

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CAMPUS SOROCABA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

BELTON HENRIQUE CONDELA GUAMBE

**DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM DIFERENTES AMOSTRAS DE
COGUMELOS POR ELECTROFORESE CAPILAR**

Sorocaba

2025

BELTON HENRIQUE CONDELA GUAMBE

**DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM DIFERENTES AMOSTRAS DE
COGUMELOS POR ELECTROFORESE CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos.

Orientação: Profa. Dra. Elisabete Alves Pereira

Sorocaba

2025

Guambe, Belton Henrique Condela

DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM
DIFERENTES AMOSTRAS DE COGUMELOS POR
ELECTROFORESE CAPILAR / Belton Henrique Condela
Guambe -- 2025.
133f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Elisabete Alves Pereira

Banca Examinadora: Elisabete Alves Pereira, Luciana
Camargo de Oliveira, João Flávio da Silveira Petrucci

Bibliografia

1. Aminoácidos. 2. Cogumelos. 3. Eletroforese
Capilar; . I. Guambe, Belton Henrique Condela. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



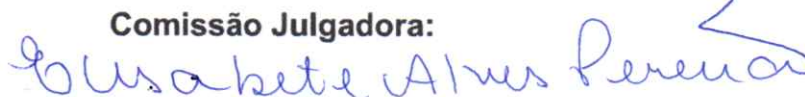
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

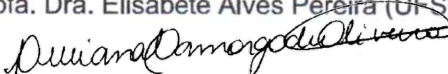
Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Belton Henrique Condela Guambe, realizada em 16/05/2025.

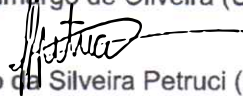
Comissão Julgadora:



Profa. Dra. Elisabeth Alves Pereira (UFSCar)



Profa. Dra. Luciana Camargo de Oliveira (UFSCar)



Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci (UFU)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

RESUMO

Os cogumelos são amplamente consumidos em diversas culturas devido ao seu alto valor nutricional, porém, durante o armazenamento e processamento, podem ser suscetíveis à formação de aminas biogênicas (ABs) devido à ação de enzimas descarboxilases presentes nas bactérias que os colonizam. As ABs, produzidas pela degradação de aminoácidos, podem representar riscos à saúde, como intoxicação alimentar, quando em níveis elevados. Embora a legislação estabeleça limites para a histamina em algumas espécies de peixes e derivados, não há regulamentação para todas as aminas comuns em alimentos incluindo os cogumelos. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para a determinação simultânea de putrescina (PUT), histamina (HIS), cadaverina (CAD), espermidina (SPD), espermina (SPM), tiramina (TYR) e Triptamina (TRY) em amostras de cogumelos utilizando a técnica de eletroforese capilar (CE). As BAs foram separadas utilizando um tampão de corrida composto por 15 mmol L⁻¹ de imidazol, 30 mmol L⁻¹ de éter coroa, 7 mmol L⁻¹ de α -ciclodextrina e 3,5 mmol L⁻¹ de EDTA (detecção indireta em 214 nm), sob tensão de 15 kV e modo de injeção hidrodinâmico (30 mbar/5s). As BAs foram extraídas das amostras de cogumelos utilizando uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de HCl. A curva analítica foi linear no intervalo de 2,0 a 10,0 mg L⁻¹ para cada amina ($R \geq 0,998$). A repetibilidade e a precisão intermediária variaram de 0,6 – 1,9% e 0,9 – 14%, respectivamente. O método apresentou valores satisfatórios de limite de detecção (0,25–0,60 mg L⁻¹) e limite de quantificação (0,76 - 1,82 mg L⁻¹), podendo ser aplicado para detecção e quantificação de baixas concentrações de BAs em amostras de cogumelos. A recuperação variou no intervalo de 94,7 - 110 %. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso em diferentes tipos de cogumelos (Hiratake, Champignon de paris e Porto belo). As concentrações das BAs nas amostras de cogumelos variaram de 1,5 – 14 mg Kg⁻¹. Devido à ausência de limites regulatórios específicos para cogumelos, os resultados obtidos foram comparados com os limites estabelecidos para outros alimentos, mostrando-se inferiores aos valores máximos permitidos, o que sugere a segurança do consumo das amostras analisadas.

Palavras-chave: Aminas biogênicas; Alimentos; Cogumelos; Detecção direta; Detecção indireta; Eletroforese capilar; Quantificação de Aminas biogênicas.

ABSTRACT

Mushrooms are widely consumed across various cultures due to their high nutritional value. However, during storage and processing, they may be susceptible to the formation of biogenic amines (BAs) as a result of decarboxylase enzyme activity from colonizing bacteria. BAs, produced through the degradation of amino acids, can pose health risks such as food intoxication when present at elevated levels. Although regulations exist for histamine in certain fish species and their derivatives, there is no comprehensive legislation covering all common amines in foods, including mushrooms. This study aimed to develop an analytical method for the simultaneous determination of putrescine (PUT), histamine (HIS), cadaverine (CAD), spermidine (SPD), spermine (SPM), tyramine (TYR), and tryptamine (TRY) in mushroom samples using capillary electrophoresis (CE). The BAs were separated using a running buffer composed of 15 mmol L⁻¹ imidazole, 30 mmol L⁻¹ crown ether, 7 mmol L⁻¹ α -cyclodextrin, and 3.5 mmol L⁻¹ EDTA, with indirect detection at 214 nm, under a voltage of 15 kV and hydrodynamic injection mode (30 mbar/5 s). The BAs were extracted from mushroom samples using a 0.1 mol L⁻¹ HCl solution. The analytical curve was linear in the range of 2.0 to 10.0 mg L⁻¹ for each amine ($R^2 \geq 0.998$). Repeatability and intermediate precision ranged from 0.6 to 1.9% and 0.9 to 14%, respectively. The method showed satisfactory limits of detection (0.25–0.60 mg L⁻¹) and quantification (0.76–1.82 mg L⁻¹), enabling the detection and quantification of low concentrations of BAs in mushroom samples. Recovery values ranged from 94.7 to 110%. The developed method was successfully applied to different mushroom varieties (Hiratake, Champignon de Paris, and Portobello). The concentrations of BAs in the mushroom samples ranged from 1.5 to 14 mg kg⁻¹. Due to the absence of specific regulatory limits for mushrooms, the results were compared to the limits established for other food products and were found to be below the maximum permitted levels, indicating the safety of the analyzed samples for consumption.

