado B, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma mistura de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL. ....	<b>75</b>
<b>Figura 20</b> – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) obtidos da amostra recolhida a 1 de Maio no supermercado H, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma mistura de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL. ....	<b>75</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Aminoácidos precursores e aminas biogénicas formadas nos alimentos (Flick <i>et Granata</i> , 2005; Anderson, 2008; Radosevich, 2007). .....	14
<b>Tabela 2</b> – Efeitos farmacológicos e sintomas causados pela ingestão de alimentos com teores elevados de aminas biogénicas (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Önal, 2007).....	19
<b>Tabela 3</b> - Concentrações médias de histamina encontradas por diferentes autores no pescado.	29
<b>Tabela 4</b> – Principais métodos publicados para a determinação de aminas biogénicas em matrizes alimentares sólidas (Önal, 2007).....	33
<b>Tabela 5</b> – Principais fontes de ionização (Siuzdak, 2004; Sangsrichan, 2005).....	37
<b>Tabela 6</b> – Descrição resumida dos tipos de analisadores de massa (Sangsrichan, 2005; Politi <i>et al.</i> , 2006; Branco, 2007).....	39
<b>Tabela 7</b> – Breve descrição dos parâmetros de validação de métodos bioanalíticos (Peters, 2006; Chandran <i>et Singh</i> , 2007).....	42
<b>Tabela 8</b> - Resumo do número de amostras de músculo de tunídeos colhidas por data de recolha e por superfície comercial. ....	44
<b>Tabela 9</b> – Caracterização dos padrões das aminas biogénicas e do padrão interno utilizados para o desenvolvimento e validação do método. ....	45
<b>Tabela 10</b> – Solventes, padrões e reagentes utilizados para o desenvolvimento e validação do método.....	46
<b>Tabela 11</b> – Concentrações (mg/L), dos padrões de aminas biogénicas utilizadas para elaborar a curva de calibração (P.I. – padrão interno). ....	51
<b>Tabela 12</b> – Hipóteses de eluição para os cartuchos Sep-Pak® tC <sub>18</sub> (Waters) testadas para a optimização do procedimento SPE.....	58
<b>Tabela 13</b> – 1º Programa de eluição testado, descrito por Gianotti <i>et al.</i> (2008).....	60
<b>Tabela 14</b> – 2º Programa de eluição testado.....	61
<b>Tabela 15</b> – Coeficientes de variação (CV) e razões sinais/ruído (S/N) para diferentes volumes de injeção de cada amina biogénica. ....	63
<b>Tabela 16</b> - Condições de ionização optimizadas para a fonte ESI, a operar em modo positivo.	65
<b>Tabela 17</b> – Programa de aquisição de dados em modo MRM utilizado para a quantificação das aminas em estudo, assim como as condições fragmentação para cada intervalo. ....	66
<b>Tabela 18</b> – Curvas de calibração da triptamina, da tiramina, da histamina e da cadaverina.....	67
<b>Tabela 19</b> – Limites de quantificação e detecção para a triptamina, a tiramina, a histamina e a cadaverina.....	70
<b>Tabela 20</b> – Repetibilidade para três soluções utilizadas nas curvas de calibração das quatro aminas biogénicas (tabela 11, secção 4.3.3.1).....	71
<b>Tabela 21</b> – Precisão intermédia para a solução 9 (tabela 11, secção 4.3.3.1).....	71
<b>Tabela 22</b> – Percentagem de recuperação para as quatro aminas biogénicas deste trabalho. ....	71
<b>Tabela 23</b> – Resultados obtidos (média ± desvio padrão) para a determinação de histamina, cadaverina, tiramina e triptamina em amostras de músculo de tunídeos, recolhidos em vários supermercados da zona do Funchal.....	73



## 1. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

A presença de constituintes minoritários não nutritivos nos alimentos com acção fisiológica relevante, na maior parte das vezes prejudiciais para o consumidor, constitui um dos desafios mais interessantes em matéria de investigação alimentar. Com o intuito de reduzir os riscos para a saúde dos consumidores, o controlo desses compostos nas matrizes alimentares tem movido a comunidade científica no sentido de desenvolver técnicas analíticas cada vez mais poderosas que permitam a sua identificação e/ou quantificação de forma inequívoca, de modo a possibilitar a correcta avaliação dos factores de risco correlacionados com a ingestão do produto.

As aminas biogénicas fazem parte desse grupo de compostos que apesar da sua relevância a nível fisiológico são susceptíveis de provocar intoxicações alimentares, quando presentes em quantidades elevadas em determinados alimentos, como é o caso do pescado, do queijo e do vinho. Aos efeitos prejudiciais que podem desencadear na saúde dos consumidores somam-se também outros efeitos contraproducentes que afectam as características organolépticas dos alimentos.

A estes aspectos temos ainda a acrescentar, o facto da ocorrência de surtos de intoxicações alimentares afectarem o consumo do pescado, trazendo um impacto negativo para o mercado dos produtos de pesca, assim como para a sua exportação. No entanto, estes acontecimentos têm vindo a diminuir devido essencialmente à melhoria generalizada das condições de pesca, bem como à implementação de programas de controlo de qualidade dos produtos de pesca desde a sua origem (captura) até ao consumidor final.

Não existindo até à data nenhum controlo local e sendo a Região Autónoma da Madeira (RAM) uma região sensível a questões relacionadas com a saúde pública, revelou-se de especial interesse desenvolver uma metodologia analítica que permitisse efectuar a monitorização dos níveis de aminas biogénicas em tunídeos (atuns e afins), uma vez que, devido às suas características intrínsecas, é um grupo de pescado susceptível a elevados níveis de aminas biogénicas. Este grupo tem grande interesse pesqueiro, contabilizando cerca de 31% (média de 10 anos, dados fornecidos pela Direcção Regional de Pescas) das descargas totais anuais do pescado capturado na RAM, tendo assim um papel relevante na dieta da população madeirense.

Neste sentido, este trabalho surgiu como meio de servir os interesses da RAM e teve como principal objectivo desenvolver e validar uma metodologia analítica de rotina para a determinação de aminas biogénicas nos tunídeos, susceptível de ser aplicada localmente, assim como promover a sua aplicação prática na análise de amostras de tunídeos recolhidas regularmente, utilizando como instrumento de análise o sistema LC-MS/MS.

## 2. AMINAS BIOGÉNICAS

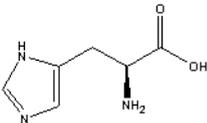
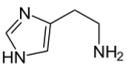
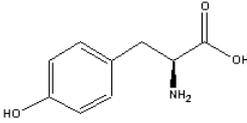
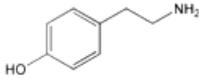
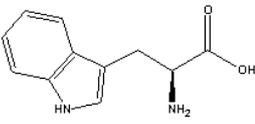
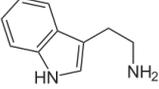
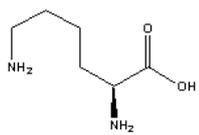
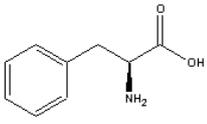
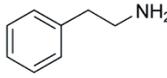
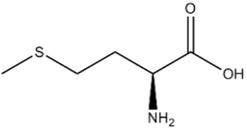
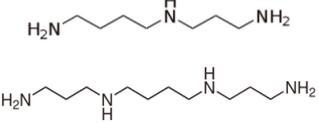
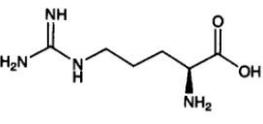
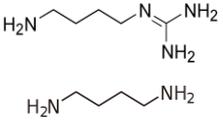
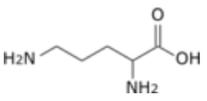
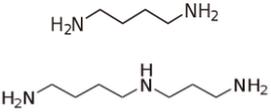
As aminas são compostos básicos azotados, onde um, dois ou três átomos de hidrogénio da amónia foram substituídos por grupos alquilo e arilo, cuja formação resulta essencialmente da descarboxilação enzimática dos aminoácidos livres e da transaminação dos aldeídos e cetonas (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Kim *et al.*, 2009). Estes compostos são bases orgânicas com baixo peso molecular que ocorrem naturalmente em microrganismos, plantas e animais, como consequência do seu metabolismo (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Fernandes, 2001; Saaïd *et al.*, 2009). As aminas são designadas por aminas biogénicas devido à sua origem biológica e classificadas do ponto de vista estrutural como: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina) (Santos, 1996; Önal, 2007, Saaïd *et al.*, 2009).

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. No entanto a produção endógena de aminas é insignificante quando comparada com a via exógena (Santos, 1996; Flick *et Granata*, 2005).

Embora alguns alimentos sejam naturalmente ricos em aminoácidos livres, o seu teor aumenta *post mortem*, devido à elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes no tracto intestinal, combinada com o rápido processo autolítico (Flick *et Granata*, 2005; Saaïd *et al.*, 2009). Normalmente, as aminas biogénicas estão ausentes ou encontram-se em concentrações mínimas (< 10 ppm) em alimentos frescos; contudo em alimentos como pescado, produtos de pesca, queijos, carnes, ovos e alimentos fermentados (Shalaby, 1996; Flick *et Granata*, 2005; Brinker *et al.*, 2002), podem estar presentes em concentrações significativas (> 50 ppm), capazes de induzir uma intoxicação química, também conhecida historicamente por envenenamento scombrídeo, devido à sua associação com a ingestão de pescado (principalmente tunídeos e sardas).

A tabela 1 descreve as principais aminas biogénicas envolvidas nestes processos, assim como os respectivos aminoácidos precursores.

**Tabela 1** - Aminoácidos precursores e aminas biogénicas formadas nos alimentos (Flick *et Granata*, 2005; Anderson, 2008; Radosevich, 2007).

Aminoácidos precursores		Aminas biogénicas	
	Histidina	Histamina	
	Tirosina	Tiramina	
	Triptofano	Triptamina	
	Lisina	Cadaverina	
	Fenilalanina	Feniletilamina	
	Metionina	Espermidina/ Espermina	
	Arginina	Agmatina/ Putrescina	
	Ornitina	Putrescina/ Espermidina	

## 2.1 Microrganismos produtores

Tal como diversos estudos de inoculação, em meios de cultura ou em pescado, já o demonstraram, existe uma grande diversidade de microrganismos capazes de produzir histamina e outras aminas biogénicas, tais como *Enterobacteriaceae* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Morganella* spp., *Proteus morganii*, *Proteus* spp., *Hafnia alvei* e *Klebsiella* spp. (Shalaby, 1996; Flick *et Granata*, 2005).

Os produtores mais proeminentes de histamina são a *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei*, desempenhando um papel relevante no controlo microbiológico dos produtos de pesca (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Huss, 1997; Dadáková *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Estas bactérias podem ser encontradas na maior parte das espécies de peixes, provavelmente, como resultado de uma contaminação após captura devido ao seu manuseamento inadequado (Jeysekaran *et Shakila*, 2003). A temperatura óptima para o seu desenvolvimento é a 10°C, no entanto a 5°C a sua proliferação é retardada e a temperaturas inferiores a 5°C não produzem descarboxilase (Huss, 1997). Estes estudos são unânimes em afirmar que o potencial de produzir aminas biogénicas a níveis tóxicos é directamente proporcional ao aumento da temperatura (Flick *et Granata*, 2005). Nos tunídeos as *Enterobacteriaceae* spp. são as principais responsáveis pela sua degradação e formação de histamina (Dadáková *et al.*, 2009).

Estudos realizados por outros autores (Morii *et al.*, 1986; Santos, 1996) evidenciaram o papel da *Photobacterium phosphoreum* na produção de histamina a baixas temperaturas em tunídeos, sendo igualmente o *Staphylococcus* spp., o *Vibrio* spp. e a *Pseudomonas* spp. identificadas como bactérias produtoras de histamina em pescado fermentado.

Nos alimentos obtidos por processos fermentativos, como os vinhos e os queijos, a presença de aminas biogénicas pode ter origem na própria matéria-prima, resultado da actividade dos próprios microrganismos envolvidos no processo ou, alternativamente, ter origem na actividade de microrganismos oportunistas capazes de se desenvolver nas condições que o processo de maturação ocorre (Fernandes, 2001).

Kordiovská *et al.* (2006), ao realizarem estudos sobre a variação de aminas biogénicas e microrganismos produtores, ao longo do tempo e da temperatura de conservação, verificaram a existência de uma relação directa entre a cadaverina e a putrescina com a quantidade de microrganismos presentes, o que as torna indicadores por excelência da qualidade do pescado.

De forma geral, a quantidade de bactérias presente no pescado armazenado depende da contaminação inicial da matéria-prima, assim como da temperatura e período de armazenamento (Kordiovská *et al.*, 2006).

## 2.2 Factores que influenciam a ocorrência destes compostos

Uma vez que a formação de amins biogénicas é essencialmente devida à actividade enzimática da descarboxilase microbiana, a inibição dessa actividade e a prevenção do crescimento bacteriano desempenham um papel determinante no controlo das amins nos alimentos (Santos, 1996). As amins biogénicas são muito resistentes ao calor pelo que, mesmo que o pescado seja cozinhado, enlatado ou sofra tratamento térmico, antes de ser consumido, estas não são significativamente destruídas pelo tratamento térmico (Shalaby, 1996; Nahla *et Farag*, 2005; Saaid *et al.*, 2009).

A quantidade de descarboxilase libertada pela célula bacteriana é afectada pelo tipo de microflora em questão, pelo seu crescimento e pela própria composição do alimento. Por sua vez, a actividade da aminoácido descarboxilase depende de uma gama de factores que incluem a disponibilidade de açúcares fermentáveis, o pH e o potencial redox (Flick *et Granata*, 2005). Consequentemente, a quantidade de amins biogénicas formadas está correlacionada com o número de microrganismos descarboxilase positivos presentes no produto, a disponibilidade de aminoácidos livres, a actividade das enzimas descarboxilase e a temperatura (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Brinker *et al.*, 2002).

O factor predominante na produção de amins biogénicas, após a compra do pescado, é a duração e a temperatura do armazenamento. A formação de aminoácidos livres *post mortem* e a sua rápida descarboxilação dependem da temperatura; sendo desta forma evidente que longos períodos de armazenamento a temperaturas altas induzem não só a produção de amins biogénicas, como também a produção de amónia e outros compostos resultantes da degradação do pescado (Lehane *et Olley*, 2000; Flick *et Granata*, 2005).

A enzima envolvida na produção de histamina, a histidina descarboxilase, requer temperaturas acima dos 15°C, com uma temperatura óptima de actuação de 30°C. Nos ambientes tropicais, onde o pescado é capturado em águas com temperatura que excedem em muito os 20°C, as condições tornam-se favoráveis à produção de amins biogénicas pelas bactérias descarboxilase positivas, havendo assim uma necessidade evidente de, no mínimo, manter o pescado refrigerado após a sua captura. Embora o crescimento bacteriano seja inibido a temperaturas entre 0 e 5°C, a actividade enzimática não cessa, continuando assim a formação de amins (Brinker *et al.*, 2002).

A manutenção do pescado a temperaturas baixas durante todo o processo de armazenamento constitui a medida mais eficiente para o controlo da produção de amins biogénicas. Todos os estudos realizados parecem concordar que o armazenamento a 0°C ou a temperaturas inferiores, limita a níveis pouco significativos a formação de histamina (Huss, 1997).

Estudos desenvolvidos, por Ababouch *et al.* (1991), com sardinhas frescas (*Sardina pilchardus*) comprovam que a formação de histamina, cadaverina e putrescina ao fim de oito dias de armazenamento em gelo, é equivalente à quantidade formada em apenas 24 horas à temperatura ambiente (2350 mg/kg, 1050mg/kg e 300 mg/kg, respectivamente). Outros trabalhos, desenvolvidos por Klausen *et Huss* (1987), não verificaram formação de histamina em cavala conservada em gelo, mas por outro lado observaram um significativo aumento quando conservada a 10°C. Curiosamente, após armazenamento a 10°C durante dois dias não foi detectada formação de histamina, enquanto, o consequente armazenamento a 0°C durante oito dias levou à formação de 20mg/100g de histamina. Este estudo indica que enquanto a maioria das bactérias produtoras de histamina não cresce a 0°C, a descarboxilase formada durante o armazenamento a 10°C pode permanecer activa a 0°C (Flick *et Granata*, 2005).

O aumento de aminas biogénicas com o congelamento é mínimo para a maioria dos casos. Ensaios experimentais demonstraram que quando o pescado é descongelado, o aumento de aminas biogénicas é menor que quando comparado com o pescado fresco mantido sob condições de temperatura idênticas, durante o mesmo período. Este facto poderá ser explicado pela redução da microflora durante o processo de congelamento resultante dos danos ocorridos no seu DNA (Flick *et Granata*, 2005).

O impacto da evisceração na produção de aminas biogénicas não se encontra bem definido, existindo muitas vezes informação contraditória na literatura, uma vez que é fortemente dependente de factores externos como o método de colheita, procedimento de transporte, confecção ou armazenamento (Flick *et Granata*, 2005). Contudo, alguns trabalhos realizados nesta área demonstraram que os teores de histamina no pescado eviscerado era dez vezes superior que no pescado conservado com vísceras à temperatura ambiente durante 140 horas (Lehane *et Olley*, 2000).

Outro factor importante para a produção de aminas é o pH. Existem trabalhos que encontraram níveis elevados de tiramina nas sardas a pHs baixos, sendo a actividade da descarboxilase favorecida em ambientes ácidos, com um pH óptimo entre 4,0 e 5,5 (Santos, 1996).

Por outro lado, a predominância de aminas biogénicas em produtos de pesca defumados e salgados é devida à existência de um grupo de bactérias que, para além de ter habilidade de produzir aminoácido descarboxilase, consegue sobreviver em condições de humidade baixa, elevadas concentrações de sal e baixos níveis de actividade da água (Jeyasekaran *et Shakila*, 2003). Embora a elevação da concentração de sal até 2% se tenha mostrado ineficiente no controlo do crescimento de *Morganella morganii* e *Klebsiella pneumonia*, concentrações elevadas de sal, entre 3,5% e 5,5%, podem inibir a produção de histamina em algumas bactérias (Flick *et Granata*, 2005), na

medida em que o sal tem um efeito inibidor da histidina descarboxilase. No caso do *Streptococcus cremoris* a síntese de histamina, tiramina e triptamina é suprimida consideravelmente pela adição de 0,5% de sal, em meio básico; no entanto, foram encontradas bactérias halotolerantes produtoras de aminas biogénicas no músculo da sardinha conservado com 12% de sal (Santos, 1996).

A presença de oxigénio parece ter um efeito significativo na biosíntese de aminas biogénicas. Em condições anaeróbicas, o *Enterobacter cloacae* reduz a quantidade de putrescina produzida para metade e a *Klebsiella pneumoniae* reduz significativamente a síntese de cadaverina, mas adquire a habilidade de sintetizar putrescina. Por outro lado, foi reportado que a redução do potencial redox do meio estimula a produção de histamina, visto que a histidina descarboxilase parece ser inactivada ou destruída pela presença de oxigénio (Santos, 1996).

De forma resumida os factores que afectam a provável formação de aminas biogénicas no pescado são: contaminação pós-captura, temperaturas de conservação elevadas nas embarcações de pesca, procedimentos de refrigeração inadequados, procedimentos de congelamento e descongelamento inadequados, temperaturas abusivas durante a secagem ou defumação dos produtos, processos de conserva impróprios, baixa qualidade dos produtos fermentados e temperaturas abusivas durante a venda ao público (Lehane *et al.*, 2000).

Para prevenir a formação de aminas biogénicas é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos que influenciam a sua produção. Normalmente, as aminas biogénicas nos alimentos podem ser controladas por uma boa higiene nas áreas de manuseamento e processamento das matérias-primas (Santos, 1996), assim como uma rápida imersão do pescado em água arrefecida a -1°C, seguido de um congelamento ininterrupto (Nahla *et al.*, 2005).

### 2.3 Funções fisiológicas

As aminas biogénicas são componentes endógenos e indispensáveis às células vivas, fundamentais para a proliferação e diferenciação celular, regulação das funções do núcleo, síntese de proteínas, desenvolvimento cerebral, regulação e crescimento do sistema nervoso (Santos, 1996; Saaid *et al.*, 2009). Nas plantas, estão ainda associadas com as respostas ao pH, ao stress osmótico e térmico, à divisão celular, à floração e aos compostos alelopáticos (Saaid *et al.*, 2009). São também constituintes aromáticos relevantes dos alimentos e são precursores de compostos carcinogénicos N-nitrosados (Santos, 1996). A tabela 2 resume os efeitos farmacológicos e sintomas causados pela ingestão de alimentos com teores elevados de aminas biogénicas.

Dentro das aminas, as poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são compostos indispensáveis ao metabolismo celular, sendo solicitadas em grandes quantidades pelos tecidos em crescimento acelerado, uma vez que estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e proteínas. A demanda destas aminas diminui em casos patológicos, como por exemplo existência de tumores

(Önal, 2007). Apesar de todas as células terem a capacidade de sintetizar poliaminas, os alimentos continuam a ser uma importante fonte de fornecimento (Santos, 1996).

**Tabela 2** – Efeitos farmacológicos e sintomas causados pela ingestão de alimentos com teores elevados de amins biogénicas (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Önal, 2007).

Aminas Biogénicas	Efeitos farmacológicos	Sintomas
<b>Histamina</b>	Vasodilatação; Libertação de adrenalina e noradrenalina; Excitação da musculatura lisa do útero, intestino e do tracto respiratório; Estimulação dos neurónios sensoriais e motores; Controlo da secreção ácida gástrica; Mediador primário da resposta alérgica imediata	Cutâneos: erupção, urticária, edema e inflamação localizada; Gastrointestinais: náuseas, diarreia e contracções abdominais; Outros sintomas incluem hipotensão, dores de cabeça, palpitações, formigueiro e, em casos mais severos, sensação de queimadura, broncoespasmos e dificuldade respiratória.
<b>Tiramina</b>	Vasoconstrição; Aumento do débito cardíaco, da pressão sanguínea, da taxa respiratória e da glicose no sangue; Libertação da noradrenalina a partir do sistema nervoso parassimpático.	Causa aumento das pupilas, lacrimação e salivação; Dores de cabeça e enxaqueca; Hipertensão.
<b>Triptamina</b>	Vasoconstrição; Aumento da pressão sanguínea.	Hipertensão.
<b>Cadaverina e Putrecina</b>	Diminuição da pressão sanguínea; Bradycardia; Pontencia a toxicidade das outras amins.	Paresia das extremidades.
<b>Feniletilamina</b>	Vasoconstrição; Libertação da noradrenalina a partir do sistema nervoso parassimpático; Aumento da pressão sanguínea.	Dores de cabeça e enxaqueca; Hipertensão.

Alguns estudos demonstraram a acção anti-radicaís livres da putrescina, da cadaverina e da espermidina. Outros ainda, comprovaram que as poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) inibem a oxidação dos ácidos gordos poliinsaturados, estando esta acção correlacionada com o número de grupos amino presente nas amins. Por sua vez, também a tiramina exerce uma actividade marcadamente antioxidante, proporcional à sua concentração (Santos, 1996).

De todas as amins biogénicas, a histamina constitui aquela sobre a qual mais dados estão disponíveis no que respeita à sua actividade no organismo humano. Trata-se de um composto com características vasodilatadoras acentuadas, que desempenha funções de mediador celular em

muitas e importantes acções biológicas, nomeadamente regulação do conteúdo e quantidade das secreções gástricas e mediação de reacções de hipersensibilidade e de reacções inflamatórias do organismo em resposta a agressões externas. Nos últimos anos, o seu papel como neurotransmissor, a nível do sistema nervoso central, tem vindo a ser reconhecido (Fernandes, 2001).

A histamina no Homem pode ter uma origem exógena a partir dos alimentos ou pode ter uma origem endógena, estando principalmente contida no interior dos grânulos dos mastócitos, presentes nos mais variados tecidos, e dos basófilos sanguíneos.

Os efeitos biológicos da histamina de origem endógena verificam-se quando esta é libertada em grandes quantidades, em resultado de uma resposta do organismo ou por indução directa (Lehane *et* Olley, 2000; Fernandes, 2001).

No primeiro caso, a resposta é mediada por anti-corpos (IgE), previamente ligados à superfície membranar dos mastócitos e capazes de, na presença do antígeno respectivo, desencadear uma série de eventos bioquímicos em cascata que levam à libertação da histamina e de uma série de outros componentes armazenados conjuntamente (Fernandes, 2001).

A desgranulação directa dos mastócitos, sem prévia sensibilização, pode ser provocada por vários compostos, geralmente com características básicas, incluindo polipeptídeos de origem endógena ou exógena, e um grande número de agentes terapêuticos como a vancomicina e a morfina (Fernandes, 2001).

A histamina exerce a sua acção, essencialmente, por estimulação de três tipos de receptores conhecidos como  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ , localizados nas membranas celulares da pele e do sistema respiratório, cardiovascular, gastrointestinal e hematológico/imunológico (Lehane *et* Olley, 2000; Fernandes, 2001).

Por meio dos receptores  $H_1$ , a histamina induz a contracção da musculatura lisa do intestino, do útero e dos brônquios; a dilatação da musculatura lisa dos vasos sanguíneos e o incremento da permeabilidade das paredes dos capilares sanguíneos, que pode ser responsável, entre outros sintomas, pelo surgimento de espasmos abdominais, diarreia, vómitos, acentuada dificuldade respiratória, edema generalizado e urticária (Santos, 1996; Fernandes, 2001). Ao actuar sobre os receptores  $H_1$ , a histamina cumpre um papel fisiológico de defender o organismo frente a agentes estranhos, a danos mecânicos, queimaduras e infecções (Fernandes, 2001).

A regulação da acidez é feita pela histamina por intermédio dos receptores  $H_2$  localizados nas células parietais do estômago; contudo, ainda é desconhecido se esta acção tem influência nos sintomas observados em caso de envenenamento por histamina. Os antagonistas (como por exemplo a cimetidina) são bastante eficazes no tratamento de diversos fenómenos típicos da intoxicação histamínica (Santos, 1996; Fernandes, 2001).

Sobre os receptores  $H_3$ , têm-se conhecimento apenas que se encontram presentes nos tecidos cerebrais, onde provavelmente são responsáveis pela regulação da síntese e libertação de histamina implicada na transmissão nervosa, no aparelho respiratório e no sistema digestivo (Fernandes, 2001).

## 2.4 Toxicologia

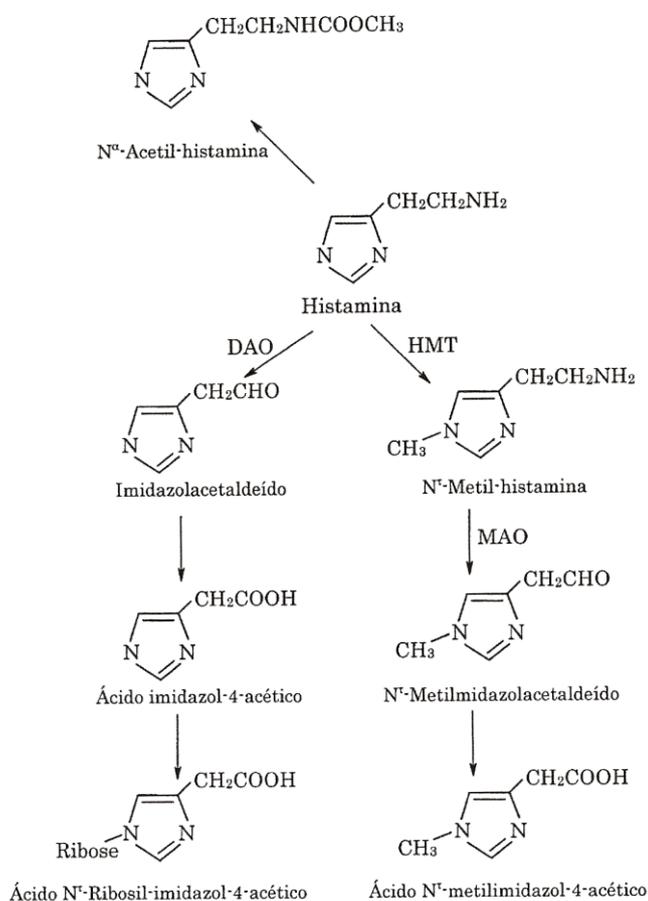
Apesar das aminas biogénicas serem necessárias em muitas funções fisiológicas, o consumo de alimentos com elevadas concentrações deve ser prevenido atendendo aos problemas de ordem toxicológica que daí podem advir. As intoxicações alimentares mais graves estão normalmente ligadas à ingestão de queijo ou peixe com elevadas concentrações de histamina. Na maioria das vezes são produzidos elevados teores de histamina antes dos alimentos se apresentarem degradados ou com as propriedades organolépticas alteradas (Shalaby, 1996).

Os mamíferos possuem um sistema de desintoxicação relativamente eficiente, capaz de metabolizar a ingestão diária normal de aminas biogénicas. Nos humanos, sob condições normais de saúde, as aminas, absorvidas a partir dos alimentos e formadas pelas bactérias intestinais, são rapidamente convertidas em produtos de degradação fisiologicamente inactivos pela acção das amino oxidases ou por conjugação; No entanto, no caso de indivíduos alérgicos, na presença de inibidores das amino oxidases (monoamino – MAO e diamino oxidase - DAO) ou da ingestão de elevados níveis, o processo de desintoxicação é interrompido/limitado e as aminas biogénicas acumulam-se, entrando na corrente sanguínea e provocando intoxicação/envenenamento (Santos, 1996; Shalaby, 1996).

No caso da histamina, esta é primariamente inactivada por duas enzimas: diamino oxidase (DAO) e histamina-N-metil transferase (HMT) (Shalaby, 1996; Lehane *et al.*, 2000; Brinker *et al.*, 2002). A figura 1 ilustra as vias metabólicas de inactivação da histamina pelas enzimas DAO, HMT, MAO e por enzimas possivelmente bacterianas que convertem a histamina em acetilhistamina, sendo os produtos finais do metabolismo da histamina excretados na urina. Enquanto a DAO e a MAO se encontram principalmente localizadas no estômago, a distribuição da HMT é generalizada pelos tecidos humanos, com a seguinte ordem de actividade fígado>>cólon>baço>pulmão>intestino delgado>estômago (Lehane *et al.*, 2000).

As enzimas MAO e DAO desempenham um papel fundamental no processo de desintoxicação. Contudo, quando a sua actividade é suprimida por uma ou mais substâncias, conhecidas como potenciadores, este processo é inibido, explicando o facto do pescado em decomposição ou queijo curado serem mais tóxicos que a própria histamina em solução. Os potenciadores da acção da histamina podem ser outras aminas (especialmente a putrescina e a

cadaverina), drogas, fármacos, álcool ou doenças do aparelho gastrointestinal (Santos, 1996; Huss, 1997; Lehane *et al.*, 2000; Önal, 2007; Dadáková *et al.*, 2009).



**Figura 1** – Vias metabólicas de inativação da histamina (Fernandes, 2001).

As aminas cadaverina, putrescina e triptamina são inibidoras da DAO. Apesar da tiramina e da feniletilamina serem também inativadas pela acção da MAO, podem no entanto inibir por competição o processo de desintoxicação da histamina (Ortolani *et al.*, 2006). A feniletilamina é inibidora da DAO e da HMT (histamina N-metiltransferase) (Santos, 1996).

As aminas secundárias (agmatina, espermina e espermidina) são passíveis de formar nitrosaminas estáveis através da reacção com nitritos. De uma forma geral, os compostos N-nitrosados são formados pela interacção dos grupos amino com os nitritos e óxidos de azoto, durante o armazenamento, conservação ou confecção dos alimentos (Santos, 1996; Kim *et al.*, 2009). As nitrosoaminas são carcinogénicas para o Homem, o que constitui um grave problema de segurança alimentar, especialmente em carnes e peixes que contêm nitritos ou sais de nitratos como conservantes (Shalaby, 1996; Fernandes, 2001; Önal, 2007).

A histamina é considerada a amina mais tóxica dos alimentos, exercendo o seu efeito tóxico por intermédio de três tipos de receptores ( $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ ) presentes nas membranas celulares. Actua através da dilatação dos vasos sanguíneos, capilares e artérias, que resulta em hipotensão,

vermelhidão e dores de cabeça (Lehane *et al.*, 2000; Brinker *et al.*, 2002). De forma geral, a intoxicação histamínica tem um período de incubação relativamente curto, de minutos a poucas horas após a ingestão, manifestando-se através de sintomas, tais como: enxaquecas, urticária, náuseas, vômitos, diarreia e arritmia (Dadáková *et al.*, 2009). Os sintomas da intoxicação histamínica, em alguns casos, são semelhantes aos sintomas da alergia (Önal, 2007). A gravidade dos sintomas pode variar consideravelmente consoante a quantidade de histamina ingerida e a sensibilidade do indivíduo; em casos extremos pode provocar o choque anafilático ou levar à morte (Chen *et al.*, 2010).

Assim, o efeito tóxico da histamina depende da concentração ingerida, da presença de outras aminas ou fármacos, da actividade das aminoxidases, da fisiologia intestinal do indivíduo, assim como da variabilidade individual inata (variações de peso, idade, género e dieta ou susceptibilidade alérgica) (Santos, 1996; Lehane *et al.*, 2000).

Embora a histamina seja a mais tóxica, a tiramina é também considerada uma das aminas biogénicas mais tóxicas. A ingestão de alimentos ricos em tiramina provoca uma perigosa intoxicação, conhecida como a “reação do queijo” (associada ao consumo de queijo), que leva a crises hipertensivas, usualmente acompanhadas por fortes dores de cabeça. Em situações mais graves pode levar a hemorragias cranianas, falhas cardíacas e edema pulmonar (Dadáková *et al.*, 2009).

A determinação das aminas biogénicas é importante, não só do ponto de vista da sua toxicidade, como devido ao facto de poderem ser utilizadas como indicadores do grau de contaminação microbiana, do grau de frescura ou degradação dos alimentos, neste caso do pescado (Saaid *et al.*, 2009).

Os níveis de toxicidade das aminas são difíceis de estabelecer uma vez que dependem de factores individuais e da presença de outras aminas. Segundo alguns estudos, foi proposto para a histamina, um limite de 100 mg/kg de alimento e 2 mg/L de bebida alcoólica. De igual forma, valores de tiramina entre 100-800 mg/kg e de feniletilamina acima de 30 mg/kg, nos alimentos, são considerados tóxicos para a ingestão de uma porção normal de alimento ( $\approx 200$  g). No entanto foram documentados casos, em que a dose de 3 mg de feniletilamina provocou dores de cabeça e enxaquecas em indivíduos susceptíveis. Da mesma forma, em indivíduos a tomar inibidores da MAO a ingestão de 6 mg de tiramina trouxe efeitos adversos (Santos, 1996). Entretanto, apesar da putrescina, da cadaverina, da espermina e da espermidina não terem efeitos adversos significativos/comprovados, estas, para além potenciarem os efeitos da histamina, podem reagir com nitritos para formar nitrosaminas carcinogénicas (Önal, 2007).

No geral, níveis acima de 1000 mg/kg (amina/alimento) e ingestões superiores a 40 mg de aminas biogénicas são considerados potencialmente perigosos (Santos, 1996; Jeysekaran *et Shakila*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Saaïd *et al.*, 2009).

As discrepâncias encontradas entre os níveis de toxicidade da histamina documentados, podem ser devidas à ausência ou à presença de outras aminas biogénicas sinérgicas, como a putrescina e a cadaverina (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Jeysekaran *et Shakila*, 2003).

No caso específico do pescado e de forma a garantir níveis de segurança, a FDA (Food and Drug Administration) estabeleceu recentemente um nível de risco de 500 mg/kg para a histamina e recomenda a utilização dos seguintes níveis guias para a histamina: <50 mg/kg seguro para consumo, 50-200 mg/kg possivelmente tóxico, 200-1000 mg/kg provavelmente tóxico e >1000 mg/kg tóxico e impróprio para o consumo humano (Flick *et Granata*, 2005; Saaïd *et al.*, 2009).

Por outro lado a União Europeia estabeleceu como aceitável que o conteúdo médio de histamina não deve exceder os 100-200 mg/kg para espécies pertencentes às famílias Scomberesocidae e Scombridae (Santos, 1996) e sugeriu o estabelecimento de um limite máximo de 300 mg/kg para o total de aminas biogénicas presentes no pescado ou produtos de pesca (Flick *et Granata*, 2005).

Em Portugal, os teores de histamina são fixados pelo Regulamento (CE) N. 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, que estabelece a recolha de 9 amostras por lote e determina que o teor médio de histamina não deve ultrapassar 100 mg/kg; nenhuma amostra deverá apresentar um teor superior de 200 mg/kg e só 2 podem apresentar um teor superior a 100 mg/kg. Estes limites aplicam-se às espécies de peixe associadas a um elevado teor de histidina, como é o caso das famílias Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryphaenidae, Pomatomidae e Scombrosidae. No caso de produtos de pesca que tenham sido submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura, fabricados a partir de espécies de peixe associadas a um elevado teor de histidina anteriormente descritas, este regulamento diz que devem ser colhidas 9 amostras por lote e o teor médio de histamina não deve ultrapassar 200 mg/kg; nenhuma amostra deverá apresentar um teor superior de 400 mg/kg e somente 2 podem apresentar um teor superior a 200 mg/kg.

## **2.5 Intoxicação histamínica**

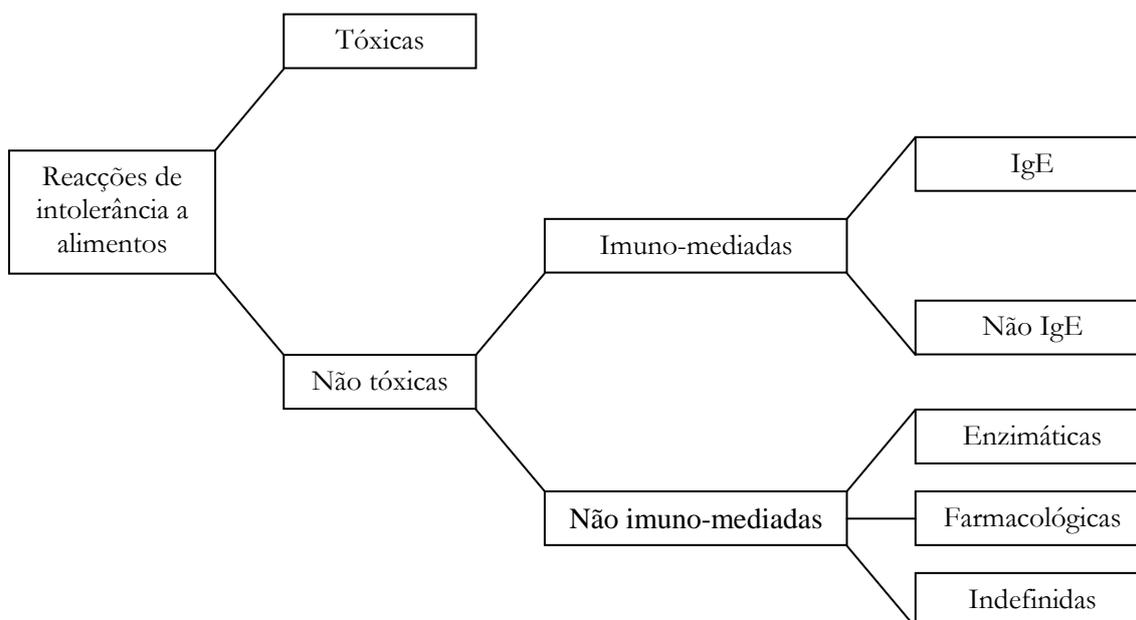
As reacções adversas aos alimentos são episódios frequentes na população em geral. No entanto, o conhecimento exacto de alérgenos alimentares e os mecanismos envolvidos nesses processos é escasso.

O fenómeno de intoxicação relacionada com a ingestão de histamina presente nos alimentos, habitualmente designado por intoxicação histamínica ou por histaminose pode ser

definido, do ponto de vista patofisiológico, como uma pseudo-alergia devida à elevação repentina dos níveis plasmáticos e/ou teciduais de histamina em resultado da absorção gastro-intestinal de quantidades anormalmente elevadas do composto. Embora ainda existam vários aspectos a esclarecer existe uma evidência crescente de que a intoxicação histamínica é uma das principais causas das manifestações de intolerância a determinados alimentos observadas num grande número de pessoas (Fernandes, 2001).

Apesar de ser desagradável, provocando prostração e desconforto por algumas horas, a intoxicação histamínica por consumo de peixe contaminado não representa grandes impactos para a saúde humana, sendo a mortalidade rara. No entanto em indivíduos a tomar alguns tipos de fármacos ou com distúrbios pulmonares, cardíacos ou renais pode tornar-se grave (Lehane *et* Olley, 2000).

De acordo com a classificação proposta em 1995 pelo Subcomité de Reacções Adversas a Alimentos da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica, a intolerância a alimentos devido à presença de histamina e/ou outras aminas biogénicas pode ser caracterizada como não tóxica, não imuno-mediada e de carácter farmacológico (figura 2). Entende-se por “tóxico” as reacções que ocorrem em todos os indivíduos, desde que a dose seja suficientemente elevada. Por outro lado, entende-se por “não-tóxicas” as manifestações de intolerância que só ocorrem em indivíduos susceptíveis (Fernandes, 2001; Ortolani *et* Pastorello, 2006).



**Figura 2** – Classificação das reacções de intolerância humana a alimentos, segundo o Subcomité de Reacções Adversas a Alimentos da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (Fernandes, 2001; Ortolani *et* Pastorello, 2006).

Estima-se que as reacções resultantes de intoxicações alimentares afectem 0,2 % da população mundial e são particularmente evidentes após a ingestão de alimentos caracterizados

por poderem apresentar teores elevados de histamina, nomeadamente queijos, vinhos, "pickles", peixes (em especial os tunídeos), enchidos, etc. Existem registos de intoxicações histamínicas graves simultâneas de um grande número de pessoas, incluindo alguns casos fatais por falência do sistema circulatório, subsequente à ingestão de peixe em mau estado de conservação (Fernandes, 2001).

Embora as intoxicações histamínicas ocorram em todas as partes do mundo e sejam talvez a causa mais comum de intoxicação causadas pela ingestão de pescado não existem estatísticas reais destes incidentes. Muitos países não têm sistemas adequados para reportar estes casos, devido fundamentalmente ao carácter efêmero da doença (muitas pessoas não recorrem aos cuidados médicos), à ignorância dos profissionais de saúde ou à confusão com alergia alimentar (Lehane *et Olley*, 2000).

Em condições normais, a presença de histamina na dieta não tem consequências nefastas, dado que não é eficientemente absorvida pelo tracto gastrointestinal. Contudo não é possível reproduzir os seus efeitos tóxicos comprovados pela ingestão de alimentos contaminados com a administração isoladamente de doses semelhantes de histamina. Este facto poder ser devido, como anteriormente referido, à presença de potenciadores da histamina nos alimentos envolvidos, que inibem o processo normal de inactivação enzimática da histamina a nível gastrointestinal, tornando-a disponível para ser absorvida em grandes quantidades para a circulação sistémica (Lehane *et Olley*, 2000; Fernandes, 2001).

A irregularidade verificada na ocorrência de fenómenos de intoxicação supostamente causados pela absorção gastrointestinal de grandes quantidades de histamina não parece contudo depender exclusivamente da presença de potenciadores capazes de inibir a inactivação metabólica do composto (Fernandes, 2001). Por outro lado, a reacção quase imediata, em alguns casos em menos de 5 minutos, sugere a absorção, de parte da histamina, através da membrana da mucosa oral, ignorando as aminoxidases intestinais (Santos, 1996; Lehane *et Olley*, 2000).

Chu *et Bjeldanes* (1981) puseram a hipótese que estes potenciadores poderiam exercer a sua acção interferindo com a acção protectora da mucosa intestinal, uma vez que esta é essencial para prevenir a absorção intestinal de histamina, na medida em que esta se liga à mucosa intestinal impedindo assim a sua absorção.

Segundo Lehane *et Olley* (2000), algumas substâncias básicas, produzidas durante a decomposição do pescado, têm a capacidade de libertar a histamina dos grânulos dos mastócitos, o que contribui para aumentar a variabilidade dos sintomas associados à intoxicação histamínica. Adicionalmente, a histamina ingerida através da dieta parece ter um papel menor na toxicidade, que a histamina endógena libertada no tracto gastrointestinal pela desgranulação dos mastócitos, induzida por outras substâncias presentes no pescado com elevados teores de histamina. Porém o

papel da histamina endógena libertada na intoxicação histamínica permanece incerto e não está provado.