Keywords: Biogenic amines; Biogenic amine quantification; Capillary electrophoresis; Direct detection; Indirect detection; Food; Mushrooms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação e estrutura química das amins biogênicas estudadas.	4
Figura 2 - Número de artigos publicados nos últimos 13 anos, sobre amins biogênicas em alimentos.	11
Figura 3 – Mapa bibliométrico de coocorrência de palavras-chave da bibliografia utilizada.	12
Figura 4 – Projeção do mercado global do cogumelo em USD Biliões até 2032.....	17
Figura 5 - Representação gráfica do número de produções dos últimos 13 anos sobre cogumelos e amins biogênicas.	21
Figura 6 - Mapa bibliométrico de coocorrência de palavras constantes no título e resumo da bibliografia utilizada.	22
Figura 7 – Representação do sistema de eletroforese capilar (CE).	30
Figura 8 – Representação do fluxo eletrosmótico no interior de um capilar de sílica fundida.....	32
Figura 9 – Pré-tratamento e extração de BAs em amostras de cogumelos.	47
Figura 10 - Fluxograma da metodologia utilizada.	48
Figura 11 - Efeito da adição do ACN no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.	52
Figura 12 - Efeito da adição do metanol no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.	53
Figura 13 - Efeito da adição de Éter coroa no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.	56
Figura 14 - Efeito da adição de β -cd e α -cd no eletrólito de corrida para separação de BAs– DNS utilizando o modo CZE.	58
Figura 15 - Efeito da adição de EDTA no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.	60
Figura 16 – Efeito da tensão no sistema de separação.	61
Figura 17 - Efeito do comprimento do capilar no sistema de separação.	62
Figura 18 – Efeito da concentração do imidazol no sistema de separação.	66
Figura 19 - Efeito do pH na determinação e separação de amins biogênicas.	67
Figura 20 - Efeito da adição de Éter Coroa no eletrólito para separação de amins biogênicas pelo método de detecção indireta.	68
Figura 21 - Efeito da adição da β -ciclodextrina na separação das amins biogênicas.	70

Figura 22 - Efeito da adição da α -ciclodextrina na separação das aminas biogênicas.	71
Figura 23 – Efeito da adição de EDTA no sistema de separação das aminas biogênicas.	73
Figura 24 – Efeito da tensão na separação das aminas biogênicas pelo sistema de detecção indireta.	75
Figura 25 – Efeito da temperatura no sistema indireto de separação das aminas biogênicas.....	76
Figura 26 Efeito do comprimento do capilar na separação das aminas biogênicas.....	78
Figura 27 – Efeito de diferentes combinações de EDTA e α -ciclodextrina.	80
Figura 28 - Efeito de ácido tricloroacético na extração e separação de aminas biogênicas por detecção indireta em eletroforese capilar.....	82
Figura 29 - Efeito de ácido clorídrico na extração e separação de aminas biogênicas por detecção indireta em eletroforese capilar.....	83
Figura 30 - Efeito de metanol, etanol e ácido adípico adicionados ao eletrólito para separar íons das aminas biogênicas por detecção indireta.	85
Figura 31 - Efeito da redução do pH do eletrólito de corrida.	86
Figura 32 - Efeito de diferentes compostos utilizados como padrão interno no sistema de separação para identificação das aminas biogênicas.	88
Figura 33 - Seletividade do método analítico.	90
Figura 34 – Análise de degradação no primeiro dia.	96
Figura 35 - Análise de degradação de cogumelos no terceiro dia.	97
Figura 36 - Análise de degradação de cogumelos no quinto dia.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites toleráveis de amins biogênicas utilizadas.	14
Tabela 2 - Consumo de cogumelos por espécie no Brasil.	18
Tabela 3 - Relação de amins biogênicas encontradas em cogumelos.	19
Tabela 4 - Métodos analíticos desenvolvidos para análise de amins biogênicas em alimentos. 26	
Tabela 5 - Tipos de detetores e seus limites de detecção (LOD) instrumentais utilizados em eletroforese capilar (CE).	35
Tabela 6 – Solventes, reagentes e soluções padrão utilizadas no experimento.	44
Tabela 7- Condições analíticas avaliadas para o desenvolvimento do método direto para separação de BAs por Eletroforese Capilar.	50
Tabela 8 – Condições analíticas avaliadas para o desenvolvimento do método indireto para separação de BAs por Eletroforese Capilar.	64
Tabela 9 - Condições instrumentais avaliadas para a separação de amins biogênicas.	74
Tabela 10 – Combinações de EDTA e α -ciclodextrina testadas.	79
Tabela 11 – Dados estatísticos da curva analítica.	91
Tabela 12 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método proposto.	91
Tabela 13 - Precisão do método proposto expressa como coeficiente de variação.	93
Tabela 14 – Teste de recuperação utilizando diferentes concentrações de amins biogênicas. ...	94
Tabela 15 - Quantificação de amins biogênicas em amostras de cogumelos pelo método proposto.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celcius
β-CD	β-ciclodextrina
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAs	Aminas biogênicas (do inglês <i>biogenic amines</i>)
C4D	Deteção condutométrica sem contato
CAD	Cadaverina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE	Eletroforese capilar (do inglês <i>capillary electrophoresis</i>)
cm	Centímetros
CZE	Eletroforese Capilar em Zona
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNS (DNS-Cl)	Cloreto de dansila
DP	Desvio padrão
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EOF	Fluxo Eletrosmótico
EtOH	Etanol
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre

g	Gramas
GC	Cromatografia gasosa
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HIS	Histamina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kg	Kilogramas
kV	Quilovolts
L	Litros
LIF	Fluorescência induzida por laser
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
m/v	Massa/volume
mAU	Miliunidade de absorvância
mBar	Milibar
mg	Miligrama
MEKC	Cromatografia Eletrocinética Micelar
MeOH	Metanol

mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimols
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
NaOH	Hidróxido de sódio
N/A	Não aplicável
ND	Não detectado
NH ₃	Amônia
nL	Nanolitros
nm	Nanômetros
OPA	O-ftalaldeído
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PUT	Putrescina
rpm	Rotações por minuto
RTIQ	Regulamento Técnico sobre a Identidade e Qualidade
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Si-O-	Grupos silanoatos
Si-OH	Grupos silanóis