O tratamento preventivo ou curativo da intoxicação histamínica pode ser feito através da administração de anti-histamínicos do tipo bloqueadores  $H_1$ , que impedem a acção da histamina plasmática, e, apesar de menos eficiente, da administração de Vitamina B6 (fosfato de piridoxal) que é um co-factor crucial para a actividade da DAO (Fernandes, 2001).

## 2.6 Aminas Biogénicas no pescado

Mais que qualquer outro produto alimentar, o pescado e os produtos da pesca são frequentemente associados às intoxicações por aminas biogénicas (Flick *et* Granata, 2005).

Dentro deste grupo, os mais associados com a intoxicação histamínica são as espécies pertencentes à família Scomberesocidae (agulhão) e Scombridae (tunídeos e sardas) (Shalady, 1996; Lehane *et* Olley, 2000; Flick *et* Granata, 2005). Na figura 3 encontram-se representados os peixes scombrídeos e não scombrídeos (arenques, sardinhas, anchovas, espadartes e espadins), normalmente envolvidos em fenómenos de intoxicação.



**Figura 3** – Pescado relacionado com a intoxicação histamínica (<http://foodsafety.suencs.com>).

Estes peixes caracterizam-se por serem naturalmente ricos em aminoácidos livres, nomeadamente em histidina, que pode ser catabolizada por duas vias metabólicas no músculo do peixe: desaminação para obter ácido urocânico ou descarboxilação para formar histamina (Santos, 1996; Lehane *et* Olley, 2000; Chen *et al.*, 2010). A primeira é a principal via em condições fisiológicas normais, porém em condições *post mortem* e no caso de haver contaminação bacteriana, a descarboxilação pode tornar-se a via mais significativa (Santos, 1996).

Apesar de alguns estudos não observarem distinções evidentes nos teores de aminas no músculo proveniente de diferentes partes do pescado, existem todavia estudos que se verificaram níveis superiores de espermidina no músculo escuro e níveis elevados de aminas nas paredes intestinais (Flick *et* Granata, 2005). Yoshinaga *et* Frank (1982) estudaram a evolução do teor de histamina durante a deterioração do bonito (*Katsuwonus pelamis*) e concluíram que a sua formação não era homogênea ao longo do peixe, diminuindo da parte anterior (cabeça) para a parte posterior (cauda). Esta diferença foi atribuída ao padrão de distribuição dos microrganismos responsáveis pela formação de histamina, visto que a distribuição de histidina era homogênea ao longo do peixe. A maior concentração de microrganismos carboxilase positivos nas brânquias e nos intestinos justifica a predominância de histamina nestas zonas (Yoshinaga *et* Frank, 1982; Lehane *et* Olley, 2000).

Constatou-se, também, que é nos peixes de carne vermelha, como os tunídeos, que se produz maior quantidade de histamina, assim como outras aminas, sendo essa produção mais rápida que nos peixes de carne branca (Flick *et* Granata, 2005). Este facto é atribuído às elevadas concentrações de histidina presentes nos peixes de carne vermelha, passíveis de serem convertidas em histamina. Nos tunídeos, a histidina pode atingir valores superiores a 15 g de histidina/kg de músculo (Shalaby, 1996). A tabela 3 faz referência aos níveis de histamina encontrados no peixe, em alguns trabalhos desenvolvidos nesta área.

Na medida em que é aceite que a histamina formada é maioritariamente de origem bacteriana, esta pode ser usada como critério de avaliação da contaminação e deterioração dos produtos de pesca. No entanto, como já foi sugerido anteriormente, outras aminas biogénicas podem igualmente ser utilizadas como indicadores do grau de frescura e qualidade do pescado, visto que os seus teores se alteram durante o processo de deterioração. Alguns estudos constataram que, durante o processo de deterioração dos tunídeos, a concentração de histamina, cadaverina e putrescina aumentava, ao passo que a concentração de espermina e espermidina diminuía (Shalaby, 1996).

A produção de cadaverina e putrescina durante o processo de deterioração do pescado deve-se, presumivelmente, a enzimas bacterianas não envolvidas no processo de descarboxilação da histidina. Apesar de existir um aumento significativo de ambas as aminas no decorrer do processo de deterioração do pescado, para a cadaverina foram encontrados teores entre 100 e 600 mg/kg, ao passo que para a putrescina se mantinham inferiores a 100 mg/kg, facto este que pode ser explicado pelas quantidades limitadas de ornitina no pescado (Lehane *et* Olley, 2000).

**Tabela 3** – Concentrações médias de histamina encontradas por diferentes autores no pescado.

Pescado	Histamina (ppm)	Referência
Bonito ( <i>Katsuwonus pelamis</i> ) mantido à temperatura ambiente durante 12 h	680	Yoshinaga <i>et al.</i> , 1982
Bonito ( <i>Katsuwonus pelamis</i> ) mantido à temperatura ambiente durante 24 h	2970	Yoshinaga <i>et al.</i> , 1982
Sardas frescas	Sem vestígios	Shalaby, 1996
Sardas mantidas à temperatura ambiente durante 24 h	28,4	Shalaby, 1996
Sardas mantidas à temperatura ambiente durante 48 h	1540	Shalaby, 1996
Atum fresco	Sem vestígios	Shalaby, 1996
Atum-voador ( <i>Thunnus alalunga</i> ) mantido à 0°C, durante 9 dias	Sem vestígios	Flick <i>et al.</i> , 2005
Atum-voador ( <i>Thunnus alalunga</i> ) mantido à 22°C, durante 5 dias	3,61	Flick <i>et al.</i> , 2005
Atum-albacora ( <i>Thunnus albacores</i> ) mantido à 0°C, durante 33 dias	82,5	Flick <i>et al.</i> , 2005
Atum-albacora ( <i>Thunnus albacores</i> ) mantido à 25°C, durante 7 dias	100	Flick <i>et al.</i> , 2005
Atum-patudo ( <i>Thunnus obesus</i> ) mantido à 21°C, durante 18 h	Sem vestígios	Flick <i>et al.</i> , 2005
Atum-patudo ( <i>Thunnus obesus</i> ) mantido à 22°C, durante 2 dias	> 50	Flick <i>et al.</i> , 2005
Bonito ( <i>Euthynnus affinis</i> ) fresco	22,1	Nahla <i>et al.</i> , 2005
Arenque ( <i>Sardinella gibbosa</i> ) fresco	16,4	Nahla <i>et al.</i> , 2005
Tainha ( <i>Mugil cephalus</i> ) fresca	11	Nahla <i>et al.</i> , 2005
Chicharro ( <i>Trachurus trachurus</i> ) fresco	45	Nahla <i>et al.</i> , 2005
Palometa ( <i>Orcynopsis unicolor</i> ) fresca	27,8	Nahla <i>et al.</i> , 2005
Sardinha ( <i>Sardina pilchardus</i> ) fresca	22,4	Nahla <i>et al.</i> , 2005
Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ) fresca	Sem vestígios	Kordiovská <i>et al.</i> , 2006
Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ) mantido à 24°C, durante 48 h	333	Kordiovská <i>et al.</i> , 2006
Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ) mantido à 3°C, durante 7 dias	Sem vestígios	Kordiovská <i>et al.</i> , 2006
Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ) mantido à -18°C, durante 3 meses	Sem vestígios	Kordiovská <i>et al.</i> , 2006
Bonito ( <i>Katsuwonus pelamis</i> ) fresco	21,6	Kim <i>et al.</i> , 2009
Salmão ( <i>Oncorhynchus keta</i> ) fresco	1,4	Kim <i>et al.</i> , 2009
Cavala ( <i>Scomber japonicus</i> ) fresca	2,7	Kim <i>et al.</i> , 2009
Atum enlatado em óleo	18	Saaid <i>et al.</i> , 2009

Uma vez que a determinação da histamina só por si nem sempre é útil como indicador da qualidade do pescado, foi estabelecido um índice químico de qualidade para estimar o nível de degradação do atum fresco utilizado na elaboração das conservas. Este índice é calculado com base nas concentrações de histamina, putrescina, cadaverina e espermina e espermidina, através da seguinte equação matemática:

$$\text{Índice} = \frac{[\text{Histamina}] + [\text{Putrescina}] + [\text{Cadaverina}]}{[\text{Espermina}] + [\text{Espermidina}]}, [ ] \text{ em ppm}$$

No entanto, apesar deste método poder ser utilizado com indicador químico da degradação foi considerado relativamente complexo para análises de rotina (Lehane *et al.*, 2000).

A predominância de aminas biogénicas no pescado varia de espécie para espécie, de espécime para espécime, sendo que de uma forma geral a concentração após a captura é vestigial podendo ser fomentada pelas condições inadequadas de captura, armazenamento e processamento (Moreno *et al.*, 2003; Flick *et al.*, 2005).

### 3. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS

A determinação de aminas biogénicas nos variados alimentos tem sido, desde algumas décadas, um desafio mobilizador para um grande número de cientistas das mais diversas áreas. Esta motivação advém de duas razões principais: a primeira porque são potencialmente tóxicos e a segunda devido a serem potenciais indicadores de qualidade dos alimentos. As aplicações da sua determinação variam desde o controlo de qualidade das matérias-primas, dos produtos intermediários e finais do ponto de vista da saúde humana e segurança alimentar até à monitorização dos processos de fermentação, de controlo dos processos, pesquisa e desenvolvimento (Önal, 2007).

A quantificação correcta das aminas biogénicas é uma operação analítica com um acentuado grau de dificuldade devido fundamentalmente: (i) ao acentuado carácter polar dos compostos que resulta numa maior solubilidade em água do que a maioria dos solventes orgânicos geralmente usados; (ii) à ausência de propriedades intrínsecas dos compostos que possibilitem a sua detecção directamente por métodos físico-químicos de aplicação corrente, como é o caso de métodos espectrofotométricos, fluorimétricos ou electroquímicos; (iii) à extrema complexidade da matriz amostra; (iv) às baixas concentrações em que se encontram estes compostos nas amostras; (v) à presença potencial de compostos interferentes, como diversos aminoácidos com semelhanças estruturais às aminas; (vi) à presença simultânea de aminas estruturalmente muito diferentes no mesmo extracto (Shalaby, 1996; Fernandes, 2001; Önal, 2007).

Em Portugal, a determinação de histamina nos produtos de pesca e aquicultura será normalizada com recurso à Norma Portuguesa 4490 de Maio de 2009, ainda em projecto. De acordo com este projecto de norma, a amostra deve ser homogeneizada com ácido tricloroacético, filtrada e injectada num sistema de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) com derivatização pós-coluna com *o*-ftaldeído (OPA). A fluorescência resultante é então medida num detector de fluorescência.

Adicionalmente às técnicas baseadas em fluorescência, várias outras técnicas têm vindo a ser desenvolvidas ao longo dos tempos para analisar as aminas biogénicas nos alimentos, nomeadamente: cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia de fase gasosa (GC), electrofórese capilar (CE), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ensaios bioquímicos (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Önal, 2007). Apesar da TLC ser relativamente simples e não requerer nenhum equipamento especial, os métodos publicados requerem excessivo tempo para a análise e/ou conduzem a resultados imprecisos. A cromatografia de fase gasosa não é normalmente aplicada para a determinação de aminas biogénicas, visto não serem por natureza compostos voláteis. Por outro lado, devido à elevada sensibilidade com detecção electroquímica

ou ultravioleta, o HPLC com detecção por fluorescência foi a ferramenta mais utilizada; no entanto, como as aminas biogénicas não exibem uma forte fluorescência, não podem ser detectadas de forma directa. Os ensaios bioquímicos e imunoenaios têm a vantagem de serem baratos, rápidos, simples de executar e poderem ser utilizados fora do laboratório; no entanto emitem por vezes resultados semi-quantitativos (Önal, 2007), aliados frequentemente à falta de especificidade (Fernandes, 2001). A tabela 4 faz referência aos principais métodos publicados para a determinação de aminas biogénicas em matrizes alimentares sólidas.

Entre os métodos utilizados, o HPLC com derivatização pré- ou pós-coluna é sem dúvida a técnica mais documentada para a separação e quantificação das aminas biogénicas. Devido à baixa volatilidade das aminas biogénicas, à falta de agentes cromóforos e à melhoria da sensibilidade, normalmente são adoptados procedimentos analíticos baseados na formação de derivados fluorescentes com diferentes agentes de derivatização, que incluem o cloreto de dansilo, cloreto de benzoilo, fluoresceína, 9-fluorenilmetil cloroformato, naftaleno-2,3-dicarboxaldeído e *o*-ftalaldeído (OPA). Na presença de um agente redutor como a N-acetilcisteína ou o 2-mercaptoetanol, o OPA reage rapidamente, em cerca de 30s, com as aminas primárias formando um derivado pouco estável. Desta forma, o cloreto de dansil é mais utilizado, na medida em que reage com ambas as aminas primárias e secundárias formando derivados estáveis (Önal, 2007). Para além dos agentes derivatizantes utilizados, encontra-se reportado na bibliografia diferentes tipos de colunas cromatográficas e de fases móveis com composições bastante diversificadas (Fernandes, 2001).

Recentemente, surgiu uma nova geração de fases estacionárias capaz de resistir a pressões elevadas (acima de 1000 bar), que quando integradas nos sistemas LC, o sistema toma a designação de UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Estes sistemas quando comparados com os convencionais HPLC, apresentam as vantagens de permitirem análises muito mais rápidas, consumirem menos solventes e melhorarem a resolução dos picos, sem detrimento da eficiência (Dadáková *et al.*, 2009).

Apesar do vasto leque de metodologias analíticas publicadas, novas metodologias estão continuamente a ser desenvolvidas com o objectivo de atingir níveis cada vez mais elevados na dupla vertente qualidade dos resultados versus facilidade e rapidez de execução.

**Tabela 4** – Principais métodos publicados para a determinação de aminas biogénicas em matrizes alimentares sólidas (Önal, 2007).

Aminas Biogénicas	Amostra	Pré-tratamento	Fase estacionária	Fase móvel (Fluxo –FR mL/min)	Derivatização/ detecção
Histamina, Tiramina, Triptamina, Putrescina, Cadaverina, Espermina e Espermidina	Derivados de carne	Ácido Tricloroacético a 5%	Para derivados OPA: Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub> Para derivados dansil: Zorbax Eclipse C <sub>18</sub>	Para derivados OPA: gradiente (tampão 100nM de acetato pH 5.8 e acetonitrilo) FR:0.6 Para derivados dansil: gradiente (Água/Acetonitrilo) FR:0.8	Cloreto de dansil e <i>o</i> -ftaldeído 254UV/VIS para OPA
Histamina, Etilamina, Metilamina, Tiramina, Putrescina e Cadaverina	Derivados de carne	Ácido Metanossulfónico	IonPac CS17	Gradiente (Acido Metanossulfónico)	UV e MS
Histamina	Atum	1M Ácido Perclórico	Luna C <sub>18</sub>	Gradiente: Eluente A: 85% de Solução tampão pH 6.9 e 15% de Metanol. Eluente B: Acetonitrilo	DAD (Diode array detector)
Tiramina	Queijo	5% (w/v) de Ácido Perclórico	Phenomex Luna RP-18	Isocrático (70% Metanol e 30% Água) FR:1	Derivação com 4-Cloro-7-nitrobenzofurazano e detecção UV a 458nm
Histamina, Tiramina, Putrescina, Cadaverina e Espermidina	Peixe e derivados	5% Ácido Tricloroacético	C-18 $\mu$ -Bondapak RP	Gradiente (Metanol/Água) FR:1	Detector UV a 254nm
Histamina, Putrescina, Cadaverina e Espermidina	Tecido de Peixe	Acido Metanossulfónico	IonPac CS17	Gradiente (Ácido Metanossulfónico) FR:1	Detecção Electroquímica
Histamina e Tiramina	Queijo	Extracção Fase Sólida	Luna C <sub>18</sub>	Gradiente Eluente A: 0.1% de Ácido Trifluoroacético (v/v) solução aquosa Eluente B: Metanol FR:0.2	MS/MS
Histamina, Tiramina, Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina e Amino ácidos livres	Fiambres secos curados	0,4 M de Ácido Perclórico	LiChrospher 100 C <sub>18</sub>	Não disponível	Cloreto de dansil absorvância a 254nm
Histamina, Tiramina, Triptamina, Putrescina, Cadaverina, Espermina e Espermidina	Queijo	0,1 M Ácido Clorídrico	Kromasil KR 100-5 C <sub>18</sub>	Gradiente (Acetonitrilo/Água) FR:0.8	Detector espectrofotométrico a 254nm

O HPLC tem sido a escolha de muitos laboratórios para separar, analisar e purificar as misturas de compostos orgânicos, desde 1970. No entanto, a combinação recente da cromatografia líquida (LC) com espectrometria de massa (MS) ou com espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), criou uma nova ferramenta analítica ideal para auxiliar os laboratórios a vencerem algumas barreiras analíticas (McMaster, 2005).

Da perspectiva qualitativa, a maior limitação da cromatografia é a incapacidade de proporcionar uma identificação inequívoca dos componentes numa mistura, mesmo que estejam completamente separados uns dos outros; uma vez que a identificação é baseada na comparação com padrões com tempos de retenção semelhantes. No entanto, existem muitos compostos com tempos de retenção semelhantes que co-eluem. Por outro lado, a dificuldade em obter separações completas de todos os componentes de uma mistura é outro ponto fraco do HPLC. O poder da espectrometria de massa reside no facto de que o espectro de massa de muitos compostos ser suficientemente específico para permitir a sua identificação com elevado grau de confiança, mesmo que haja co-eluição de vários compostos (McMaster, 2005).

Não obstante à capacidade de separação característica dos métodos cromatográficos e os avanços na detecção dos analitos, a obtenção de bons resultados analíticos implica, muitas vezes, um processo prévio de extracção/purificação dos compostos a analisar, que promova a remoção de interferências e a concentração das amins presentes na amostra. Assim sendo, o processo de extracção das amins biogénicas das amostras de alimentos sólidos é um passo crucial do procedimento analítico, podendo afectar negativamente a recuperação do método. Entre os solventes utilizados na extracção destacam-se o ácido clorídrico, o ácido tricloroacético, o ácido perclórico, o ácido metanossulfónico e o éter de petróleo (Önal, 2007).

O processo de tratamento da amostra é o método para converter a matriz biológica numa solução adequada ao sistema LC-MS, na qual os analitos são retidos de forma fiável. A composição das amostras biológicas é extremamente complexa, contendo numerosos e diferentes compostos, variando desde extensas proteínas até sais orgânicos simples, que podem interferir negativamente com o sucesso da análise. Assim sendo, a preparação dos extractos da amostra para LC-MS é um passo importante para minimizar os efeitos da matriz biológica nos resultados e deve assentar nos seguintes aspectos: (i) as perdas de amostra devem ser mínimas para se obter um bom rendimento dos analitos com interesse; (ii) remoção eficiente de potenciais interferências; (iii) concentração do analito; (iv) resultados independentes da variabilidade da matriz; (v) o extracto final deve ser compatível tanto com a componente LC, como com a componente MS; (vi) conversão do analito a uma forma adequada à sua detecção; (vii) ser um processo adequado e rápido (Taylor, 2006).

Geralmente quanto mais tempo se investe na preparação e limpeza da amostra, menos tempo demora a análise cromatográfica.

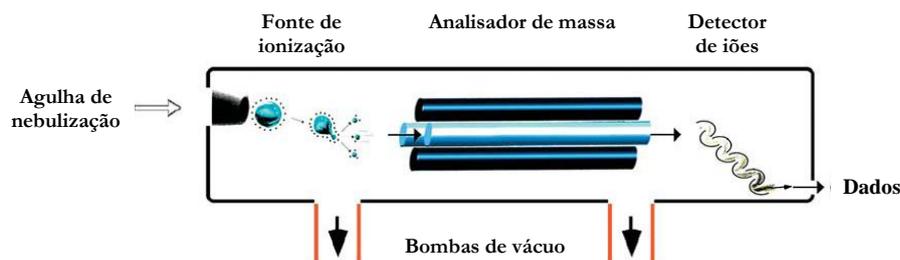
### 3.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS)

O sucesso de qualquer técnica analítica depende não somente da informação proporcionada, mas também da fiabilidade e da robustez da sua aplicação. Nos últimos tempos, a técnica de LC-MS tornou-se uma ferramenta indispensável em diversas áreas de aplicação, uma vez que fornece alta sensibilidade, segurança e produtividade necessárias para as áreas farmacêutica, alimentar, química e ambiental, entre outras. Outra característica importante desta técnica é a análise directa, sem necessidade de derivatização dos analitos. Esta técnica pode ser utilizada para identificar compostos alvo, quantificar compostos conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas.

O LC-MS combina a capacidade de separação física da cromatografia líquida (LC) com a capacidade de análise de massa da espectrometria de massa (MS) ou da espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Enquanto a coluna da componente LC separa no tempo a maior parte dos compostos de uma mistura, a componente MS ioniza as moléculas desses compostos e separa-os de acordo com a razão massa-carga ( $m/z$ ), calculada pela divisão da massa molecular do ião ( $m$ ) pelo número de cargas ( $z$ ) (Barker, 1998). Adicionalmente, um sistema LC-MS/MS é capaz de fragmentar o ião precursor com um determinado padrão de fragmentação e separar os iões filhos resultantes para identificação e quantificação (McMaster, 2005).

Normalmente, os elementos que constituem o sistema LC/MS são o módulo de injeção automático, o módulo LC, a fonte de ionização e o espectrómetro de massa (Korfmacher, 2005). Na grande maioria das vezes, a fonte de ionização faz parte do espectrómetro de massa, sendo então este constituído pela fonte de ionização, o analisador de massa e o detector de iões, conforme esquematizado na figura 4. Uma vez no interior da fonte de ionização, as moléculas que compõem a amostra são convertidas em iões, antes de serem impulsionadas electrostaticamente para o analisador de massa, no qual os iões são separados de acordo com a razão  $m/z$  e seguem para o detector que converte a energia iónica em sinais eléctricos transmitidos para um computador (Siuzdak, 2004).

De forma a introduzir alguns conceitos, será feita uma breve introdução teórica sobre as fontes de ionização (mas propriamente a ESI) e os analisadores de massa.

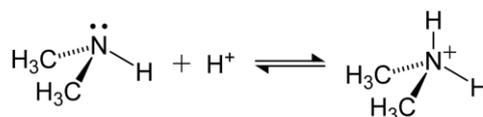


**Figura 4** – Componentes do espectrómetro de massa (Siuzdak, 2004).

### 3.1.1 Fontes de Ionização

Quando se fala de ionização temos que distinguir dois conceitos: método de ionização e fonte de ionização. O método de ionização refere-se ao mecanismo de ionização, enquanto a fonte de ionização é o dispositivo mecânico onde a ionização se concretiza (Siuzdak, 2004).

Na medida em que este trabalho se desenvolve em aminas destacamos o método de ionização por protonação, pelo qual um próton é adicionado à molécula, resultando numa carga positiva de 1+ por cada próton adicionado (figura 5). As cargas positivas tendem a residir nos resíduos básicos da molécula para formar catiões estáveis, como é o caso das aminas (Siuzdak, 2004).



**Figura 5** – Protonação das aminas ([www.answers.com/topic/ammonium](http://www.answers.com/topic/ammonium)).

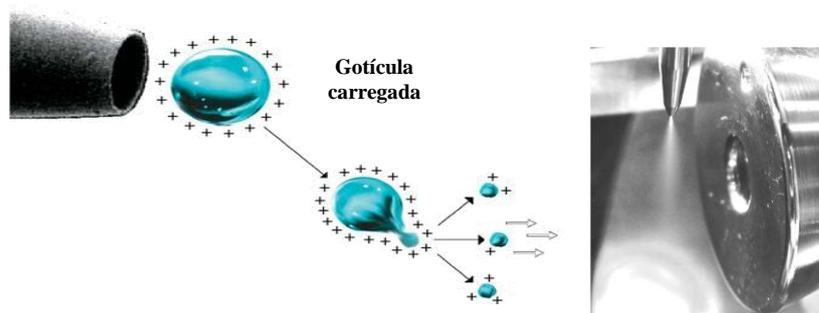
A fonte de ionização é a interface entre o sistema LC e o espectrómetro de massa e tem a dupla tarefa de eliminar o solvente vindo da componente do eluente do LC e promover a formação de íons na fase gasosa do analito (Politi *et al.*, 2006). A fonte de ionização resolve as incompatibilidades entre as duas técnicas, LC e MS. As principais fontes de ionização encontram-se descritas na tabela 5. No entanto, visto que neste trabalho se utilizou a fonte de ionização ESI, foi dado especial destaque para alguns aspectos desta fonte.

Na família das fontes de ionização à pressão atmosférica (API), a ESI foi a primeira a ser desenvolvida e é a mais utilizada no campo da toxicologia analítica. A fonte ESI consiste num tubo capilar, a agulha de nebulização, no qual é aplicada uma voltagem (tipicamente 3-5 kV); esta diferença de potencial entre o início e o orifício de abertura da agulha de nebulização, situada no interior da câmara de ionização que antecede do analisador de massa, é suficiente para provocar a nebulização do líquido que está a fluir do capilar. Dependendo da polaridade da tensão aplicada na agulha de nebulização, as gotículas nebulizadas contendo o analito ionizado, estão carregadas

positivamente ou negativamente. A redução do tamanho das gotículas é provocada pela evaporação do solvente e pelo aumento da densidade de cargas, que culmina com a explosão em microgotas, quando as forças de repulsão entre cargas excedem as forças de coesão (ver figura 6). Estas explosões ou fissões sucessivas da gotícula conduzem à formação de iões na fase gasosa, que são eletrostaticamente direccionados para o interior do analisador de massa. A fonte ESI requer que o analito esteja ionizado na solução (Politi *et al.*, 2006).

**Tabela 5** – Principais fontes de ionização (Siuzdak, 2004; Sangsrichan, 2005).

Fonte de Ionização	Tipo de aplicação	Gama de massas	Método
Ionização por <i>electrospray</i> (ESI)	Péptidos, proteínas, hidratos de carbono, pequenos oligonucleotídeos, polímeros sintéticos e lípidos	Até 70 000 Daltons	Evaporação de gotículas carregadas
Ionização química à pressão atmosférica (APCI)	Compostos com baixa polaridade	Até 1 200 Daltons	Descarga da corona; transferência protónica
Ionização por desadsorção laser, assistida por matriz (MALDI)	Péptidos, proteínas e nucleótidos	Até 300 000 Daltons	Absorção de fotões; transferência protónica
Ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB)	Hidratos de carbono, compostos organometálicos e péptidos não voláteis	Até 7 000 Daltons	Desadsorção de iões; transferência protónica
Ionização electrónica (EI)	Moléculas com baixo peso molecular e amostras voláteis	Até 500 Daltons	Feixe de electrões; captura ou ejeção electrónica
Ionização química (CI)	Moléculas com baixo peso molecular e amostras voláteis	Até 500 Daltons	Transferência protónica



**Figura 6** – Formações de iões por ionização através da fonte ESI. À direita, imagem de uma fonte ESI (Siuzdak, 2004).

Devido à pequena quantidade de energia transferida para a molécula durante o processo de ionização, o ESI é uma técnica de ionização leve que tem um impacto positivo na sensibilidade da análise MS/MS de um ião precursor. Um ponto importante a ter em consideração, quando se

opera com esta fonte, é o facto da intensidade do sinal obtida depender mais da concentração do analito, que propriamente do fluxo dentro da fonte de ionização. Isto é, obtém-se uma melhor razão sinal-ruído (S/N), quando a concentração do analito no solvente aumenta e o fluxo diminui, do que no caso contrário, a concentração do analito diminui e o fluxo aumenta para compensar. Este facto explica-se através do processo de evaporação do solvente que é mais eficiente a fluxos baixos (Politi *et al.*, 2006).

Adicionalmente ao fluxo, a composição da fase móvel também afecta o desempenho da fonte ESI. Como princípio básico a fonte ESI requer a existência de iões em solução, logo o pH da fase móvel deve ser seleccionado em concordância. A utilização de tampões para controlar pH da fase móvel deve ter em conta dois factores: evitar o uso de tampões não voláteis, visto que estes se depositam na fonte de ionização durante o processo de vaporização/ionização; a concentração do tampão deve ser a mais baixa possível, uma vez que em concentrações mais elevadas que o analito podiam fazer com que este não passasse a fase gasosa, reduzindo assim a resposta através da supressão iónica (Politi *et al.*, 2006).

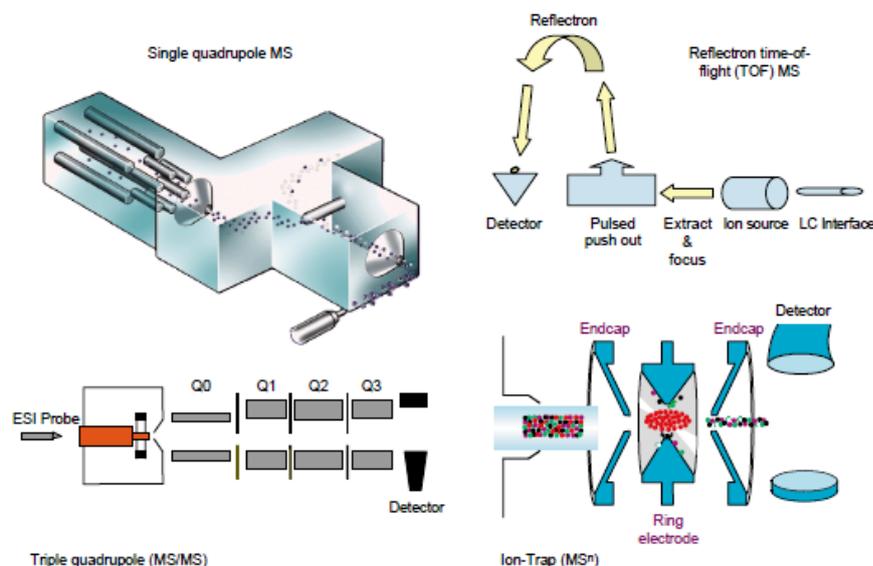
Finalmente, a percentagem da componente orgânica da fase móvel deve ser a mais alta possível, de forma a incrementar a eficiência na evaporação do solvente e como resultado incrementar o rendimento dos iões que entram no analisador de massa (Politi *et al.*, 2006).

### 3.1.2 Analisadores de Massa

O analisador de massa é a parte fundamental do espectrómetro de massa, isto é, o dispositivo capaz de separar os iões em fase gasosa consoante a sua massa dividida pela sua carga, a razão  $m/z$  dos iões. O seu propósito consiste em segurar os iões, seleccionando uma massa específica, e direccioná-los para o detector de iões para este contabiliza-los (McMaster, 2005; Politi *et al.*, 2006).

De forma a permitir a livre circulação dos iões desde o analisador até ao detector, o analisador de massa opera sob condições de vácuo, a baixas pressões (normalmente numa gama entre  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  torr). Uma vez que a fonte ESI opera à pressão atmosférica, a passagem de uma zona de pressão atmosférica (fonte de ionização) para outra de alto vácuo (analisador de massa) é um ponto crítico para a sensibilidade do analisador de massa (Politi *et al.*, 2006; Branco, 2007).

Existem muitos tipos de analisadores de massa que adoptam configurações diferentes para responder a uma vasta gama de aplicações; na figura 7 estão exemplificados os sistemas de LC-MS mais usuais, que empregam os analisadores de massa descritos na tabela 6.



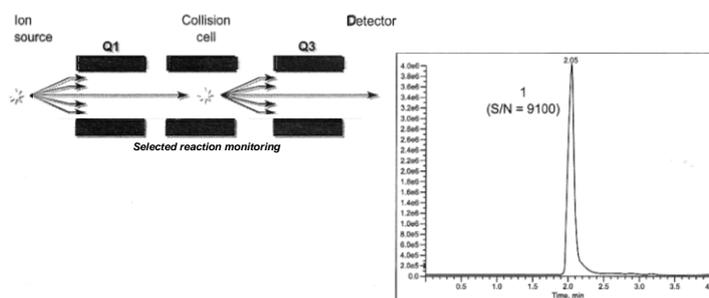
**Figura 7** – Tipos de espectrómetros de massa normalmente utilizados nos sistemas LC-MS: Quadrupolo simples (*Single Quadrupole*), Analisadores de Tempo de Voo (TOF) (*Reflectron time-of-flight*), Triplo Quadrupolo (MS/MS) (*Triple quadrupole*) e Armadilha de Iões (MS<sup>n</sup>) (*Ion-Trap*) (Korfmacher, 2005).

**Tabela 6** – Descrição resumida dos tipos de analisadores de massa (Sangsrichan, 2005; Politi *et al.*, 2006; Branco, 2007).

Analisador	Descrição
<b>Quadrupolo Simples (MS<sub>q</sub>)</b>	Oferece um bom compromisso, para fins de quantificação, entre o intervalo de massas abrangidas, reprodutibilidade do espectro de massa, resolução e precisão, a preços razoáveis. Os iões ressonantes com o campo eléctrico criado entre as barrar do quadrupolo (devido à sua $m/z$ ) fluem numa trajetória relativamente linear até ao detector; os não ressonantes são ejetados. Apresenta uma velocidade de varrimento relativamente rápida, actuando como analisadores de massa contínuos o que reduz as perdas.
<b>Armadilha de Iões (MS<sup>n</sup>)</b>	A análise das massas segue os seguintes passos: injeção dos iões no analisador, isolamento dos iões, excitação e análise de massas. Através da aplicação de uma determinada radiofrequência os iões precursores são detidos numa posição estática no analisador e são bombardeados com gás (normalmente hélio) de forma a fragmentarem; os iões filhos são medidos. Têm uma baixa resolução, no entanto são muito úteis para estudos estruturais.
<b>Triplo Quadrupolo (MS/MS)</b>	São constituídos por três quadrupolos (Q), em que o primeiro (Q1) tem a função de analisador, o segundo (Q2) (com a introdução de gás reagente) funciona como câmara de colisões, e o terceiro quadrupolo (Q3) é novamente analisador. Estes analisadores permitem fazer estudos de fragmentação de iões previamente seleccionados, uma vez que tem uma elevada sensibilidade em modo MRM ( <i>multiple-reaction monitoring</i> ).
<b>Analisadores de tempo de voo (TOF)</b>	Os diferentes iões são separados, baseados no princípio que quanto maior for a razão $m/z$ , mais tempo o ião leva para percorrer uma determinada distância. O tempo de voo é proporcional à massa. A principal vantagem é a elevada exactidão em que a massa é medida, além do que não existe limitações teóricas para razão $m/z$ .

A par da sensibilidade, existem outros parâmetros que pesam na decisão por um determinado tipo de analisador de massa, tais como o *intervalo de massa* (definida pelo intervalo da razão  $m/z$ , delimitado pela razão  $m/z$  máxima e mínima que o analisador é capaz de transmitir ao detector de massa), a *velocidade de varrimento* (definida pela habilidade que o analisador tem em fazer o varrimento dos iões num determinado intervalo de massa, quanto maior a velocidade de varrimento, maior o número de dados por unidade de tempo no cromatograma, e consequentemente maior a precisão do sinal), *resolução* (define a habilidade do analisador em separar iões com massas adjacentes, que se reflecte na nitidez dos picos de massa) e *exactidão* (que está estritamente ligada à resolução e expressa a precisão da medição da massa, sendo definida como a diferença entre a massa medida e a massa teórica calculada pela composição elementar do ião) (Politi *et al.*, 2006).

A identificação/quantificação de um determinado analito deve ser feita através da monitorização da transição do ião precursor para ião filho, na medida em que a probabilidade de dois compostos que partilham a mesma razão  $m/z$  do ião precursor, partilharem a mesma razão  $m/z$  do ião filho é extremamente baixa. Os Triplos Quadrupolo (MS/MS) e as Armadilha de Iões ( $MS^n$ ) possuem uma configuração que permite este tipo de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), no entanto devido aos motivos evidenciados na tabela 6, os primeiros são mais apropriados para quantificação podendo operar em diferentes modos, usando os três quadrupolos. A quantificação MS/MS, no caso dos Triplos Quadrupolo, é normalmente feita através da selecção do ião precursor no primeiro quadrupolo (Q1) e a selecção de um ião filho específico no terceiro quadrupolo (Q3) (figura 8). Este tipo de monitorização é designada SRM (*selected reaction monitoring*) ou MRM (*multiple reaction monitoring*) se diferentes reacções forem monitorizadas em simultâneo. O modo SRM é o modo de operar mais selectivo e sensível de um equipamento MS/MS (Politi *et al.*, 2006).



**Figura 8** – Modo de operar SRM do espectrómetro de massa em *tandem* (MS/MS). Selecção do ião precursor no Q1 e a selecção de um ião filho específico no Q3. À direita, o cromatograma do pico resultante da detecção da transição do ião precursor para o ião filho (Politi *et al.*, 2006).

No caso da Armadilha de Iões ( $MS^n$ ), as análises MS/MS podem ser implementadas de forma sequencial no tempo, isto é, o ião precursor é mantido no interior da armadilha, enquanto os outros são injectados, seguidamente uma radiofrequência é aplicada para isolar os iões e excitá-los enquanto são bombardeados com moléculas de hélio, com o objectivo de fragmentá-los; após a fragmentação é aplicada novamente uma radiofrequência para seleccionar o ião filho pretendido e quantificá-lo. Após a conclusão do ciclo outros iões são admitidos para a armadilha de iões e o processo repete-se. Visto ser um analisador de massa pulsado, existe uma perda significativa de sinal entre ciclos, o que piora o seu desempenho na quantificação, relativamente aos analisadores contínuos como os quadrupolo, não sendo tão reprodutíveis com os Triplos Quadrupolo (Politi *et al.*, 2006).

### 3.2 Validação de métodos LC-MS/MS

A introdução dos métodos de LC-MS/MS na toxicologia tem vindo a aumentar, sendo a sua integração em análises de rotina posterior à validação. Os métodos destinados a análises de rotina devem ser devidamente validados para demonstrar de forma objectiva a sua aplicabilidade para um determinado fim. Resultados fiáveis são um pré-requisito para interpretações e avaliações correctas nos trabalhos científicos e análises de rotina. No mundo da ciência, resultados inválidos levam à sobre ou subestimação dos efeitos, a falsas interpretações e a conclusões injustificadas. O uso de métodos analíticos validados é cada vez mais uma condição indispensável, uma vez que os resultados gerados por métodos não validados são desprovidos de qualquer significado e não são reconhecidos pelas autoridades oficiais (Peters, 2006; Peters *et al.*, 2007).

Assim sendo, a validação analítica pode ser considerada como o processo que define os requisitos analíticos e confirma que o método em consideração tem capacidades de desempenho consistentes com determinadas aplicações (Chandran *et Singh*, 2007). Por outras palavras, a validação de um método analítico é um processo sistemático que pretende demonstrar que a metodologia usada é aceitável para a aplicação requerida (Shah *et al.*, 2000; Chandran *et Singh*, 2007).

A metodologia analítica deve ser validada sempre que é necessário verificar se o seu desempenho é adequado para um determinado problema analítico, como por exemplo quando um novo método é desenvolvido para um problema específico, quando um método já estabelecido é alargado a outros propósitos, ou o método já estabelecido é transferido para outro laboratório ou equipamento (Chandran *et Singh*, 2007).

O sucesso do processo de validação implica a existência prévia de um método analítico desenvolvido adequadamente, não sendo possível demarcar o processo de validação de um método analítico das respectivas condições de desenvolvimento, pois são os estudos de validação que determinam se o estado de desenvolvimento do método é satisfatório ou se são requeridas alterações ao procedimento analítico e posterior reavaliação. Geralmente um método bem desenvolvido será fácil de validar, ou seja, os critérios de aceitação dos parâmetros de validação que asseguram a aceitabilidade do método serão certamente cumpridos (Chandran *et Singh*, 2007).

Para os métodos bioanalíticos com fins quantitativos, existe uma concordância geral, que devem ser avaliados os seguintes parâmetros de validação: selectividade, modelo de calibração, estabilidade, exactidão (bias), precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e o limite de quantificação. Existem no entanto outros parâmetros adicionais que também podem ser avaliados como o limite de detecção, recuperação, reprodutibilidade e robustez (Peters, 2006; Peters *et al.*, 2007). A tabela 7 faz uma breve descrição destes parâmetros.

**Tabela 7** – Breve descrição dos parâmetros de validação de métodos analíticos (Peters, 2006; Chandran *et Singh*, 2007).

Parâmetros	Descrição
<b>Especificidade</b>	Habilidade para medir um determinado analito numa matriz complexa.
<b>Exactidão</b>	Proximidade entre o valor medido e o valor real.
<b>Precisão</b>	Proximidade entre uma serie de medidas consecutivas.
<b>Modelo de calibração</b>	Proporcionalidade dos valores medidos com a concentração.
<b>Gama de aplicação</b>	Intervalo de concentrações onde o método é preciso, exacto e se ajusta ao modelo de calibração.
<b>Limite de quantificação</b>	Quantidade mais pequena do analito que pode ser medida ou quantificada.
<b>Limite de detecção</b>	Quantidade mais pequena do analito que pode ser detectada.
<b>Robustez</b>	Capacidade do método de permanecer inalterado perante pequenas alterações nos parâmetros.
<b>Reprodutibilidade</b>	Expressa a precisão entre laboratórios, equipamentos ou operadores diferentes.
<b>Recuperação</b>	Indicador de eficiência de extracção do processo analítico.



## 4. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

### 4.1 Amostragem

Para este estudo foram recolhidas amostras de músculo de tunídeos (atuns) com periodicidade semanal, nos principais supermercados da zona do Funchal, durante a sua época de captura. A recolha de amostras iniciou-se no mês de Abril visto ter sido nesta altura que aumentou o volume de descargas de tunídeos na Lota do Funchal. A tabela 8 sumariza as 194 amostras recolhidas por mês de recolha e por superfície comercial. De modo a manter a confidencialidade, as superfícies comerciais foram designadas pelas letras do alfabeto.

Antes dos tunídeos entrarem no circuito comercial, foram igualmente recolhidas 20 amostras de atum a bordo das embarcações de pesca e 12 amostras na Lota do Funchal.

Todas as amostras recolhidas pertenciam à espécie de *Thunnus obesus*, localmente conhecido como Patudo.

Após as recolhas, as amostras foram imediatamente armazenadas a  $-30^{\circ}\text{C}$ , até serem analisadas.

Estava ainda prevista a recolha de 50 amostras de atum conservado no Entrepasto Frigorífico do Funchal, que não se realizou devido a uma avaria no equipamento de LC-MS/MS.

**Tabela 8** - Resumo do número de amostras de músculo de tunídeos colhidas por data de recolha e por superfície comercial.

Mês	Supermercado							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Abril	2	3	1	3	1	2	2	1
Maio	5	4	5	4	5	4	5	4
Junho	4	4	5	4	4	5	5	4
Julho	4	5	4	5	4	4	5	5
Agosto	6	4	3	4	6	4	4	4
Setembro	2	2	1	4	4	4	3	4
Outubro	1	1	0	0	2	3	3	3

## 4.2 Reagentes e Solventes

Para a execução dos ensaios experimentais conducentes ao desenvolvimento e validação do método analítico foram empregues os padrões de aminas, cujas características se encontram descritas na tabela 9. Na tabela 10 estão resumidos os solventes e reagentes utilizados neste estudo.

**Tabela 9** – Caracterização dos padrões das aminas biogénicas e do padrão interno utilizados para o desenvolvimento e validação do método.