SPD	Espermidina
SPM	Espermina
TEA	Trietilamina
TBS	Tetraborato de Sódio
TRYP	Triptamina
TYR	Tiramina
UV-vis	Ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ESTADO DA ARTE.....	1
1.2. AMINAS BIOGÊNICAS	2
1.2.1. Conceito Geral.....	2
1.2.2. Formação e Classificação	3
1.2.3. Alimentos Relacionados.....	5
1.2.4. Controle em Alimentos.....	7
1.2.5. Efeitos Toxicológicos.....	8
1.2.6. Importância do Estudo de Aminas Biogênicas em Alimentos	10
1.2.7. Limites da Ingestão de Aminas Biogênicas em Alimentos	12
1.3. COGUMELOS.....	16
1.3.1. Aminas Biogênicas em Cogumelos	18
1.4. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS E PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO EM COGUMELOS	23
1.5. ELETROFORESE CAPILAR	29
1.5.1. Introdução da Amostra	31
1.5.2. Princípios de Separação: O Eletrólito de Fundo e o Fluxo Eletrosmótico	31
1.5.3. Métodos de Detecção Empregados em Eletroforese Capilar	34
1.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODO	38
1.6.1. Seletividade/Especificidade	39
1.6.2. Precisão	39
1.6.3. Exatidão	39
1.6.4. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	40
1.6.5. Linearidade.....	41

2.	OBJETIVOS	42
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3.	METODOLOGIA.....	43
3.1.	INSTRUMENTAÇÃO	43
3.2.	SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES PADRÃO.....	43
3.3.	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	45
3.3.1.	Soluções Padrão das Aminas Biogênicas	45
3.3.2.	Solução de Cloreto de Dansila (DNS) a 10 000 ppm.....	45
3.3.3.	Solução de Ácido Tricloroacético (TCA) a 10%	45
3.3.4.	Solução de Imidazol	45
3.3.5.	Solução de Éter Coroa	45
3.3.6.	Soluções de α-cd e β-cd	45
3.3.7.	Solução de EDTA	45
3.3.8.	Solução de Ácido Adípico.....	46
3.4.	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE AGARICUS BISPORUS.....	46
3.4.1.	Extração.....	46
3.4.2.	Processo de Derivatização	46
3.5.	VALIDAÇÃO.....	47
3.6.	FLUXOGRAMA	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS E INSTRUMENTAIS.....	49
4.1.2.1.	Otimização das Condições Instrumentais.....	74
4.2.	Avaliação do Processo de Extração	81
4.3.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	89
4.3.1.	Seletividade.....	89

4.3.2. Linearidade.....	90
4.3.3. Limite de detecção e Limite de Quantificação	91
4.3.4. Precisão	92
4.3.5. Exatidão	94
4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS	94
4.4.2. Determinação Quantitativa das Aminas Biogênicas em Cogumelos.....	99
5. CONCLUSÕES.....	102
6. REFERÊNCIAS.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTADO DA ARTE

O aumento da população mundial é uma preocupação cada vez mais crescente, principalmente em relação à segurança alimentar, considerando que a população mundial em 2030 será superior a 8.5 bilhões de pessoas e, em 2050, superior a 9,1 bilhões, exigindo assim maior oferta de alimentos (FAO, 2024). Esta preocupação também está relacionada ao potencial de contaminação química e microbiológica dos alimentos, que são mais frequentes em sistemas de produção de alimentos em grande escala (Omer *et al.*, 2021).

A segurança alimentar e nutricional envolve muito mais que a disponibilidade de alimentos; ela envolve a segurança na relação que os indivíduos e as comunidades mantêm com o alimento (De Freitas e Pena, 2007). Mais do que as perdas econômicas na indústria alimentícia, resultantes do manuseio inadequado, contaminações ou deterioração, há também o risco significativo de ocorrência de doenças e mortalidade associadas ao consumo desses alimentos. (Mantoanelli, 2019; Ghasemi-Varnamkhasti *et al.*, 2018; Swinney e Bornhop, 2000). Portanto, a segurança alimentar engloba não apenas a produção e distribuição adequadas de alimentos, mas também a garantia de que estes sejam seguros e nutritivos, protegendo assim a saúde pública e promovendo o bem-estar geral da população.

A deterioração dos alimentos é um processo multifacetado, que ocorre devido à existência de condições favoráveis à atividade enzimática, levando à formação de aminas biogênicas (BAs). As BAs são compostos orgânicos nitrogenados básicos, formados principalmente pela descarboxilação de aminoácidos, e estão presentes em diversos alimentos como verduras, frutas, peixes, carnes e alguns fungos, como os cogumelos (Dos Reis, Custódio e Glória, 2015). No entanto, ainda há uma escassez de informações detalhadas sobre presença e os níveis de aminas biogênicas em cogumelos (Coelho, 2012; Dadáková *et al.*, 2009; Dos Reis *et al.*, 2015; Jakabová *et al.*, 2024; Jabłońska-Ryś *et al.*, 2020), destacando a necessidade de mais pesquisas nesta área para melhor compreender os riscos potenciais à saúde e a qualidade dos alimentos.

Os cogumelos, resultantes do corpo de frutificação de macrofungos, são alimentos de baixo teor energético e ricos em aminoácidos essenciais, fibras, minerais e vitaminas. Devido a essas características nutricionais, os cogumelos são frequentemente considerados produtos nutracêuticos

ou alimentos funcionais, desempenhando um papel importante na promoção da saúde e na prevenção de doenças (Chang e Miles, 2004; Dos Reis, Custódio e Glória, 2015).

As principais BAs encontradas em cogumelos são: putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermidina e espermina. Estas aminas resultam de processos enzimáticos que ocorrem à medida que os cogumelos se deterioram, refletindo a atividade metabólica dos microrganismos presentes (Dos Reis et al., 2015; Coelho, 2012; Dadáková et al., 2009). A identificação e monitoramento dessas aminas é essencial para avaliar a qualidade e a segurança dos cogumelos, uma vez que níveis elevados podem indicar deterioração significativa e possíveis riscos à saúde devido à ingestão dessas substâncias.