Aminas	Formula Molecular	pKa	Massa molecular teórica	Massa do ião protonado	Classificação
Histamina	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	9,7	111,15	112,08	Heterocíclica com anel aromático
Cadaverina	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	9,13	102,18	103,12	Diamina alifática
Tiramina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	9,74	137,18	138,09	Aromática
Triptamina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	10,2	160,10	161,10	Heterocíclica com anel aromático
Espermina	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub>	8-10,8	202,34	203,22	Poliamina alifática
Heptilamina (padrão interno)	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> N	10,66	115,22	116,14	Monoamina alifática

**Tabela 10** – Solventes, padrões e reagentes utilizados para o desenvolvimento e validação do método.

Químico	Grau de pureza	Fornecedor
Acetonitrilo	LC-MS Chromasolv <sup>®</sup> ≥99.9%	Sigma-Aldrich, Fluka
Metanol	LC-MS Chromasolv <sup>®</sup> , ≥99.9%	Sigma-Aldrich, Fluka
Ácido Fórmico	puriss. p.a., aditivo para LC-MS, ~98% (T)	Sigma-Aldrich, Fluka
Formato de Amónio	puriss. p.a., para MS, ≥99.0%	Sigma-Aldrich, Fluka
Amónia	puriss. p.a., aditivo para LC-MS, ≥25% em H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Fluka
Ácido Clorídrico	puriss. p.a., ≥37%	Sigma-Aldrich, Fluka
Ácido Nítrico	puriss. p.a., 65%	Merck
Água Ultrapura	18,2 Ω, Sistema MilliQ Gradient	Millipore
Histamina	>97%	Sigma-Aldrich
Cadaverina	>97%	Fluka
Tiramina	>97%	Acros Organics
Triptamina	>98%	Acros Organics
Espermina	>97%	Acros Organics
Heptilamina (padrão interno)	>99,5%	Fluka
Hélio	>99,9999%	Air liquide

### 4.3 Método analítico para determinação de aminas biogénicas em tunídeos

#### 4.3.1 Preparação das soluções mãe dos padrões das aminas

Para cada padrão foram preparadas soluções mãe, em ácido clorídrico 0,1 M, a 1000 mg/L, que foram conservadas a  $-30^{\circ}\text{C}$ , em alíquotas de 5 mL. A preparação de soluções de trabalho foi efectuada através de diluições apropriadas das soluções mãe de acordo com as concentrações pretendidas, sendo as mesmas preparadas no próprio dia da análise.

#### 4.3.2 Preparação das amostras

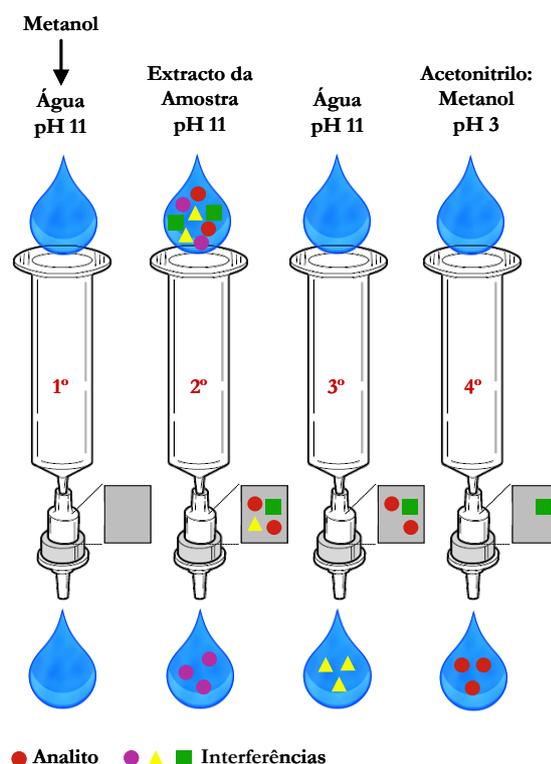
O procedimento de tratamento das amostras foi delineado em duas etapas: uma primeira etapa correspondente à extracção das aminas da matriz biológica sólida (músculo de tunídeos) para a fase líquida e uma segunda etapa correspondente à purificação dos extractos obtidos por extracção em fase sólida (SPE), sendo depois os extractos finais analisados no equipamento de LC-MS/MS.

##### 4.3.2.1 Extracção das aminas biogénicas da matriz biológica

De forma genérica, dadas as semelhanças da matriz (alimentos sólidos com alto teor de gordura), foi seguido o protocolo de extracção descrito para o queijo de Gianotti *et al.* (2008), que utiliza como solvente de extracção o ácido clorídrico a 0,1 M. Assim sendo, a extracção das aminas das amostras de tunídeos envolveu a homogeneização da amostra de pescado num moinho (marca IKA, modelo A11) e consequente pesagem de 6 g (balança da marca A&D, modelo GR-202-EC) do homogeneizado da amostra para um Falcon<sup>®</sup> de 50 mL; às quais foram adicionados 25 mL de uma solução de ácido clorídrico a 0,1 M contendo já o padrão interno (heptilamina) a uma concentração de 100 mg/L. Esta mistura foi homogeneizada (homogeneizador marca Polytron, modelo PT 3100D) durante 7 minutos a 13 500 rpm e posteriormente centrifugada (centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5810R) a 4500 rpm durante 20 minutos. De forma a solidificar a gordura superficial característica deste tipo de amostras, o Falcon<sup>®</sup>, contendo a mistura, foi colocado no congelador (marca Liebherr) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos. Após este procedimento, foram removidos 2 mL do sobrenadante para outro Falcon<sup>®</sup> de 50 mL e adicionados 18 mL de água com pH ajustado a 11 com amónia a 25%. Esta nova mistura foi agitada num vortex (marca Vortex, modelo Genie 2), ajustado o pH a 11 com amónia a 25% e novamente centrifugada a 4500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante (extracto da amostra) obtido foi reservado.

#### 4.3.2.2 Isolamento dos analitos por SPE

Com o objectivo de reduzir o efeito da matriz biológica, os extractos obtidos pelo processo descrito na secção 4.3.2.1 ou os padrões utilizados na curva de calibração foram purificados usando a metodologia SPE, cujo procedimento, foi executado num sistema de vácuo *manifold* (marca Waters) com uma pressão constante de 15 mm Hg (bomba de vácuo marca KNF). O procedimento encontra-se esquematizado na figura 9, sendo o volume de 3 mL para todos os solventes adicionados aos cartuchos.



**Figura 9** – Metodologia SPE utilizada para a purificação da amostra; 1º activação do cartucho, 2º eluição da amostra, 3º eliminação das interferências e 4º eluição dos analitos.

Para o procedimento de SPE utilizou-se cartuchos Sep-Pak® tC<sub>18</sub> (Waters), sendo a eluição dos analitos realizada com uma solução de acetoneitrilo:metanol (1:1) a pH 3 (ajustado com ácido fórmico).

### 4.3.3 Análise por LC-MS

#### 4.3.3.1 Equipamentos

A separação dos analitos, para o desenvolvimento e validação da metodologia analítica para a determinação de aminas biogénicas em amostras de tunídeos, foi efectuada num sistema LC da Dionex (Germering, Alemanha) UltiMate 3000 equipado com uma bomba LPG-3400M, um

sistema de injeção automática WPS-3000TSL e um forno de colunas TCC-3000. A separação foi efectuada usando uma coluna de interacção hidrofílica Atlantis<sup>®</sup> HILIC Silica 3,0  $\mu\text{m}$  2,1 mm x 150 mm (Waters), protegida por uma pré-coluna Atlantis<sup>®</sup> HILIC 3,0  $\mu\text{m}$  2,1 x 10 mm alojada num suporte para pré-colunas Sentry<sup>™</sup> 2,1 mm. A temperatura do sistema de injeção automático e do forno de colunas foi mantida constante, a 4°C e 30°C respectivamente, durante todo o processo de desenvolvimento e validação do método e análise das amostras.

A fase móvel era constituída por 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico). O tempo da corrida, em modo isocrático, teve a duração de 10 minutos, com um fluxo de 0,4 mL/min.

A detecção e análise de massa foi realizada, em modo MRM, num espectrómetro de marca da Bruker (Bremen, Alemanha) modelo Esquire 6000, com uma fonte de ionização ESI, com um analisador de massa de armadilha de iões e com um detector dínodo de conversão com multiplicador de iões. A gama de trabalho operada foi de 50-250  $m/z$ , em modo positivo.

A gestão e interligação das componentes LC e MS foi feita através dos softwares Dionex DCMS<sup>Link</sup> 2.5.1 e HyStar<sup>™</sup> 3.2 (Bruker Daltonics). Para o processamento dos dados utilizou-se o software DataAnalysis<sup>™</sup> 3.4 (Bruker Daltonics).

#### 4.3.3.2 *Calibração das massas*

Com o objectivo de efectuar a calibração do espectrómetro de massa com as massas das aminas biogénicas utilizadas neste trabalho, foi preparada uma solução, em 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónio 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), com uma mistura a 20 mg/L de todos os padrões (histamina, cadaverina, tiramina e triptamina), inclusive o padrão interno (heptilamina). A solução preparada foi filtrada (com filtros Nalgene<sup>®</sup> com um poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ) e injectada directamente no espectrómetro de massa, com um fluxo constante de 4  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

#### 4.3.3.3 *Lavagem do sistema LC*

Uma vez que o sistema LC está sujeito a vários tipos de amostras, é prudente antes de iniciar uma nova utilização, efectuar uma limpeza ao sistema com o fim de evitar a acumulação de tampão e precipitação das amostras, nas juntas, nas válvulas ou na linha de injeção. Assim sendo, antes de se iniciar os ensaios experimentais, foi adoptado o protocolo de limpeza descrito por McMaster (2005), que inclui a passagem de ácido nítrico a 20%, com um fluxo de 2 mL/min durante 30 minutos no sistema LC sem coluna, desligado do espectrómetro de massa; seguido da passagem de água a 2 mL/min durante 1 hora ou mais até o pH da água que sai do sistema LC deixar de ser ácido.

#### 4.3.3.4 Solventes de lavagem

De acordo com as recomendações da Waters para a coluna Atlantis HILIC, foram preparadas para a lavagem das válvulas da câmara de mistura das fases móveis (*seal*) e da agulha do sistema de injeção, as respectivas soluções:

- ✓ solução de acetonitrilo:água numa proporção 10:90;
- ✓ solução de acetonitrilo:água numa proporção 50:50;

Após a sua preparação as soluções foram filtradas (com filtros Nalgene® com um poro de 0,2 µm), antes de serem inseridas nos devidos recipientes do sistema LC.

#### 4.3.3.5 Acondicionamento da coluna

Dado que na recepção da coluna Atlantis HILIC, esta veio acondicionada em 100 % de acetonitrilo, foi necessário proceder ao seu acondicionamento nas condições da fase móvel em uso, seguindo o procedimento descrito pela Waters para este tipo de coluna (Waters, 2007). Desta forma após a conexão da coluna com o sistema LC-MS, equilibrou-se 50 vezes o volume da coluna (0,5 mL) com acetonitrilo:água com 10 mM de tampão formato de amónia a pH 3 (ajustado com ácido fórmico) (numa relação 50:50), o que é equivalente a um fluxo de 0,3 mL/min durante aproximadamente 1 hora e 20 minutos. Antes de se iniciar as injeções procedeu-se ao equilíbrio da coluna com 20 vezes o seu volume com a fase móvel em uso, equivalente a um fluxo de 0,3 mL/min durante aproximadamente 35 minutos.

### 4.3.4 Parâmetros de validação

O método de LC-MS/MS desenvolvido para a determinação de aminas biogénicas em tunídeos foi validado através da avaliação de alguns parâmetros analíticos, tal como o ajuste do modelo de calibração, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), limite de quantificação, limite de detecção e percentagem de recuperação. O procedimento de validação teve sempre em conta o equilíbrio entre os custos e possibilidades técnicas.

#### 4.3.4.1 Curva de calibração e gama de concentrações

A selecção de um modelo apropriado é fundamental para uma quantificação fiável. Normalmente o uso de modelos de calibração lineares é preferível do ponto de vista prático, contudo o uso de modelos não lineares é não só aceitável como também mais recomendado, devido ao efeito de supressão iónica (Peters, 2006). A curvatura surge como consequência do limite de resposta dependente do efeito de supressão iónica na fonte de ionização. Entretanto este efeito pode ser compensado até um determinado ponto pela razão analito/padrão interno, uma vez que quando o processo de ionização se aproxima da saturação dá-se uma diminuição

proporcional da ionização do padrão interno que equilibra as perdas de ionização do analito (Kronstand *et Josefsson*, 2006).

Por outro lado, a gama dinâmica é o intervalo onde existe uma correlação entre a concentração e a intensidade do sinal. O equipamento utilizado e o método seleccionado são determinantes para definir essa gama de resposta quantitativa. Geralmente as armadilhas de iões tem uma gama mais limitada que os quadrupolos, devido fundamentalmente à medição descontínua de iões (Kronstand *et Josefsson*, 2006).

Neste sentido, uma vez que se previa a aplicação de um modelo não linear dado o equipamento utilizado e à gama alargada de concentrações (0,5 até 230 mg/L), foi programada uma matriz com 12 diferentes concentrações para os quatro padrões de aminas biogénicas. A tabela 11 sumariza as concentrações dos padrões utilizados nas diferentes soluções preparadas. Cada solução foi preparada em triplicado com a excepção da solução 3, 8 e 9 que foram preparadas em quintuplicado. Após a preparação das soluções em ácido clorídrico 0,1 M, foi aplicado o mesmo tratamento que as amostras, isto é, foram diluídas na proporção de 1:9 em água com pH ajustado a 11 com amónia a 25% e extraídas por SPE, conforme o protocolo descrito na secção 4.3.2.2.

**Tabela 11** – Concentrações (mg/L), dos padrões de aminas biogénicas utilizadas para elaborar a curva de calibração (P.I. – padrão interno).

Solução	Histamina	Cadaverina	Tiramina	Triptamina	Heptilamina (P.I.)
1	160,42	130,03	30,01	10,01	10
2	10,03	160,03	100,04	60,07	10
3	1,00	200,04	130,05	5,01	10
4	5,01	230,05	60,02	30,03	10
5	30,08	10,00	160,06	130,14	10
6	60,16	60,01	230,09	1,00	10
7	0,50	30,01	200,08	100,11	10
8	200,52	0,50	0,50	160,17	10
9	100,26	5,00	1,00	230,25	10
10	130,34	1,00	5,00	200,22	10
11	230,60	100,02	10,00	0,50	10
12	145,38	145,03	145,06	145,16	10

A análise do ajuste dos dados ao modelo seleccionado, foi elaborada através do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), que deverá ser próximo de 1, e do gráfico de resíduos, no qual os resíduos deverão ter uma distribuição aleatória. Os resíduos são calculados através da seguinte equação matemática:

$$e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_j,$$

onde  $e_{ij}$  representa o resíduo de  $i$  ao nível da concentração  $j$ ,  $y_{ij}$  é o valor observado de  $i$ , no nível de concentração  $j$  e  $\hat{y}_j$  é o esperado de  $i$  ao nível de concentração  $j$ , sendo  $e_{ij}$  que deve andar próximo de zero (Peters, 2006).

#### 4.3.4.2 Limite de quantificação e de detecção

O limite de quantificação é definido com sendo a mais pequena quantidade de analito numa amostra que pode ser quantitativamente determinada com adequada precisão e exactidão. Por outro lado o limite de detecção é definido como sendo a menor concentração do analito na amostra que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada como um valor exacto. Abaixo do limite de quantificação o método pode produzir apenas dados semiquantitativos (Peters, 2006).

Desta forma, os limites de quantificação e de detecção para cada amina biogénica foram avaliados por uma das formas aceites e descritas por Chandran *et Singh* (2007), em que o limite de quantificação é calculado pela multiplicação do desvio padrão das concentrações esperadas para a concentração mais baixa (calculadas com base na equação da curva obtida) por 10; por sua vez o limite de detecção é calculado pela multiplicação do desvio padrão das concentrações esperadas para a concentração mais baixa por 3.

#### 4.3.4.3 Precisão

A precisão descreve a proximidade entre uma série de medições obtidas repetidamente a uma amostra homogénea e pode ser expressa em três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (Shah *et al.*, 2000; Peters, 2006).

Uma vez que a reprodutibilidade reporta a precisão entre laboratórios e só pode ser estudada se o método for aplicado a diferentes laboratórios (Shah *et al.*, 2000; Peters, 2006), não foi objecto de estudo neste trabalho.

A repetibilidade, por outro lado, expressa a precisão sob as mesmas condições de variação dentro de um curto intervalo de tempo, igualmente designada de precisão intraensaios, podendo ser descrita pela variação dos valores dentro do mesmo dia (Shah *et al.*, 2000; Peters, 2006). Neste caso em particular a repetibilidade foi estudada a 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto), relativamente à histamina, tendo-se para tal preparado a solução 3, 8 e 9 em quintuplicado.

Por sua vez a precisão intermédia, que expressa as variações dentro do laboratório em diferentes dias (Shah *et al.*, 2000; Peters, 2006), foi analisada através da preparação de um ponto intermédio da curva, relativamente à histamina, a solução 9 durante 4 dias consecutivos.

A precisão reflecte a distribuição dos resultados analíticos em redor do valor médio correspondente e é avaliada pelo coeficiente de variação (CV), com a seguinte equação matemática:

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

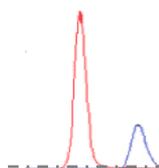
Segundo várias recomendações internacionais a precisão deve estar abaixo dos 15%, sendo dada uma tolerância até os 20% para os níveis mais baixos de concentração que incluem o limite de detecção (Shah *et al.*, 2000; Peters, 2006).

#### 4.3.4.4 Recuperação

A recuperação de um analito é um indicador da eficiência de extracção do processo analítico, expressa como a percentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras fortificadas com padrão, com os resultados analíticos de amostras não fortificadas, ambas submetidas ao processo de extracção (Peters, 2006).

As amostras biológicas devido à sua composição intrínseca são submetidas a processos de preparação mais ou menos complexos para eliminar possíveis interferências e extrair os analitos em condições adequadas à análise instrumental. Todas estas etapas conduzem a perda inevitável de analitos, sendo por isso importante estimar a capacidade de recuperação destes a partir da matriz biológica. Os ensaios de recuperação consistem em sujeitar ao procedimento analítico global, amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, sendo o processo tanto mais exacto quanto mais próximo de 100% se situar a relação entre a quantidade de analito adicionada e a quantidade de analito recuperada (Fernandes, 2001). No entanto recuperações acima dos 50% são suficientes para proporcionar uma boa sensibilidade e precisão (Kronstrand *et* Josefsson, 2006).

A recuperação dos analitos a partir das amostras de músculo de tunídeos foi estudada através da comparação da razão analito/padrão interno de duas amostras fortificadas com uma concentração de 50 mg/L para as quatro aminas biogénicas (histamina, cadaverina, tiramina e triptamina), com as mesmas não fortificadas.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA LC-MS/MS

### 5.1 Optimização dos parâmetros de LC-MS/MS

O desenvolvimento de um método quantitativo de LC-MS/MS, como qualquer outro método cromatográfico, requer a optimização de vários parâmetros, sendo por isso um processo demorado e dispendioso (Taylor, 2006).

Actualmente, o LC-MS/MS é considerada uma técnica de referência em toxicologia, uma vez que a elevada selectividade da espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) conduz praticamente à inexistência de interferências, mesmo na presença de concentrações relativamente elevadas de compostos co-eluídos, pelo que permite identificações com elevado, se não total, grau de confiança (Taylor, 2006).

Na generalidade, a quantificação de compostos envolve cinco etapas, nomeadamente amostragem, preparação das amostras, separação, detecção e análise dos dados. Dada a interdependência destas etapas, principalmente ao que se refere a interligação LC e MS, o processo de desenvolvimento de um método LC-MS/MS é um processo interactivo, na medida em que, na maior parte das vezes, quando uma determinada etapa está optimizada torna-se necessário re-optimizar a anterior (Taylor, 2006).

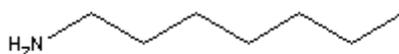
Numa primeira abordagem, com o intuito de reduzir os recursos necessários ao desenvolvimento de uma metodologia, considerou-se como ponto de partida a informação experimental proveniente da metodologia descrita por Gianotti *et al.* (2008). Neste sentido tentou-se adaptar a metodologia descrita à matriz biológica em questão (músculo de tunídeos), que entretanto não resultou, exigindo um ajustamento, alteração e optimização de diversos parâmetros que serão descritos na continuidade do texto.

#### 5.1.1 Importância e selecção do padrão interno

O padrão interno é regra geral utilizado em métodos quantitativos de LC-MS/MS como forma de compensar as diferenças entre análises, resultantes fundamentalmente da eficiência da extracção, da repetibilidade das injeções ou da eficiência da ionização. A selecção adequada do padrão interno constitui uma decisão difícil, mas vital para o sucesso da metodologia (Taylor, 2006).

Existem três tipos de padrões internos passíveis de serem utilizados em métodos de LC-MS/MS: (i) analitos marcados com isótopos estáveis ( $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  ou  $^2\text{H}$ ), (ii) análogos estruturais dos analitos ou (iii) outros compostos químicos. Apesar dos primeiros serem os mais recomendados, dado terem a mesma eficiência de extracção e de ionização e co-eluírem com o

analito, para o desenvolvimento deste trabalho não se decidiu por esta opção, visto este tipo de padrões serem muito mais dispendiosos, difíceis de obter e ser necessário um padrão interno para cada analito. A segunda opção pareceu-nos mais favorável do ponto de vista prático e económico. Neste sentido foi seleccionada a heptilamina (figura 10) com base nas suas semelhanças estruturais às aminas biogénicas que se pretendiam trabalhar e em referências bibliográficas, nomeadamente Millán *et al.* (2007). A heptilamina é uma monoamina alifática com características carcinogénicas e neurotóxicas para os humanos.



**Figura 10** – Estrutura da heptilamina.

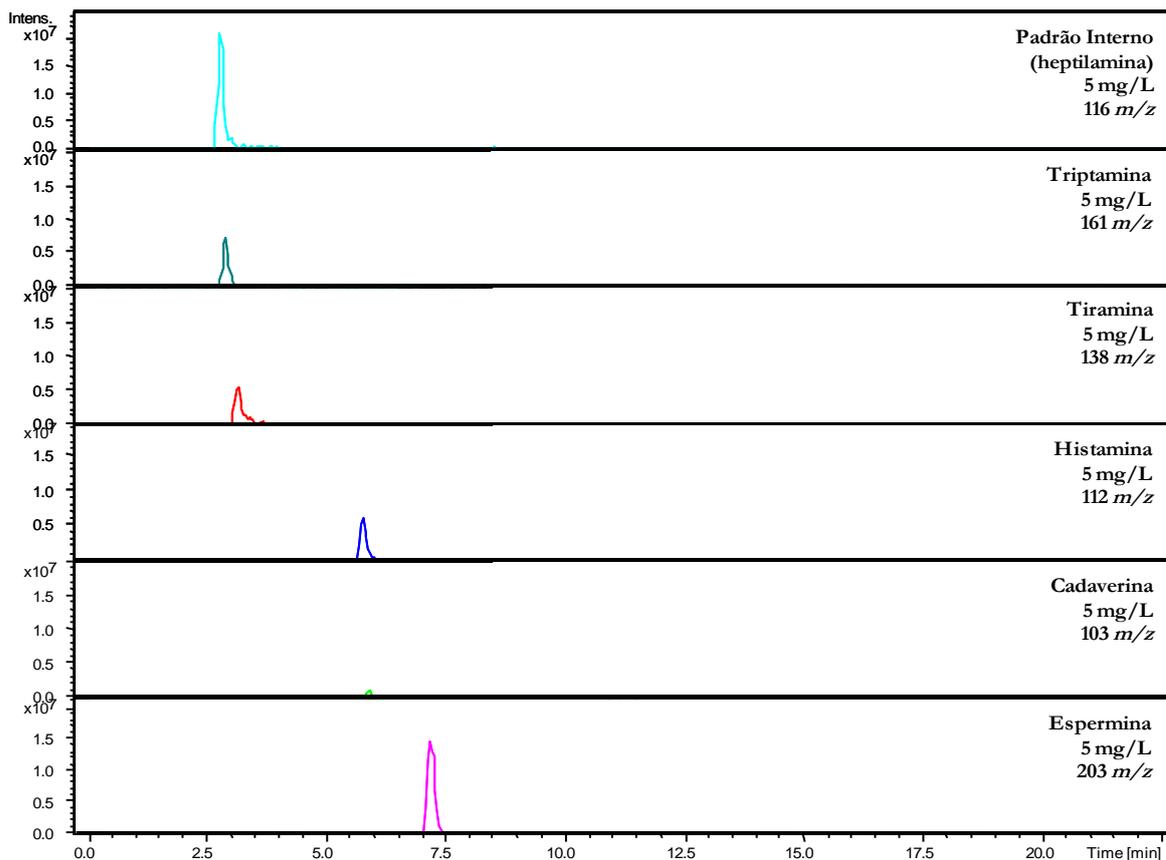
Para a optimização da concentração do padrão interno foram preparadas duas soluções distintas em acetonitrilo:metanol (1:1) com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), variando a concentração de heptilamina e mantendo as concentrações dos outros padrões (histamina, cadaverina, tiramina e triptamina):

- ✓ solução com 5 mg/L de heptilamina e 5 mg/L dos restantes padrões;
- ✓ solução com 10 mg/L de heptilamina e 5 mg/L dos restantes padrões.

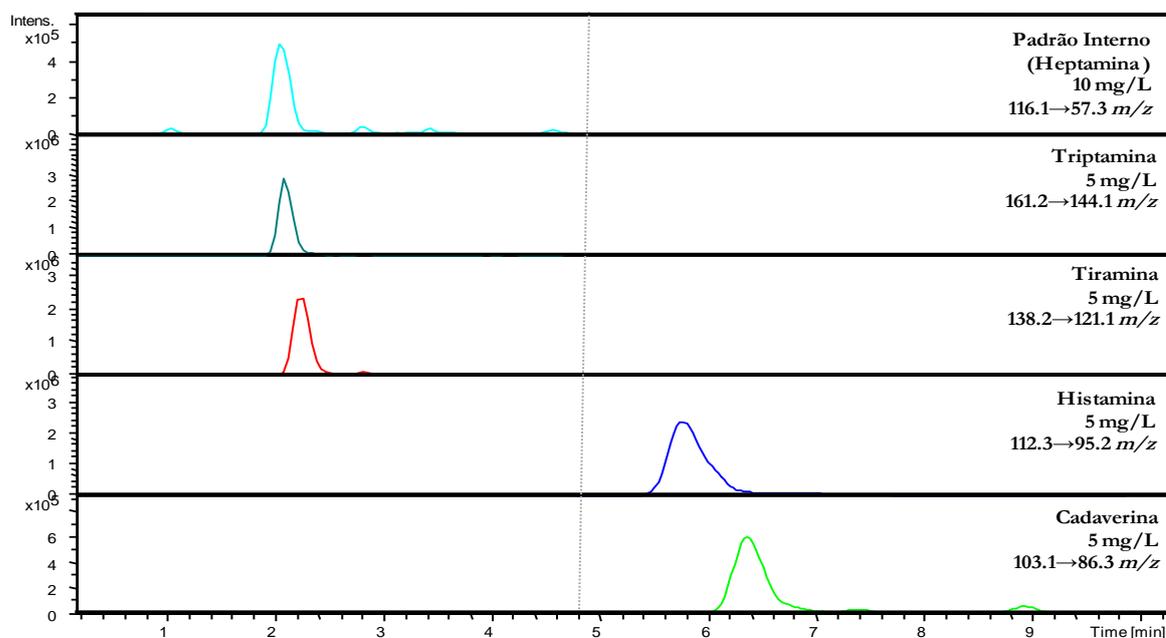
Após a sua preparação, as soluções foram filtradas e inseridas em *vials*, onde foram mantidas a 4°C até serem injectadas.

Apesar de em modo de varrimento a heptilamina ter uma intensidade de sinal óptima, até mesmo muito superior às outras aminas em estudo (figura 11), quando se passava para a fragmentação a intensidade do sinal diminuía significativamente, optando-se assim pela utilização da concentração final de 10 mg/L como base para o modo MRM (*multiple reaction monitoring*) (figura 12). Não foram ensaiadas concentrações mais elevadas visto que se pretendia reduzir ao máximo o efeito de supressão iónica que concentrações elevadas do padrão interno poderiam causar na ionização das outras aminas quantificadas neste estudo.

Para compensar as eventuais perdas, a adição do padrão interno às amostras ou aos padrões de aminas foi efectuada no início do tratamento da amostra ou da preparação das soluções. Deste modo a proporcionalidade da intensidade do sinal das aminas biogénicas em relação a uma determinada concentração é dada em termos de áreas relativas, que corresponde à razão da intensidade do sinal da amina biogénica/intensidade do sinal do padrão interno (analito/P.I.).



**Figura 11** – Cromatogramas iônicos extraídos (EIC) dos padrões das aminas em estudo, em modo varrimento, utilizando o programa de eluição descrito na tabela 13. O volume da injeção foi de 5  $\mu$ L.



**Figura 12** – Cromatogramas iônicos extraídos (EIC) dos padrões das aminas biogénicas, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma mistura de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5  $\mu$ L.

## 5.1.2 Tratamento da amostra

### 5.1.2.1 Purificação das amostras utilizando a metodologia SPE

Previamente à utilização da metodologia SPE com extractos de amostras e padrões para a validação do método, descrito na secção 4.3.4.1, as condições da extracção foram optimizadas. Numa primeira abordagem seguiu-se o protocolo descrito por Gianotti *et al.* (2008), em que se utilizava os cartuchos Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters), no entanto verificou-se que estes não resistiam aos pHs (3 e 11) utilizados no procedimento. Deste modo, optou-se por usar os cartuchos Sep-Pak<sup>®</sup> tC<sub>18</sub> (Waters) que suportavam a gama de pHs utilizados no procedimento SPE.

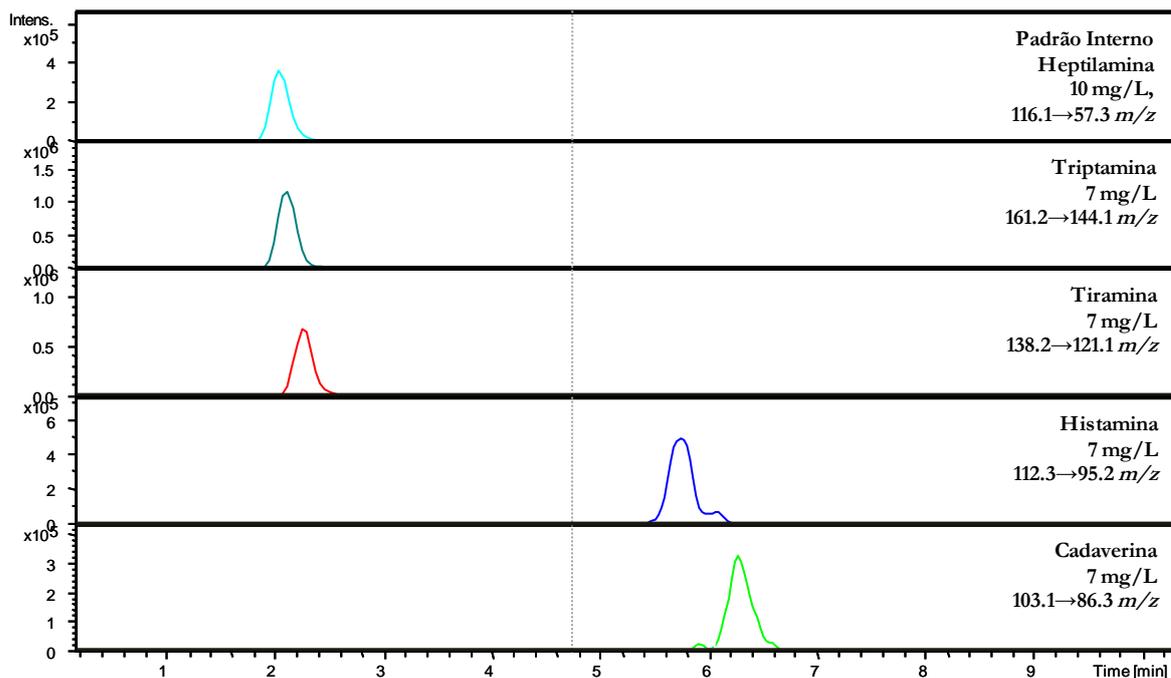
Tendo por base as recomendações da Waters (MacDonald, 2001) para os cartuchos Sep-Pak<sup>®</sup> tC<sub>18</sub>, foi optimizado o volume dos eluentes e a proporção de acetonitrilo:metanol da solução de eluição dos analitos. As hipóteses testadas encontram-se descritas na tabela 12.

**Tabela 12** – Hipóteses de eluição para os cartuchos Sep-Pak<sup>®</sup> tC<sub>18</sub> (Waters) testadas para a optimização do procedimento SPE.

Eluentes	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>6</sub>
Metanol	5 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	3 mL
Água (pH 11)	5 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	3 mL
Extracto da amostra (pH 11)	5 mL	2 mL	2 mL	2 mL	3 mL	3 mL
Água (pH 11)	5 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	3 mL
Acetonitrilo:Metanol (pH 3)	5 mL (70:30)	2 mL (20:80)	2 mL (50:50)	2 mL (70:30)	3 mL (50:50)	3 mL (50:50)

Durante a optimização da extracção por SPE, foi utilizada uma solução teste, em ácido clorídrico 0,1 M, constituída por uma mistura de padrões (histamina, cadaverina, tiramina e triptamina) a 70 mg/L e o padrão interno (heptilamina) a 100 mg/L. Depois de preparada a solução foi diluída na proporção de 1:9 em água com pH ajustado a 11 com amónia a 25%, sendo, por sua vez, o pH da solução resultante ajustado a 11 com amónia a 25%. Esta solução com pH 11 foi utilizada como extracto na metodologia SPE.

Após estes ensaios, ficou estabelecido que a purificação dos extractos das amostras e dos padrões utilizados na curva de calibração, de acordo com o procedimento estabelecido na figura 9 (secção 4.3.2.2), seguiria as condições definidas pela hipótese 6 da tabela 12. Na figura 13 estão exemplificados os cromatogramas obtidos para as aminas em estudo utilizando as condições seleccionadas.



**Figura 13** – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) obtidos pela análise, em modo MRM, do extracto de SPE dos padrões das aminas biogénicas (hipótese 6 da tabela 12), utilizando como fase móvel uma mistura de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5  $\mu$ L.

### 5.1.3 Componente LC

#### 5.1.3.1 Fase móvel

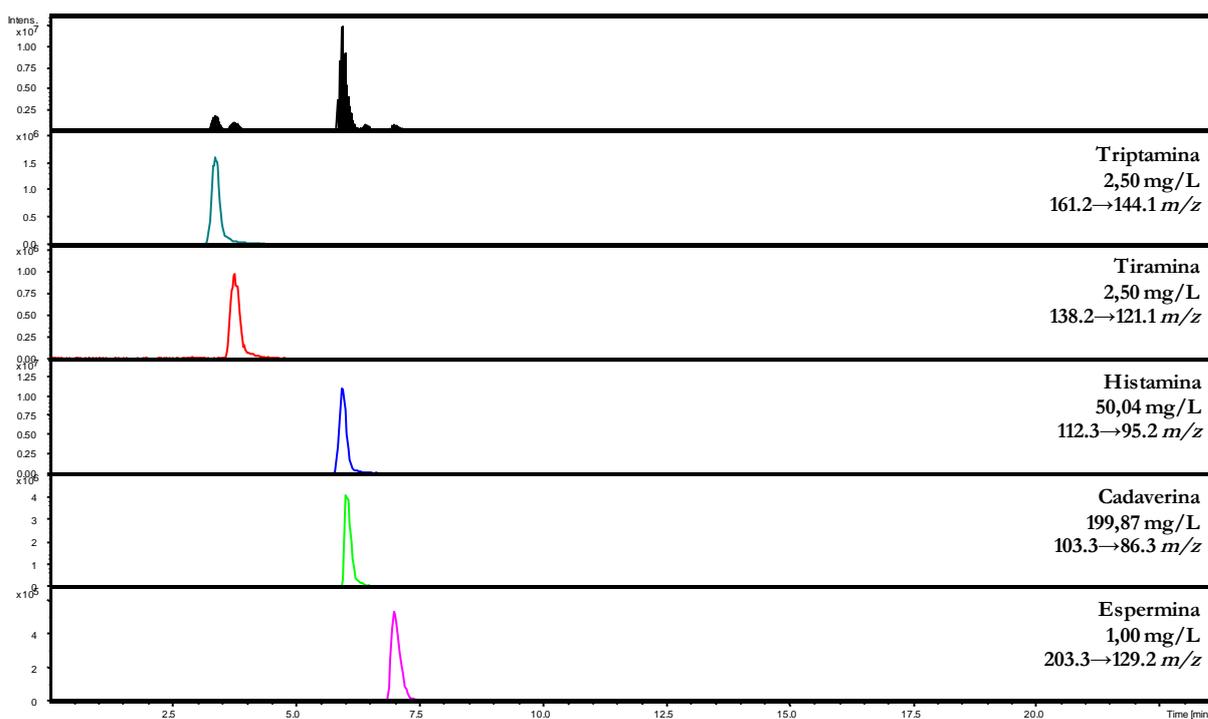
Numa primeira abordagem e numa tentativa de aplicar o método descrito por Gianotti *et al.* (2008), foi aplicado o programa de eluição descrito na tabela 13. Seguidamente, uma vez que não se obteve sinal, foi testado o mesmo programa com a diferença do pH do tampão formato de amónia 50 mM, que passou a ser 3 (ajustado com ácido fórmico). A figura 14 exemplifica os cromatogramas obtidos para as cinco aminas biogénicas inicialmente previstas pelo método de Gianotti *et al.* (2008).

De modo a aumentar a percentagem de fase orgânica e diminuir a concentração de tampão na fonte de ionização, assim como manter um fluxo constante durante toda a corrida, foi elaborado um novo programa de eluição descrito na tabela 14.

Apesar de com estas alterações se ter encurtado o tempo de análise, este continuava a ser excessivo para análises de rotina e não respeitava as recomendações da Waters para a coluna em uso, no que concerne ao tempo de equilíbrio da coluna nas condições iniciais após a eluição dos compostos (que é no mínimo 10 vezes o volume da coluna) e na concentração máxima total do tampão na fase móvel (que deve ser no máximo de 10 mM).

**Tabela 13** – 1º Programa de eluição testado, descrito por Gianotti *et al.* (2008).

Tempo (min)	Acetonitrilo (%)	Tampão Formato de Amônia 50 mM pH 4 (%)	Fluxo (mL/min)
0	80	20	0,270
0,5	80	20	0,270
7	5	95	0,320
9	5	95	0,320
18	80	20	0,320
23	80	20	0,270



**Figura 14** – Cromatograma iônico total (TIC) e cromatogramas iônicos extraídos (EIC) dos padrões das aminas biogênicas, em modo MRM, utilizando o programa de eluição descrito na tabela 13, usando o tampão formato com pH 3.

**Tabela 14** – 2º Programa de eluição testado.

Tempo (min)	Acetonitrilo (%)	Tampão Formato de Amónia 50 mM pH 4 (%)	Fluxo (mL/min)
0	80	20	0,300
0,5	80	20	
7	20	80	
10	20	80	
12	80	20	
18	80	20	

Numa segunda fase, com o objectivo de reduzir o tempo de análise, mantendo 2 intervalos de tempo bem resolvidos (no primeiro são eluídos a tiramina, a triptamina e a heptilamina; no segundo a histamina e a cadaverina) e reduzir a variabilidade entre injeções resultante das variações na mistura dos dois componentes da fase móvel e do fluxo inconsistente, assim como aumentar ao máximo a eficiência de ionização com o aumento da percentagem de fase orgânica e diminuir o efeito de supressão iónica causado pelas concentrações excessivas de tampão, optou-se por uma abordagem isocrática.

Para o desenvolvimento do método LC em modo isocrático e com o objectivo de manter a concentração total de tampão de 10 mM na fase móvel, conforme recomendado, foram elaborados ensaios com as seguintes fases móveis:

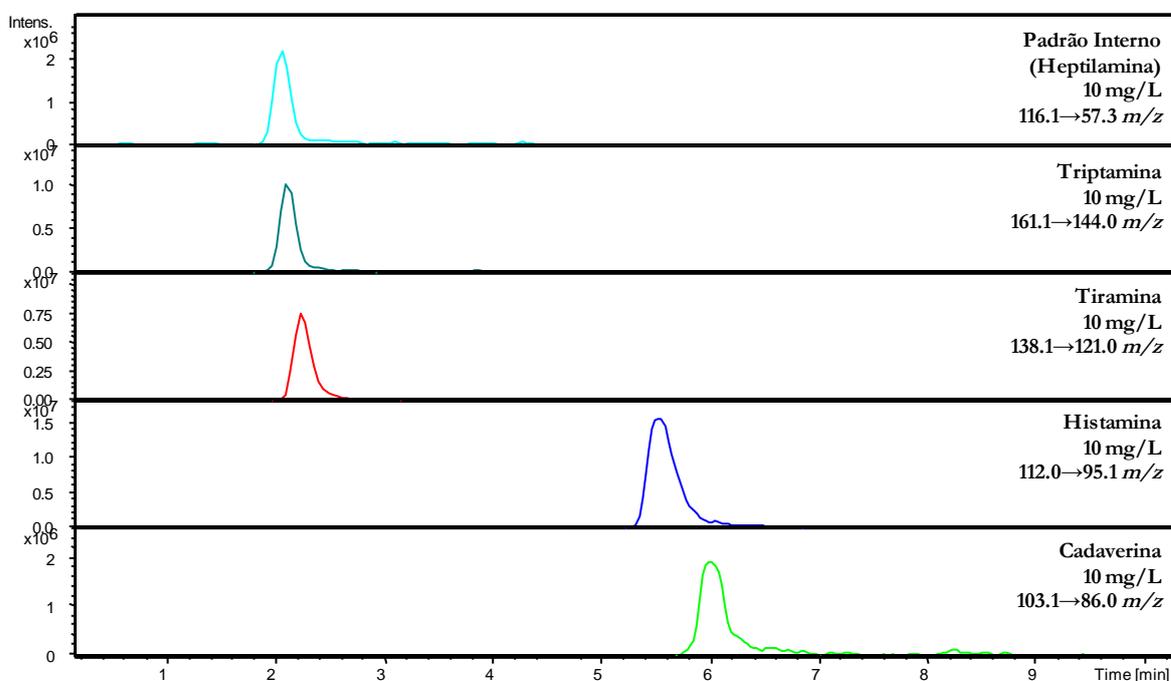
- ✓ 95% de acetonitrilo e 5% de tampão formato de amónia a 200 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico);
- ✓ 80% de acetonitrilo e 20% de tampão formato de amónia a 50 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico);
- ✓ 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico);

Antes de serem inseridas no sistema LC, todas as fases móveis preparadas foram filtradas através de filtros com um poro de 0,45 µm e desgaseificadas. De igual forma antes de se iniciar o fluxo da fase móvel foi efectuada uma purga com a fase móvel em uso. Após estes procedimentos, e previamente à injeção de uma solução de ensaio, a coluna foi deixada a acondicionar num volume de 5 mL (10 vezes o volume da coluna: 0,5 mL), com a fase móvel em uso. Depois de aferida a composição em percentagem da fase móvel, foi ainda optimizado o fluxo.

No entanto, a passagem para o método isocrático levantou alguns problemas com a espermina, na medida em que ficava retida na coluna; para que a sua eluição ocorresse era necessário aumentar o tempo e a percentagem aquosa da fase móvel, o que poderia comprometer o desempenho e o tempo de vida da coluna, para além de prejudicar a ionização dos analitos na fonte de ionização. Como se pretendia o desenvolvimento de um método relativamente rápido, a opção foi a eliminação deste padrão no método de quantificação de amins biogénicas, dado que a sua quantificação tinha apenas um carácter indicativo, na medida em que, não apresenta efeitos secundário conhecidos e a sua concentração diminui com a evolução da deterioração do pescado.

A solução de teste para estes ensaios em modo isocrático, foi então constituída por todos os padrões das amins biogénicas (histamina, cadaverina, tiramina e triptamina) a 10 mg/L, incluindo o padrão interno, em acetonitrilo:metanol (1:1) com pH 3 (ajustado com ácido fórmico).

Após a realização destes estudos, ficou estabelecido que a composição da fase móvel, em modo isocrático, mais adequada para a eluição dos compostos em 2 intervalos de tempo bem resolvidos, era a de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), com um fluxo de 0,4 mL/min. As novas condições estabelecidas para a análise das quatro amins biogénicas e do padrão interno, permitiram que a corrida apresentasse uma duração de 10 minutos (figura 15).