Desta forma, se torna crucial que as empresas e indústrias alimentícias determinem a quantidade de BAs nos alimentos antes do processamento ou comercialização. A sua presença em níveis elevados pode ser um indicativo de deterioração e de práticas inadequadas de armazenamento e manuseio, comprometendo a segurança e a qualidade dos produtos alimentícios (Jakabová *et al.*, 2024). Além disso, o monitoramento das BAs é essencial para evitar riscos à saúde associados ao consumo de alimentos contaminados, uma vez que aminas como histamina e tiramina podem causar reações adversas em indivíduos sensíveis (Doeun, Davaatseren e Chung, 2017). Portanto, a implementação de controles rigorosos e regulares dessas substâncias é uma prática vital para assegurar a conformidade com os padrões de segurança alimentar e proteger a saúde pública.

1.2. AMINAS BIOGÊNICAS

1.2.1. Conceito Geral

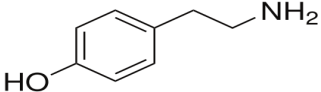
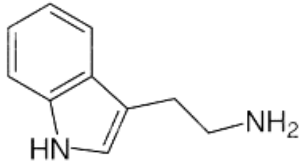
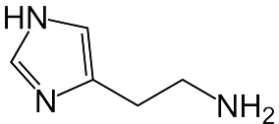
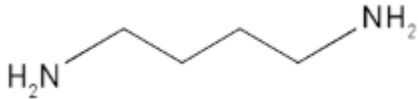

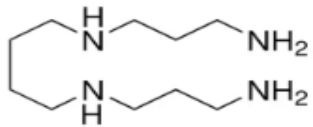
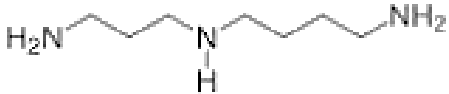
As BAs são definidas como compostos biológicos, nitrogenados de baixa massa molar, produzidos no metabolismo dos organismos vivos, podendo ser animais ou vegetais (Silla, 1996; Wójcik, Lukaszewicz e Boneca, 2021). Os microrganismos são a principal via de formação das BAs em alimentos como estratégia de sobrevivência em ambientes ácidos ou como suplemento alternativo de energia quando as células se encontram expostas a condições desfavoráveis (GOMES MB, 2014; (Silva e Glória, 2002; Ladero, Fernández e Alvarez, 2009; Gomes *et al.*, 2014).

As bactérias capazes de descarboxilar aminoácidos são diversas, incluindo várias cepas de bactérias ácido-láticas (BAL) pertencentes aos gêneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Essas bactérias podem produzir aminas biogênicas em uma variedade de alimentos, como cogumelos, vegetais, queijos, carnes fermentadas e bebidas (Moreno-Arribas *et al.*, 2003; Masson, Talon e Montel, 1996; Bover-Cid e Holzäpfel, 1999). Considerando a relação direta entre aminas biogênicas e a contaminação bacteriana em alimentos, estas substâncias têm sido amplamente estudadas e utilizadas como indicadores de qualidade e segurança alimentar.

1.2.2. Formação e Classificação

Os precursores das BAs são os aminoácidos, sendo: a) Histamina é formada pela descarboxilação da histidina; b) Putrescina é formada pela descarboxilação da glutamina; c) Cadaverina é formada pela descarboxilação da lisina; d) Tiramina é formada pela descarboxilação de tirosina; e) Triptamina é formada pela descarboxilação do triptofano e; f) Espermidina e espermina não são formadas por descarboxilação direta de aminoácidos, mas sim pelos processos de modificação da putrescina e da espermidina, respectivamente (Cardozo *et al.*, 2013; Doeun, Davaatseren e Chung, 2017; Omer *et al.*, 2021). A Tabela 1 mostra os nomes, estruturas e fórmulas químicas das aminas estudadas.

Figura 1 - Classificação e estrutura química das aminas biogênicas estudadas.

Classificação	Aminas	pka	Massa molecular	Fórmula molecular	Estrutura Química
Aminas Aromáticas	Tiramina	10,46	137,18	C ₈ H ₁₁ NO	
	Triptamina	10,25	160,21	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	
Aminas Heterocíclicas	Histamina	6,04	111,15	C ₅ H ₉ N ₃	
Aminas alifáticas	Putrescina	10,98	88,15	C ₄ H ₁₂ N ₂	
	Cadaverina	10,74	102,18	C ₅ H ₁₄ N ₂	
	Espermina	10,95	202,34	C ₇ H ₁₉ N ₃	
	Espermidina	10,92	145,25	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	

Fonte: elaborado pelo autor, adaptado de (Wójcik, Lukasiewicz e Boneca, 2021).

A descarboxilação oxidativa para formação de BAs pode ocorrer por dois processos: pela ação bacteriana e são induzidas por determinadas condições ambientais, como por exemplo, pH < 7 (meio ácido) desfavorável ao crescimento microbiano (Yu *et al.*, 2021). O segundo processo envolve a ação enzimática em organismos superiores, onde enzimas descarboxilases endógenas catalisam a descarboxilação de aminoácidos, resultando na formação dessas aminas em diferentes tecidos, desempenhando funções biológicas importantes, como neurotransmissão e regulação celular (Wójcik, Lukasiewicz e Boneca, 2021).

As BAs comumente encontradas em alimentos podem ser agrupadas, de acordo com sua estrutura química, em quatro categorias principais: aminas heterocíclicas (histamina e triptamina), poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina), monoaminas aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina) (Silva *et al.*, 2013; VIDAL-CAROU, LATORRE-MORATALLA e BOVER-CID, 2008; Bover-Cid e Holzapfel, 1999; Yu *et al.*, 2021). Essas aminas desempenham diversas funções biológicas e são frequentemente estudadas devido ao seu impacto na segurança e qualidade dos alimentos (Wójcik, Lukasiewicz e Boneca, 2021).