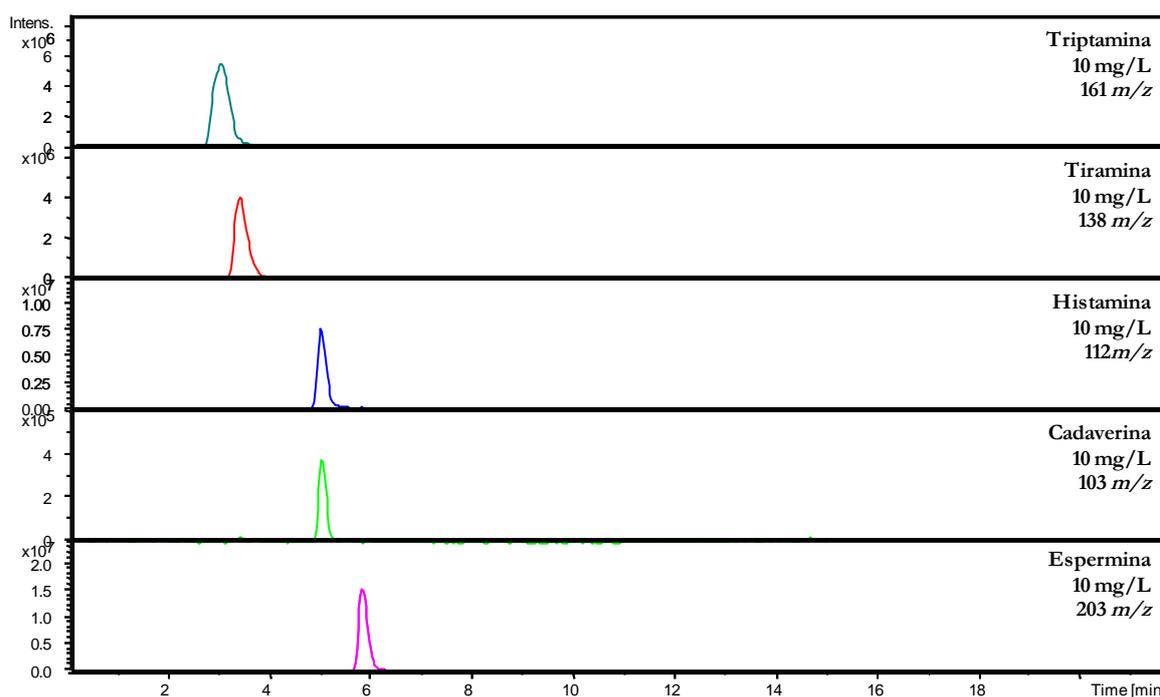
**Figura 15** – Cromatogramas iónicos extraídos (EIC) dos padrões de amins biogénicas, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma solução de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL.

### 5.1.3.2 Volume de injeção

Com o objectivo de aferir o volume de injeção mais adequado, preparou-se uma solução com uma mistura de padrões (histamina, cadaverina, tiramina, triptamina e espermina) a 10 mg/L em acetonitrilo:metanol (1:1) com pH 3 (ajustado com ácido fórmico). Após preparação, a solução foi filtrada e inserida num *vial* para ser analisada. Foram testados os volumes de injeção de 1, de 2 e de 5  $\mu\text{L}$ . Com base na resolução dos picos obtidos, no menor coeficiente de variação entre injeções e na maior relação sinal-ruído (S/N) de cada ião (tabela 15), concluiu-se que o volume de 5  $\mu\text{L}$  seria a melhor opção (figura 16). Uma vez que estes ensaios ocorreram antes da passagem para o modo isocrático, incluiu-se a espermina, utilizando o programa de eluição descrito na tabela 13.

**Tabela 15** – Coeficientes de variação (CV) e razões sinais/ruído (S/N) para diferentes volumes de injeção de cada amina biogénica.

Amina Biogénica	Massa do ião protonado	1 $\mu\text{L}$		2 $\mu\text{L}$		5 $\mu\text{L}$	
		CV (%)	S/N Médio	CV (%)	S/N Médio	CV (%)	S/N Médio
Triptamina	161	3,92	268,2	5,76	361,9	1,54	390,1
Tiramina	138	1,72	257,9	5,21	311,3	1,21	337,8
Histamina	112	2,39	617,1	4,04	916,8	1,83	1236,9
Cadaverina	103	6,47	17,1	12,03	31,4	4,32	53,3
Espermina	203	2,88	311,1	7,60	681,0	1,27	1387,8



**Figura 16** – Cromatogramas iônicos extraídos (EIC) obtidos dos padrões das aminas biogénicas, em modo varrimento, utilizando o programa de eluição descrito na tabela 13 e um volume da injeção de 5  $\mu$ L.

### 5.1.3.3 Tempo de retenção

Com o objectivo de estabelecer o tempo de retenção de cada composto e obter o respectivo espectro de massa, a aquisição de dados foi realizada em modo de varrimento, numa gama de massas de 50 a 250  $m/z$ . Para o efeito foi preparada uma solução a 10 mg/L de todos os padrões (histamina, cadaverina, tiramina e triptamina), incluindo o padrão interno, em acetonitrilo:metanol (50:50) com pH 3 (ajustado com ácido fórmico).

O estabelecimento dos tempos de retenção permitiu a definição de dois grupos de compostos (1º grupo de 0 a 4,8 minutos: heptilamina, tiramina e triptamina; 2º grupo de 4,8 a 10 minutos: histamina e cadaverina) separados no tempo, conforme apresentado nos cromatogramas iônicos extraídos da figura 15.

## 5.1.4 Componente MS

### 5.1.4.1 Condições de ionização

Com vista a obter um sinal estável e com a maior intensidade possível, optimizou-se alguns parâmetros da fonte ESI, tais como: a temperatura, o fluxo de gás, a pressão e a voltagem aplicada no início e no fim do capilar. Para a optimização destes parâmetros foram preparadas

duas soluções distintas, cada uma delas, com os padrões que eluíam dentro do mesmo intervalo de tempo.

A primeira solução, correspondente ao primeiro intervalo de tempo, foi preparada numa concentração de 20 mg/L de cada padrão (tiramina, triptamina e heptilamina), em 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónio 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico).

A segunda solução, correspondente ao segundo intervalo de tempo, foi preparada também numa concentração de 20 mg/L de cada padrão (histamina e cadaverina), em 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónio 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico).

Após a sua preparação, as soluções foram filtradas e injectadas individualmente (com um fluxo de 4  $\mu$ L/min), directamente no espectrómetro de massa, com o fim de otimizar as condições de ionização para os dois intervalos de tempo definidos nos estudos prévios de eluição dos padrões (secção 5.1.3.3).

Apesar das condições de ionização, para cada grupo estabelecido de compostos, terem sido optimizadas individualmente foram idênticas para os dois intervalos de tempo, estando definidas na tabela 16.

**Tabela 16** – Condições de ionização optimizadas para a fonte ESI, a operar em modo positivo.

Parâmetros	Valores optimizados
<i>Capillary</i>	- 3 800 V 1 nA
<i>End Plate Offset</i>	- 500 V 3 nA
<i>Nebulizer</i>	50.0 psi
<i>Dry Gas</i>	10.0 L/min
<i>Dry Temp</i>	365 °C
<i>Skimmer</i>	40.0 V
<i>Cap Exit</i>	102.3 V
<i>Oct 1 DC / Oct 2 DC / Oct RF</i>	12.00 V / 1.70 V / 68.5 Vpp
<i>Trap Drive</i>	27.9
<i>Lens 1 /Lens 2</i>	- 5.0 V / - 60.0 V

#### 5.1.4.2 Condições de fragmentação

De forma a aferir as melhores condições de fragmentação para obter um melhor rendimento da fragmentação do ião precursor para um determinado ião filho e assim ter uma maior intensidade de sinal desta transição, foram preparadas soluções idênticas ao anteriormente descrito (secção 5.1.4.1) para os dois intervalos de tempo definidos (secção 5.1.3.3). As condições de fragmentação optimizadas para cada transição encontram-se discriminadas na tabela 17.

#### 5.1.4.3 Quantificação em modo MRM

Uma vez estabelecidas as condições de separação cromatográfica e tendo como objectivo a quantificação dos compostos em análise, a aquisição de dados foi realizada em modo MRM (*multiple reaction monitoring*), para os dois grupos de iões diferenciados no tempo.

Na tabela 17 estão definidas as transições monitorizadas do ião precursor para o ião filho, em cada intervalo de tempo, utilizadas para a quantificação das aminas em estudos, assim como as condições fragmentação optimizadas. De referir que dadas as limitações do equipamento utilizado (uma armadilha de iões) não foi possível monitorizar mais do que três transições por intervalo de tempo definido, o que impossibilitou a determinação de mais aminas biogénicas.

**Tabela 17** – Programa de aquisição de dados em modo MRM utilizado para a quantificação das aminas em estudo, assim como as condições fragmentação para cada intervalo.

Intervalo de tempo (min)	Amina	Transições MRM (m/z)	Condições de fragmentação		
			Massa	CutOff	Amplitude
0 – 4,8	Heptilamina (P. I.)	116.1→57.3	116.1±1.0	45	0.85
	Triptamina	161.1→144.0	161.1±1.0	45	0.60
	Tiramina	138.1→121.0	138.1±1.0	50	0.90
4,8 - 10	Histamina	112.0→95.1	112.0±1.2	77	0.80
	Cadaverina	103.1→86.0	103.1±1.2	64	1.05

## 6. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA LC-MS/MS

### 6.1 Curvas de calibração

Tal como era esperado, devido à alargada gama de concentrações (0,5 – 230 mg/L), os dados obtidos mostraram um melhor ajuste a um modelo de regressão não linear, um modelo quadrático. A avaliação do ajuste dos dados ao modelo quadrático, para cada padrão, foi efectuada através da construção de curvas de calibração (figura 17), da análise dos coeficientes de correlação e dos gráficos de resíduos (figura 18).

Na tabela 18 estão discriminadas as equações das curvas e os coeficientes de correlação ( $r^2$ ), assim como a gama de concentrações da sua aplicação, para cada uma das quatro aminas utilizadas neste estudo. No caso da histamina, com o objectivo de obter um melhor ajuste para a gama de concentrações mais baixa (1-30 mg/L) foram utilizadas duas equações de regressão, conforme discriminado na tabela 18. De forma geral, os coeficientes de correlação obtidos foram sempre superiores a 0,987, tendo-se obtido para alguns padrões valores superiores a 0,999, o que representa um bom ajuste dos dados ao modelo de calibração aplicado.

**Tabela 18** – Curvas de calibração da triptamina, da tiramina, da histamina e da cadaverina.

Amina Biogénica	Gama de concentrações (mg/L)	Equação da regressão	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )
Triptamina	1,9 - 230	$y = -0,00005x^2 + 0,04242x + 0,03246$	0,999
Tiramina	3,2 - 230	$y = -0,00002x^2 + 0,01935x + 0,03399$	0,999
Cadaverina	11,8 - 230	$y = -0,00001x^2 + 0,00982x + 0,05837$	0,999
Histamina	1 - 30	$y = -0,00058x^2 + 0,06390x + 0,08010$	0,990
	30 - 230	$y = -0,00008x^2 + 0,03400x + 0,23563$	0,987

Por outro lado, a análise dos gráficos de resíduos demonstra que o modelo quadrático aplicado é adequado, visto que a distribuição dos resíduos, para as quatro aminas biogénicas quantificadas, é, de forma geral, aleatória em torno do zero, não mostrando nenhuma tendência (figura 18).

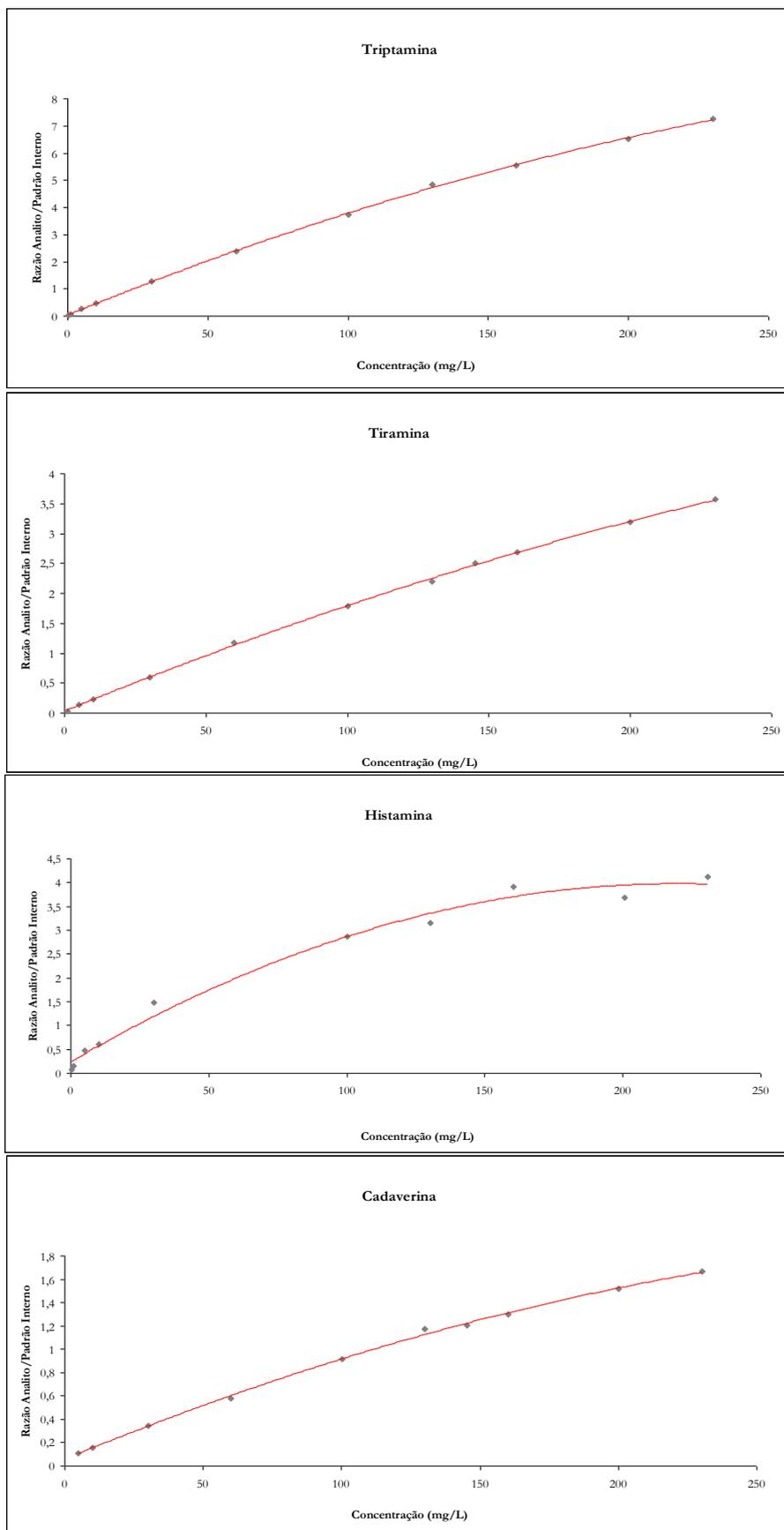


Figura 17 – Regressão não linear da triptamina, da tiramina, histamina e cadaverina.

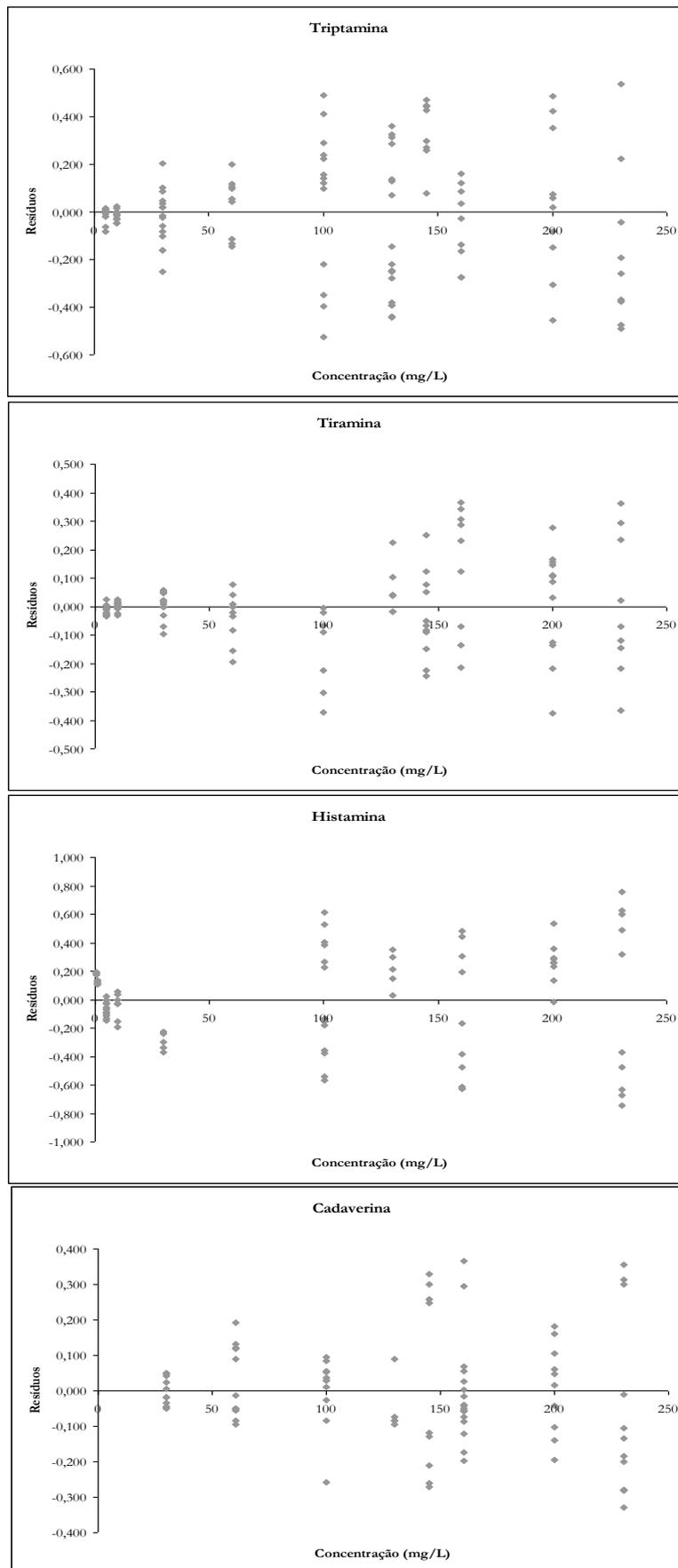


Figura 18 – Gráfico dos resíduos da triptamina, da tiramina, histamina e cadaverina.

## 6.2 Limites de quantificação e de detecção

Os limites de quantificação e de detecção, determinados segundo as condições descritas na secção 4.3.4.2, encontram-se descritos na tabela 19. Os limites de quantificação situaram-se entre os 0,922 mg/L (histamina) e 11,811 mg/L (cadaverina), enquanto que os limites de detecção situaram-se entre 0,277 mg/L (histamina) e 3,543 mg/L (cadaverina).

**Tabela 19** – Limites de quantificação e detecção para a triptamina, a tiramina, a histamina e a cadaverina.

Amina Biogénica	Gama de concentrações (mg/L)	Limite de Quantificação (mg/L)	Limite de Detecção (mg/L)
Triptamina	1,9 - 230	1,89	0,57
Tiramina	3,2 - 230	3,16	0,95
Cadaverina	11,8 - 230	11,81	3,54
Histamina	1 - 230	0,92	0,28

## 6.3 Precisão

A precisão foi avaliada a dois níveis, através da repetibilidade e da precisão intermédia.

A repetibilidade, por sua vez, foi avaliada através da percentagem do coeficiente de variação para três níveis de concentrações relativamente à histamina, dada a relevância da sua quantificação. Contudo, a tabela 20 apresenta também a repetibilidade para os outros padrões de aminas biogénicas presentes nas soluções 3, 8 e 9 (tabela 11, secção 4.3.4.1). No global, os coeficientes de variação foram iguais ou inferiores a 15%, conforme o recomendado, com a excepção da repetibilidade para o nível mais baixo da histamina que excedeu ligeiramente esse valor, sendo 16%, mas manteve-se abaixo da tolerância de 20% dada para os níveis mais baixos de concentração.

No que respeita a precisão intermédia, esta foi estudada para a solução 9 ao longo de 4 dias. A tabela 21 resume a informação utilizada para determinar a precisão intermédia, que variou entre 10% (tiramina) e 17% (cadaverina). Este último situa-se acima dos 15%, contudo como foi determinada a uma concentração (5,00 mg/L) próxima ao limite de detecção (3,54 mg/L) e inferior ao limite de quantificação (11,81 mg/L) tem uma tolerância até aos 20%.

**Tabela 20** – Repetibilidade para três soluções utilizadas nas curvas de calibração das quatro aminas biogénicas (tabela 11, secção 4.3.3.1).

Amina Biogénica	Solução 3		Solução 8		Solução 9	
	Conc. (mg/L)	CV (%)	Conc. (mg/L)	CV (%)	Conc. (mg/L)	CV (%)
Triptamina	5,01	3	160,17	13	230,25	14
Tiramina	130,05	4	<0,95	-	1,00	11
Histamina	1,00	16	200,52	5	100,26	11
Cadaverina	200,04	11	<3,54	-	5,00	15

**Tabela 21** – Precisão intermédia para a solução 9 (tabela 11, secção 4.3.3.1).

Amina Biogénica	Conc. (mg/L)	Dia 1 CV (%)	Dia 2 CV (%)	Dia 3 CV (%)	Dia 4 CV (%)	Precisão intermédia CV (%)
Triptamina	5,01	10	9	14	5	13
Tiramina	130,05	19	11	10	14	10
Histamina	1,00	5	6	4	10	12
Cadaverina	200,04	2	4	3	7	17

#### 6.4 Percentagem de recuperação

Os ensaios de recuperação efectuados com amostras fortificadas com uma concentração de 50 mg/L, evidenciaram resultados acima dos 60%, o que de certa forma comprova a eficiência do processo extractivo. A tabela 22 apresenta os resultados desses ensaios.

**Tabela 22** – Percentagem de recuperação para as quatro aminas biogénicas deste trabalho.

Amina Biogénica	Recuperação $\pm$ Desvio Padrão (%)
Triptamina	75 $\pm$ 5
Tiramina	96 $\pm$ 16
Histamina	60 $\pm$ 4
Cadaverina	63 $\pm$ 6

De salientar o facto de que os melhores resultados (75% para triptamina e 96% para a tiramina) foram para as aminas eluídas conjuntamente com o padrão interno, no primeiro intervalo de tempo (0 – 4,8 minutos), o que vem evidenciar a importância do padrão interno para compensar as diferenças ocorridas na fonte de ionização. De acordo com o recomendado por Peters (2006), a utilização de um segundo padrão interno que co-elui-se com as aminas que saem no segundo intervalo de tempo, teria melhorado não só a recuperação destas aminas como também os outros parâmetros utilizados na validação do método dependentes destas.

## 7. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM AMOSTRAS DE TUNÍDEOS

Tal como afirmado anteriormente na introdução, o desenvolvimento da metodologia analítica descrito nas secções anteriores, teve como principal objectivo a sua aplicação no estudo das aminas biogénicas presentes em amostras de tunídeos recolhidas ao longo do ano e em diversos pontos de recolha, tal com especificado na secção 4.1. Os resultados obtidos, pela metodologia desenvolvida, para os teores de histamina, cadaverina, tiramina e triptamina são apresentados na tabela 23. As amostras foram analisadas em duplicado, sendo para cada duplicado efectuadas 5 injeções consecutivas. A título de exemplo nas figuras 20 e 21 encontram-se os cromatogramas iónicos extraídos obtidos das amostras colhidas a 17 de Abril e 1 de Maio dos supermercados B e H, respectivamente.

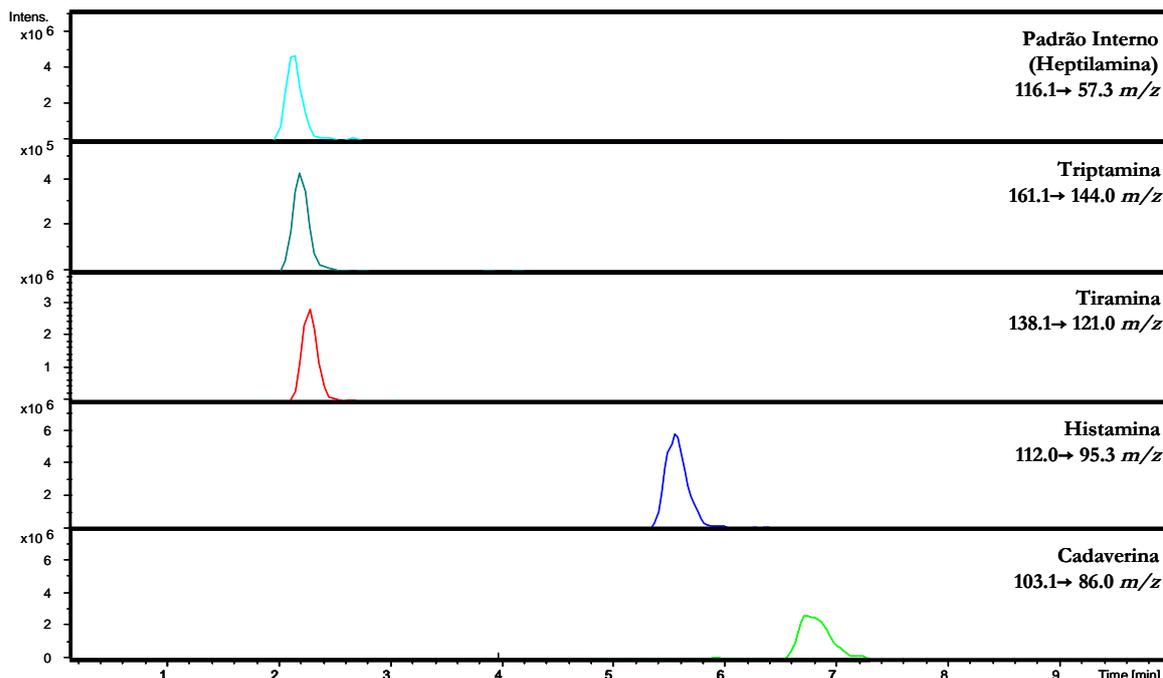
**Tabela 23** – Resultados obtidos (média  $\pm$  desvio padrão) para a determinação de histamina, cadaverina, tiramina e triptamina em amostras de músculo de tunídeos, recolhidos em vários supermercados da zona do Funchal.

Supermercado	Data Colheita	Concentração (mg/kg)			
		Histamina	Cadaverina	Tiramina	Triptamina
B	17-04-2009	98,94 $\pm$ 1,00	12,24 $\pm$ 0,32	121,77 $\pm$ 1	69,88 $\pm$ 0,58
F	22-04-2009	76,06 $\pm$ 3,83	12,18 $\pm$ 0,61	33,42 $\pm$ 0,75	11,90 $\pm$ 0,48
A	22-04-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
C	22-04-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
B	29-04-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	29-04-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
H	01-05-2009	53,97 $\pm$ 0,86	22,35 $\pm$ 0,29	132,78 $\pm$ 1,15	49,90 $\pm$ 1,68
G	07-05-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	12-05-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
C	13-05-2009	8,70 $\pm$ 0,43	< 11,81	34,25 $\pm$ 0,69	< 1,89
G	14-05-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
E	15-05-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
C	19-05-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	16-06-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
A	10-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
B	13-07-2009	1,26 $\pm$ 0,16	< 11,81	3,79 $\pm$ 0,59	< 1,89
D	13-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
C	14-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
G	22-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	22-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
A	24-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
B	28-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
G	28-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	29-07-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89

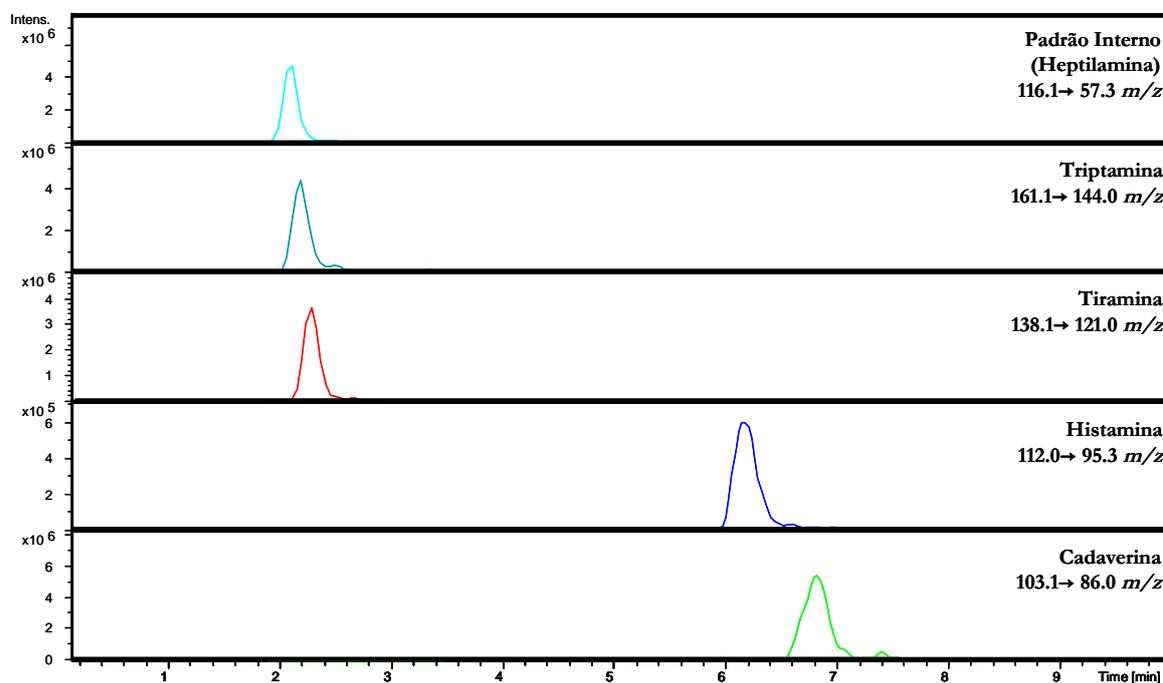
**Tabela 23** – Continuação.

Supermercado	Data Colheita	Concentração (mg/kg)			
		Histamina	Cadaverina	Tiramina	Triptamina
G	03-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
B	03-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	03-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
C	05-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
A	07-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
F	07-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	10-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
C	11-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
E	14-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
H	14-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
A	14-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	20-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
F	20-08-2009	< 0,92	< 11,81	6,01±0,95	< 1,89
E	20-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
G	20-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
A	21-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
H	21-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
B	21-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
G	25-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
B	25-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	25-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
H	27-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
A	27-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
F	29-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
C	29-08-2009	3,41±0,07	< 11,81	3,27±0,46	< 1,89
E	29-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
E	31-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
G	31-08-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
H	01-09-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
A	01-09-2009	38,38±0,47	18,20±0,28	114,77±2,70	2,63±0,02
F	03-09-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
D	04-09-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
B	17-09-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
G	17-09-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89
E	17-09-2009	< 0,92	< 11,81	< 3,16	< 1,89

**Nota:** os valores apresentados precedidos do sinal < dizem respeito ao limite de quantificação determinado para a amina biogénica em causa.



**Figura 19** – Cromatogramas iônicos extraídos (EIC) obtidos da amostra recolhida a 17 de Abril no supermercado B, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma mistura de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL.



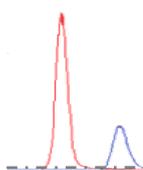
**Figura 20** – Cromatogramas iônicos extraídos (EIC) obtidos da amostra recolhida a 1 de Maio no supermercado H, em modo MRM, utilizando com fase móvel uma mistura de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), a um fluxo de 0,4 mL/min. O volume da injeção foi de 5 µL.

Da leitura dos resultados podemos salientar os seguintes aspectos:

- ✓ os teores de histamina encontrados não ultrapassam o limite de 100 mg/kg propostos pelo Regulamento (CE) N. 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007;
- ✓ os teores totais das aminas biogénicas quantificados não ultrapassam o limite máximo de 300 mg/kg sugerido pela Comunidade Europeia (CE);
- ✓ a grande maioria (cerca de 87%) das amostras analisadas não apresentou teores quantificáveis para as quatro aminas determinadas; para estes resultados poderá ter contribuído, muito provavelmente, o facto de o atum na Madeira ter muita procura quando fresco, sendo facilmente escoado das superfícies comerciais, pelo que no final do dia muito raramente se encontrava atum à venda;
- ✓ os teores de aminas biogénicas encontrados que ultrapassam as 10 mg/kg constam principalmente de amostras recolhidas nos meses de Abril e Setembro, que correspondem aos meses em que se deu o início e fim da época intensiva de captura de tunídeos, altura em que o número de dias de pesca é em média superior aos outros meses e consequentemente o tempo entre a captura e a venda ao público é maior.

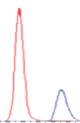
Embora estivesse previsto a análise de um total de 276 amostras, tal como discriminado na secção 4.1, uma avaria ocorrida no equipamento de LC-MS/MS limitou o número a 59 amostras analisadas.

Dada a pequena dimensão da amostragem e a ausência de teores quantificáveis em cerca de 87% das amostras analisadas, não foi possível estabelecer as correlações entre as concentrações das aminas biogénicas nas amostras analisadas com os pontos de amostragens e as épocas do ano.



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

---



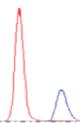
A identificação e quantificação de aminas biogénicas é fundamental, não só do ponto de vista da sua toxicidade, mas também como indicadores do grau de frescura e degradação do pescado, das condições de pesca e, no caso das conservas, da qualidade da matéria-prima. A metodologia LC-MS/MS desenvolvida permite uma identificação e quantificação de quatro aminas biogénicas em menos de 10 minutos, sendo a preparação dos extractos para análise relativamente simples, envolvendo a extracção das aminas do músculo de tunídeos com ácido clorídrico e a purificação dos extractos obtidos através de SPE.

No decorrer do desenvolvimento da metodologia optimizaram-se alguns parâmetros e condições experimentais tais como: as condições de ionização e fragmentação, o volume de injeção, o fluxo e a composição da fase móvel, o tipo de cartuchos, a metodologia SPE associada e o padrão interno.

Após a realização dos estudos de optimização, ficou estabelecido que a composição da fase móvel, em modo isocrático, mais adequada para a eluição dos compostos em 2 intervalos de tempo bem resolvidos (1º intervalo de 0 a 4,8 minutos: heptilamina, tiramina e triptamina; 2º intervalo de 4,8 a 10 minutos: histamina e cadaverina), era a de 70% de acetonitrilo e 30% de tampão formato de amónia a 33,33 mM com pH 3 (ajustado com ácido fórmico), com um fluxo de 0,4 mL/min. No que se refere, à optimização da metodologia SPE, foram utilizados os cartuchos Sep-Pak® tC<sub>18</sub>, sendo o volume dos eluentes optimizado de 3 mL e a proporção de acetonitrilo:metanol com pH 3, para eluição dos analitos, de 1:1. O volume de injeção estabelecido foi de 5 µL. A selecção do padrão interno (heptilamina), assim como a concentração utilizada (100 mg/L), teve em conta o compromisso entre os resultados obtidos, os custos e as possibilidades técnicas.

Com o fim de comprovar a obtenção de resultados tecnicamente válidos e comparáveis, a metodologia desenvolvida foi validada através da avaliação de alguns parâmetros analíticos, tal como o ajuste do modelo de calibração, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), limite de quantificação, limite de detecção e percentagem de recuperação.

A análise do modelo de comportamento dos dados, através dos coeficientes de correlação e dos gráficos dos resíduos, foi conivente com a aplicação de modelos quadráticos para as quatro aminas. Relativamente à precisão, esta foi avaliada a dois níveis, repetibilidade e precisão intermédia, através do estudo dos coeficientes de variação que se manifestaram iguais ou inferiores a 15%, com a excepção dos níveis mais baixos de concentração, que se mantiveram abaixo da tolerância de 20% para concentrações mais baixas. Dadas as características do analisador de massa utilizado, uma armadilha de iões, e à alargada gama de concentrações definida, de 0,5 a 230 mg/L, os limites de quantificação situaram-se entre os 0,922 mg/L (histamina) e 11,811 mg/L (cadaverina), enquanto os limites de detecção situaram-se entre 0,277



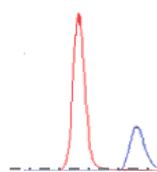
mg/L (histamina) e 3,543 mg/L (cadaverina). No que se refere à eficiência do processo extractivo, esta foi comprovada pelas percentagens de recuperação acima dos 60%.

Atendendo aos resultados obtidos nos ensaios de validação, a metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à análise das amostras de tunídeos recolhidas em diferentes estabelecimentos comerciais, no decorrer da época intensiva de captura dos atuns e afins.

Os teores totais de aminas biogénicas, e mais especificamente os teores de histamina, encontrados não ultrapassaram, respectivamente, o limite máximo de 300 mg de aminas totais por kg de músculo sugeridos pela Comunidade Europeia (CE), e o limite de 100 mg de histamina por kg de músculo proposto pelo Regulamento (CE) N. 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007. Sendo que 87% das 59 amostras analisadas não apresentaram teores quantificáveis para as quatro aminas determinadas. Estes resultados vêm de encontro à ausência de vestígios de histamina documentada por alguns autores (tabela 3) em pescado conservado em condições adequadas. Globalmente, as amostras analisadas apresentaram uma boa qualidade no que respeita à presença de aminas biogénicas, facto para o qual poderá ter contribuído a melhoria das condições das embarcações de pesca, a implementação de sistemas de controlo de qualidade nas lotas da Região e nos postos de venda, assim como a maior celeridade entre a captura e a chegada ao consumidor final.

O passo seguinte na evolução deste trabalho, seria dar continuidade à análise das amostras recolhidas, assim como reforçar as amostragens a bordo das embarcações e à entrada e saída da lota. Por outro lado, seria igualmente interessante alargar o campo de amostragem à indústria conserveira e a outro tipo de pescado normalmente implicado em intoxicações alimentares, como é o caso da cavala (*Scomber japonicus*). Esta evolução permitiria a avaliação dos pontos críticos do percurso do pescado que contribuem para a produção de aminas biogénicas, facilitando assim políticas de intervenção, na medida em que teríamos uma caracterização, em termos de aminas biogénicas, do pescado consumido na zona do Funchal. Esta caracterização tornar-se-ia útil, do ponto de vista da Saúde Pública, uma vez que proporcionaria a oportunidade de correlacioná-la com as ocorrências de intoxicações alimentares associadas à ingestão do pescado.

Outro aspecto a aperfeiçoar futuramente, seria a substituição do tipo de analisador de massa utilizado, armadilha de iões, por um triplo quadrupolo, mais adequado para a quantificação, o que possibilitaria a análise em simultâneo de um maior número de aminas, para além de alargar a gama de concentrações e melhorar os limites de quantificação e detecção.



BIBLIOGRAFIA

Ababouch L., Afilal M. E., Rhafiri S., Busta F. F. (1991). Identification of histamine-production bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25 °C). *Food Microbiology* **8** (2):127-136.

Anderson A. K. (2008). Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets. *Food Chemistry* **107**:761-767.

Barker J. (1998). Mass spectrometry. John Wiley & Sons. 509 p.

Branco P. M. S. C. (2007). Aplicação da técnica de HPLC-ESIMS<sup>n</sup> ao estudo de extractos de origem vegetal. *Dissertação de mestrado*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa. 54 p.

Brinker C., Kerr M., Rayner C. (2002). Investigation of biogenic amines in fish and fish products. *Victorian Government Department of Human Services*. Edition 1. 17 p.

Chandran S., Singh R. S. P. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie* **62**:4-14.

Chen H. C., Huang Y. R., Hsu H. H., Lin C. S., Chen W. C., Lin C. M., Tsai Y. H. (2010). Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. *Food Control* **21**:13-18.

Chu C. H., Bjeldanes L. F. (1981). Effect of Diamines, Polyamines and Tuna Fish Extracts on the Binding of Histamine to Mucin In Vitro. *Journal of Food Science* **47**(1):79-88.

Fernandes J. O. (2001). Desenvolvimento de metodologias de cromatografia gasosa – espectrometria de massa para a determinação de amins biogénicas em vinhos do Porto e em mostos. *Dissertação de doutoramento*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto. 494 p.

Flick G. J., Granata L. A. (2005). Biogenic Amines in Foods. In: Dabrowski W. M., Sikorski Z. E. (Eds.). Toxins in Food. *Chemical and Functional Properties of Food Components Series*. CRC Press. 121-154 p.

Gionotti V., Chiuminatto U., Mazzucco E., Gossetti F., Bottaro M., Frascarolo P., Gennaro M. C. (2008). A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A* **1185**:296-300.

Huss H.H. (1997). Garantia da qualidade dos produtos da pesca. *FAO Documento Técnico sobre as Pescas*. No. 334. Roma, FAO. 176 p.

Jeyasekaran G., Shakila R. J. (2003). Occurrence of biogenic amine forming bacteria in cured fishery products of Thoothukkudi Region of Tamil Nadu, India. *Asian Fisheries Science* **16**:195-202.

Klausen N., Huss H. H. (1987). Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology* **5**(2):147-156.

Kim M. K., Mah J. H., Hwang H. J. (2009). Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chemistry* **116**:87-95.

Kordiovská P., Vorlová L., Borkovcová I., Karpísková R., Buchtová H., Svobodová Z., Krízer M., Vácha F. (2006). The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science* **51**(6):262-270.

Korfmacher W. A. (2005). Foundation review: Principle and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery Today* **10**(20):1357-1367.

Kronstand R., Josefsson M. (2006). Quantification using LC-MS. In: Poletini A. Applications of LC-MS in toxicology. Pharmaceutical Press. 43-70 p.

- Lehane L., Olley J. (2000). Review: Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology* **58**:1-37.
- MacDonald P. D. (2001). A sample preparation primer and guide to solid phase extraction methods development. Waters. 83 p.
- MacMater M. C. (2005). LC/MS: a practical user's guide. John Wiley & Sons. 165 p.
- Moreno R. B., Torres E. F. S., Neto J. M. M. (2003). Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP e São Paulo. *Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos* **3**(5):151-159.
- Millán S., Sampedro M. C., Unceta N., Goicolea M. A., Barrio R. J. (2007). Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **584**:145-152.
- Morii H., Cann D. C., Taylor L. Y., Murray C. K. (1986). Formation of histamine by luminous bacteria isolated from scombroid fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **52**(12):2135-2141.
- Nahla T. K., Farag H. S. M. (2005). Histamine and histamine producing bacteria in some local and imported fish and their public health significance. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **1**(4):329-336.
- Önal A. (2007). A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* **103**:1475-1486.
- Ortolani C., Pastorello E. A. (2006). Food allergies and food intolerances. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **20**(3):467-483.
- Peters F. T. (2006). Method validation using LC-MS. *In: Poletini A. Applications of LC-MS in toxicology.* Pharmaceutical Press. 71-95 p.
- Peters F. T., Drummer O. H., Musshoff F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International* **165**:216-224.
- Politi L., Groppi A., Poletini A. (2005). Ionisation, ion separation and ion detection in LC-MS. *In: Poletini A. Applications of LC-MS in toxicology.* Pharmaceutical Press. 1-22 p.
- Radosevich, J. (2007). Analyzing amines. [www.petfoodindustry.com](http://www.petfoodindustry.com)
- Saaid M., Saad B., Hashim N. H., Ali A. S. M., Saleh M. I. (2009). Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry* **113**:1356-1362.
- Sangsrichan S. (2005). Derivatives of acids, alcohols and amines for LC-MS. *PhD thesis.* University of Wales. Swansea. 458 p.
- Santos M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Food Microbiology* **29**:213-231.
- Shah V. P., Midha K. K., Findlay J. W. A., Hill H. M., Hulse J. D., McGilveray I. J., McKay G., Miller K. J., Patnaik R. N., Powell M. L., Tonelli A., Viswanathan C. T., Yacobi A. (2000). Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research* **17**(12):1551-1557.
- Shalaby A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. **29**(7):675-690.
- Suizdak G. (2004). An introduction to mass spectrometry ionization: an excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. **9**:50-63.

Taylor P. J. (2006). Method development and optimisation of LC-MS. *In: Poletini A. Applications of LC-MS in toxicology.* Pharmaceutical Press. 23-42 p.

Waters (2007). Atantis T3, DC18 and HILIC silica columns: care and use manual. 10 p.

Yoshinaga D., Frank H. A. (1982). Histamine-producing in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Applied and Environmental Microbiology* **44**(2):447-452.

<http://foodsafety.suencs.com>

[www.answers.com/topic/ammonium](http://www.answers.com/topic/ammonium)