Entretanto, algumas aminas, como a octopamina, a dopamina e a serotonina, são classificadas como psicoativas por atuarem como neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC). Essas substâncias têm um papel crucial na modulação de processos neurológicos e comportamentais, o que justifica a importância de seu monitoramento em alimentos para prevenir potenciais efeitos adversos no consumidor (Jover *et al.*, 1996; Önal, 2007). A presença e a concentração dessas aminas em alimentos podem indicar tanto o estado de conservação quanto possíveis riscos à saúde, sendo, portanto, essencial para o controle de qualidade na indústria alimentícia.

1.2.3. Alimentos Relacionados

As BAs são frequentemente encontradas em uma variedade de alimentos, incluindo carnes e seus derivados, peixes, ovos, legumes, queijos, produtos de soja, alimentos fermentados de soja, vinhos e cervejas (Kaczmarczyk *et al.*, 2022). Contudo, pesquisas também indicam que há presença de BAs, como PUT, CAD, TYR, TRY, HIS, SPD e SPM, em cogumelo como o Champignon-de-paris (*Agaricus bisporus*), Shiitake (*Lentinula edodes*) e Shimeji (*Pleurotus*

ostreatus), (Coelho, 2012; Dadáková et al., 2009; Dadáková et al., 2009; Jakabová et al., 2024; Jabłońska-Ryś et al., 2020).

A presença de BAs em alimentos é determinada por uma combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos (Omer *et al.*, 2021). Entre os fatores que contribuem para sua presença em alimentos, destacam-se a alta disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de micro-organismos capazes de produzir enzimas descarboxilases e condições ambientais que favorecem a atividade microbiana, como temperatura, pH, e tempo de armazenamento. Alimentos ricos em aminoácidos livres, submetidos a processos de fermentação, cura ou armazenamento prolongado, são os mais propensos a apresentar níveis elevados desses compostos (Suzzi e Gardini, 2003; Cardozo *et al.*, 2013; Ruiz-Capillas e Herrero, 2019). A elevada concentração de BAs nos embutidos por exemplo, deve-se não apenas ao alto teor de proteínas presentes, mas também à intensa atividade proteolítica que ocorre durante a maturação desses produtos (Silva *et al.*, 2013; Doeun, Davaatseren e Chung, 2017).

Os alimentos fermentados, como queijos maturados e produtos à base de soja fermentada, são particularmente suscetíveis, uma vez que o processo de fermentação envolve a ação de microrganismos que produzem essas enzimas, resultando na formação de BAs como tiramina, histamina, cadaverina e putrescina (Comas-Basté *et al.*, 2020; Halász *et al.*, 1994). Carnes e peixes curados ou fermentados, como salame, presunto, sardinhas e anchovas, também apresentam altos níveis dessas aminas, devido ao longo tempo de armazenamento e às condições específicas de cura que permitem a sobrevivência de bactérias psicrotróficas (Bulula, Mugoyela e Kaale, 2017; VIDAL-CAROU, LATORRE-MORATALLA e BOVER-CID, 2008; Wójcik, Lukaszewicz e Boneca, 2021).

Além disso, bebidas alcoólicas como vinhos tintos e algumas cervejas artesanais são propensas a conter BAs, especialmente histamina e tiramina, em razão dos processos de fermentação e envelhecimento que favorecem a formação dessas substâncias (Coton *et al.*, 2010; Ginterová *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2021).

Os cogumelos, devido à sua natureza rica em proteínas e aminoácidos, também podem conter BAs, embora em concentrações geralmente mais baixas em comparação com alimentos fermentados ou curados (Coelho, 2012; Dadáková et al., 2009; Jabłońska-Ryś et al., 2020). A

presença dessas aminas pode ser influenciada por vários fatores, como a variedade de cogumelo, o estágio de maturação e as condições de armazenamento (RYŠ *et al.*, 2022). Os cogumelos frescos normalmente apresentam níveis baixos de BAs, mas a degradação enzimática e o crescimento microbiano durante o armazenamento prolongado ou inadequado podem aumentar suas concentrações (Dos Reis, Custódio e Glória, 2015).

Embora menos comum, alguns vegetais e frutas, como tomates, espinafre, berinjela e abacate, podem conter quantidades moderadas de BAs, particularmente putrescina, devido à sua composição rica em aminoácidos e à presença natural de micro-organismos em sua superfície (Linares *et al.*, 2010; Doeun, Davaatseren e Chung, 2017).

1.2.4. Controle em Alimentos

As BAs são compostos notavelmente estáveis, o que dificulta sua degradação. Embora a degradação dessas substâncias seja complexa, a aplicação de temperaturas adequadas pode ser eficaz no controle de sua formação (Naila *et al.*, 2010). Tratamentos térmicos elevados são utilizados para eliminar bactérias, prevenindo assim a contínua geração de aminas; no entanto, isso não garante totalmente a segurança alimentar, pois, embora as bactérias estejam eliminadas, algumas aminas são resistentes ao calor e podem permanecer no alimento (Dadáková *et al.*, 2009).

Para controlar a formação de BAs em alimentos, o uso de baixas temperaturas é uma estratégia fundamental, pois inibe ou retarda o crescimento microbiano e, conseqüentemente, reduz a atividade enzimática responsável pela produção dessas substâncias (Elias, Fraqueza e Laranjo, 2018). O congelamento, em particular, é altamente eficaz no controle microbiano, enquanto o simples resfriamento pode estabilizar os níveis de aminas biogênicas (Naila *et al.*, 2010; Elias, Fraqueza e Laranjo, 2018). No entanto, deve-se notar que em alguns casos específicos, o resfriamento pode ocasionar um pequeno aumento na concentração dessas aminas, conforme observado em estudos (Jaguey *et al.*, 2021; Ruiz-Capillas e Herrero, 2019). Apesar de ser uma medida eficaz, a refrigeração nem sempre é adotada devido aos custos elevados envolvidos. Além disso, algumas bactérias podem continuar a produzir aminas biogênicas mesmo em temperaturas inferiores a 5°C, o que torna necessário o uso de métodos complementares (Naila *et al.*, 2010; Doeun, Davaatseren e Chung, 2017; Jaguey *et al.*, 2021).

A irradiação é uma técnica que pode ser utilizada para a degradação de BAs por meio da radiólise, ou para a redução das populações bacterianas que produzem essas substâncias (Naila *et al.*, 2010). Outra abordagem eficaz é o uso de pressão hidrostática, que causa danos às membranas celulares das bactérias, ajudando a controlar sua proliferação e, assim, diminuir a formação de amins biogênicas (Ruiz-Capillas e Herrero, 2019). Em produtos lácteos, que frequentemente são processados de maneira não estéril e são altamente suscetíveis à contaminação, o risco de formação de amins biogênicas pode ser exacerbado, especialmente quando não se utiliza pasteurização térmica (Ghasemi-Varnamkhasti *et al.*, 2018).

O uso de aditivos e conservantes é uma prática comum para limitar o crescimento microbiano, sendo bastante eficaz para a redução de amins biogênicas. No entanto, ainda é necessário realizar mais pesquisas para compreender melhor os potenciais efeitos adversos desses aditivos (Doeun, Davaatseren e Chung, 2017; Jaguey *et al.*, 2021). A modelagem matemática é uma técnica relevante nesse contexto, pois permite desenvolver estratégias mais eficazes para controlar a produção dessas substâncias, integrando-as em sistemas de segurança alimentar e, assim, melhorando os processos de produção e armazenamento de alimentos (Teleken, Robazza e Gomes, 2011; Mahdinia *et al.*, 2020).

1.2.5. Efeitos Toxicológicos

Estabelecer o nível tóxico das BAs é crucial para garantir a segurança alimentar e prevenir efeitos adversos à saúde, embora seja uma tarefa complexa devido às variáveis características individuais. A sensibilidade humana às BAs varia significativamente, dependendo da atividade das enzimas específicas envolvidas no metabolismo dessas substâncias, como a histamina e outras metiltransferases menos específicas, como a diamina oxidase (Spano *et al.*, 2010).

O teor de BAs nos alimentos tem sido amplamente estudado, pois seu consumo é considerado um risco à saúde pública (Adimcilar, Öztekin e Bedia Erim, 2017; De Yixuan *et al.*, 2023; Wang, Xu e Yang, 2022; He, Nie e Dong, 2024). As BAs podem provocar efeitos adversos à saúde dos consumidores quando ingeridas em quantidades significativas, quando os mecanismos naturais de catabolismo são inibidos, ou em casos de deficiências genéticas no corpo humano que comprometem o metabolismo dessas substâncias (Omer *et al.*, 2021). Além disso, pesquisas (Jabłońska-Ryś *et al.*, 2020; Comas-Basté *et al.*, 2020; Jaguey *et al.*, 2021; RYŚ *et al.*, 2022; Maráková *et al.*, 2020; Wójcik, Lukaszewicz e Boneca, 2021) destacam a necessidade de

regulamentação rigorosa e monitoramento contínuo dos níveis desses compostos nos alimentos para mitigar riscos à saúde e garantir a segurança alimentar. Cabe mencionar que uma compreensão detalhada dos mecanismos enzimáticos e genéticos envolvidos na metabolização das BAs pode orientar o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle e prevenção da toxicidade alimentar.

Os sintomas clínicos decorrentes do consumo de alimentos contendo BAs variam conforme a quantidade e diversidade ingerida, a susceptibilidade individual e a capacidade de desintoxicação do intestino (Omer *et al.*, 2021). A ingestão de alimentos com altas concentrações dessas amins pode induzir a secreção de ácido gástrico, aumentar o débito cardíaco e favorecer a entrada das amins na circulação sistêmica (Shalaby, 1996). Este processo pode estimular a liberação de adrenalina e noradrenalina, resultando em sintomas como enxaqueca, taquicardia, hiperglicemia e elevação da pressão arterial (Cardozo *et al.*, 2013; Shalaby, 1996; Omer *et al.*, 2021).

A maior parte das intoxicações por alimentos em humanos estão relacionadas à ingestão de histamina, resultante do consumo de peixe deteriorado (Bulula, Mugoyela e Kaale, 2017). As espécies de peixe associadas ao envenenamento são membros da família *Scombridae*, estes que possuem altos níveis de histidina (Naila *et al.*, 2010; Comas-Basté *et al.*, 2020). Os principais sintomas da contaminação por histamina são náuseas, vômitos, diarreia, câibras abdominais, erupção cutânea, inflamação localizada, dor de cabeça, palpitação e severo desconforto respiratório (Cardozo *et al.*, 2013; Shulpekova *et al.*, 2021).

A tiramina é reconhecida por sua capacidade de induzir vasoconstrição, aumentar a taxa respiratória e os níveis de glicose no sangue, elevar o pulso cardíaco e a pressão arterial, além de estimular a liberação de noradrenalina no sistema nervoso simpático, resultando em lacrimação, salivação excessiva e risco de derrames. A feniletilamina também promove a liberação de noradrenalina no sistema nervoso simpático, causando aumento da pressão arterial, vasoconstrição e derrames. A triptamina, por sua vez, está associada ao aumento da pressão arterial e vasoconstrição. Amins como putrescina, cadaverina e lisina podem diminuir a pressão arterial e a frequência cardíaca, além de causar tetania, paralisia nas extremidades e potencializar a toxicidade de outras amins (Shalaby, 1996; Dadáková *et al.*, 2009; Comas-Basté *et al.*, 2020).

1.2.6. Importância do Estudo de Aminas Biogênicas em Alimentos

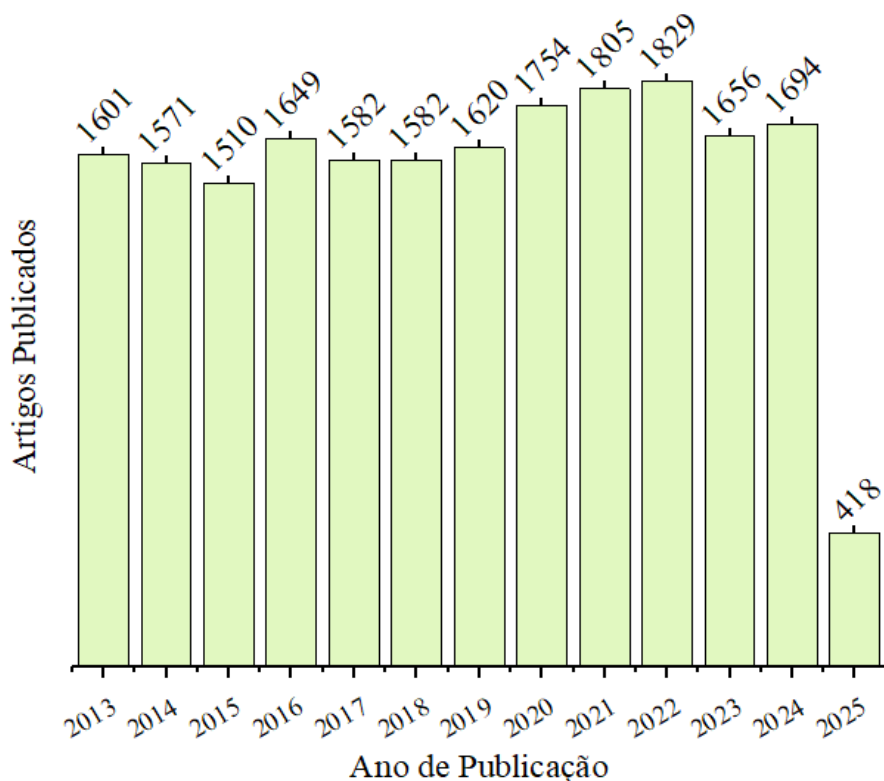
As BAs têm ganhado crescente atenção no campo da ciência dos alimentos devido à sua presença em diversos produtos alimentícios e ao impacto que podem ter na saúde humana (Elias, Fraqueza e Laranjo, 2018). Em particular, algumas BAs, como a histamina, a tiramina e a putrescina, são conhecidas por seus efeitos fisiológicos significativos, que podem variar de benefícios à saúde a potenciais riscos tóxicos dependendo de sua concentração e do estado de saúde do consumidor (Önal, 2007).

Portanto, a investigação aprofundada sobre a formação, detecção e controle das BAs nos alimentos é essencial não apenas para garantir a segurança alimentar, mas também para otimizar a qualidade sensorial dos produtos (Omer *et al.*, 2021). A pesquisa contínua nesse campo permite o desenvolvimento de estratégias eficazes para minimizar a formação desses compostos em alimentos processados e melhorar as técnicas de monitoramento, contribuindo para a proteção dos consumidores e a melhoria da qualidade dos alimentos disponíveis no mercado (Santos, 1996; Önal, 2007; Jakabová *et al.*, 2024)

A Figura 2 ilustra o crescimento significativo no número de trabalhos científicos sobre BAs em alimentos, publicados na base de dados *Web of Science* nos últimos 13 anos. Esse aumento constante no número de publicações evidencia a crescente relevância e interesse acadêmico no tema. A pesquisa sobre BAs é crucial, pois esses compostos podem impactar a saúde humana, sendo associadas a diversos efeitos adversos quando presentes em altas concentrações nos alimentos.

Além disso, o aumento das publicações reflete um esforço contínuo dos cientistas em compreender melhor os mecanismos de formação, detecção e controle das BAs, contribuindo para a segurança alimentar e a saúde pública. Este panorama de pesquisas também aponta para um futuro promissor na área, com a possibilidade de desenvolvimento de novas tecnologias e métodos para monitoramento e redução de BAs em produtos alimentícios (REIS, 2014; Dadáková, Pelikánová e Kalač, 2009; Dos Reis, Custódio e Glória, 2015; Jabłońska-Ryś *et al.*, 2020; Jakabová *et al.*, 2024)

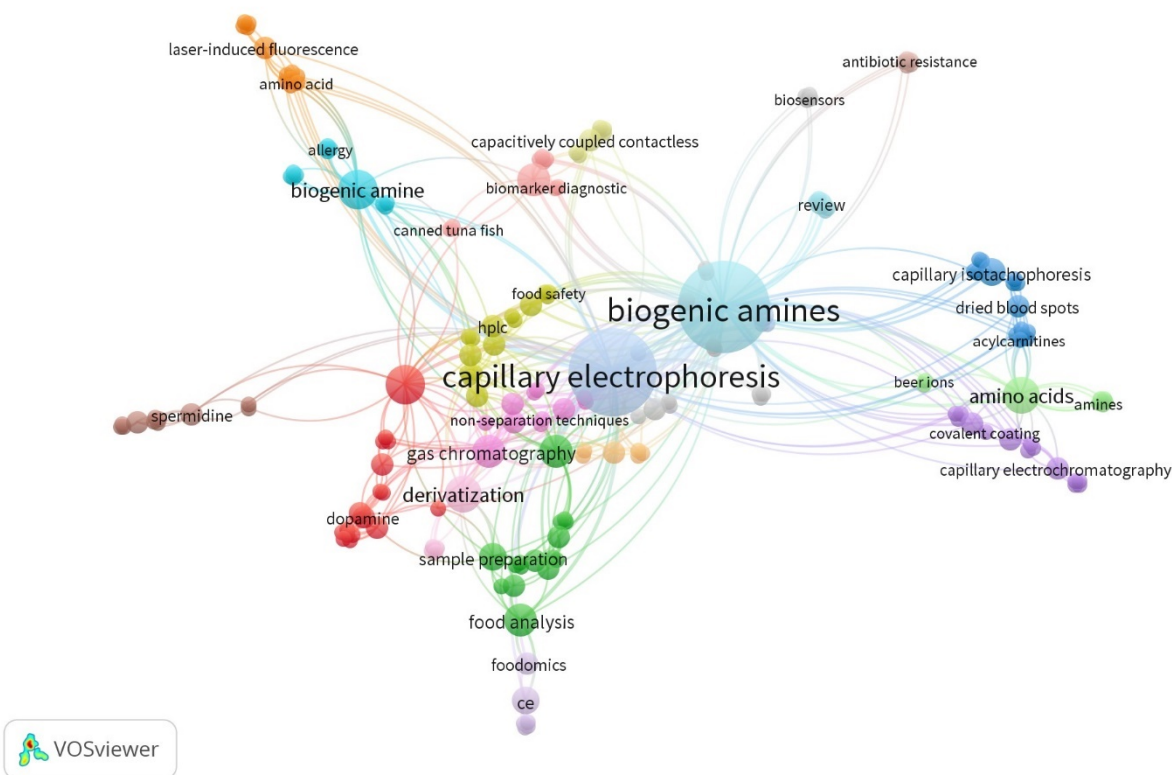
Figura 2 - Número de artigos publicados nos últimos 13 anos, sobre aminas biogênicas em alimentos.



Fonte: elaborado pelo autor; acervo da base de dados *Web of Science* utilizando “*biogenic and amines or capillary and electrophoresis or mushrooms and foods*”, como palavras chave.

Para ilustrar a complexidade e as interconexões das pesquisas na área, foi utilizado o software *VOSviewer* (van Ech e Waltman 2020) para criar um mapa bibliométrico baseado em dados bibliográficos da base de dados *Web of Science*, abrangendo um período de 13 anos, de 2013 a 2025, filtrados nas áreas de química analítica, nutrição, farmácia, bioquímica e biotecnologia. Este mapa visualiza as principais tendências e relações entre as palavras-chave mais frequentemente estudadas nas publicações científicas, evidenciando os clusters temáticos e destacando como diferentes tópicos, como aminas biogênicas, eletroforese capilar e segurança alimentar, estão interligados e são centrais na pesquisa atual (Figura 3).

Figura 3 – Mapa bibliométrico de coocorrência de palavras-chave da bibliografia utilizada.



Legenda: Base de dados – *web of Science*; palavras-chave - “*biogenic and amines or capillary and electrophoresis or mushrooms and foods*”; filtros – 2013 a 2025, área de pesquisa, química analítica, ciência de alimentos, biotecnologia e microbiologia aplicada, bioquímica molecular; artigos retornados – 77; tipo de análise – coocorrências; unidade de análise – palavras-chave do autor; ocorrência – mínimo de 5 ocorrências. Fonte: elaborado pelo autor.

Este mapa oferece uma visão abrangente dos esforços científicos em curso, enfatizando as áreas de maior foco e revelando possíveis direções futuras para pesquisa e desenvolvimento tecnológico na detecção e controle de amins biogênicas.

1.2.7. Limites da Ingestão de Amins Biogênicas em Alimentos

No Brasil não há uma regulamentação específica que estabeleça limites máximos aceitáveis para as BAs em alimentos e bebidas. No entanto, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece limites para a histamina em pescados, uma vez que essa amina é frequentemente associada a intoxicações alimentares graves, como o escombrotismo (Comas-Basté *et al.*, 2020). De acordo com a Resolução RDC N° 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA,

o limite máximo permitido de histamina em peixes da família Scombridae (como atum, cavala, sardinha, entre outros) é de 100 mg/Kg⁻¹. Este limite visa prevenir reações adversas em consumidores sensíveis. Portanto, a necessidade de estudo e controle dessas substâncias é evidente, uma vez que o consumo em quantidades superiores à tolerância do organismo pode resultar em efeitos adversos.

Segundo a European Food Safety Authority (EFSA, 2011), a histamina e a tiramina são as aminas biogênicas com maior grau de toxicidade, sendo consideradas prioritárias para o estudo de toxicidade. No entanto, diversos autores (Cardozo *et al.*, 2013; Comas-Basté *et al.*, 2020; Omer *et al.*, 2021; Comas-Basté *et al.*, 2020; Jaguey *et al.*, 2021; RYŠ *et al.*, 2022; Jakabová *et al.*, 2024) destacam a importância de investigar e avaliar os níveis de toxicidade de outras BAs. A Tabela 1 apresenta os limites sugeridos para diferentes alimentos, com base em dados da literatura, ressaltando a necessidade de um entendimento abrangente e regulamentação adequada para garantir a segurança alimentar.

Tabela 1 – Limites toleráveis de amins biogênicas utilizadas.

AMINA	LIMITES MÁXIMOS	ALIMENTO	REFERÊNCIA
Histamina	<100 mg kg ⁻¹ 25-50 mg/refeição em indivíduos saudáveis ≤ 2 mg/L de bebida alcoólica 200 mg/kg (perigo)	Vinho tinto, cervejas Peixe e produtos de peixe Produtos fermentados	(Linares <i>et al.</i> , 2010; Papageorgiou <i>et al.</i> , 2018; ANVISA, 2001) (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011)
Tiramina	< 100 mg/kg de alimento ≤ 600 mg/refeição para indivíduos saudáveis; ≤ 50 - ≤ 6 mg/refeição para indivíduos em tratamento com IMAO da 3 ^a geração e IMAO forma clássica respectivamente;	Produtos fermentados Queijos maturados Queijos maturados e produtos fermentados	(Halász <i>et al.</i> , 1994); (Silla, 1996) (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011); (Chang e Miles, 2004; RYŚ <i>et al.</i> , 2022; Jakabová <i>et al.</i> , 2024).
Espermina	30 mg/kg	Produtos cárneos fermentados	(Chang e Miles, 2004; Suzzi e Gardini, 2003);
Putrescina	< 900 mg/kg	Produtos cárneos fermentados	(Shalaby, 1996; Doeun, Davaatseren e Chung, 2017)
Triptamina	< 100 mg/kg	Queijos maturados	
Espermidina	50 – 100 mg/kg	Queijos, produtos cárneos	(Bulula, Mugoyela e Kaale, 2017; Coelho, 2012; Vasconcelos <i>et al.</i> , 2021)
Cadaverina	<900 mg/kg	Produtos cárneos	(Shalaby, 1996; Gomes <i>et al.</i> , 2014)
Aminas totais	100 mg/100 g de alimento 750-900 mg/kg de alimento	-	(EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011; Wójcik, Lukasiewicz e Boneca, 2021)
Aminas biogênicas	40 mg/refeição	-	(EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011)

Fonte: elaborado pelo autor.

De maneira geral, os limites estabelecidos para as BAs em alimentos servem como indicadores importantes, mas não determinam diretamente os efeitos ou o nível de intoxicação que podem causar no organismo. Esses efeitos variam conforme a capacidade antioxidante individual de cada pessoa. Portanto, a resposta tóxica às BAs depende significativamente das características metabólicas e da eficiência dos mecanismos de desintoxicação de cada indivíduo (Comas-Basté *et al.*, 2020; Ruiz-Capillas e Herrero, 2019).

1.3. COGUMELoS

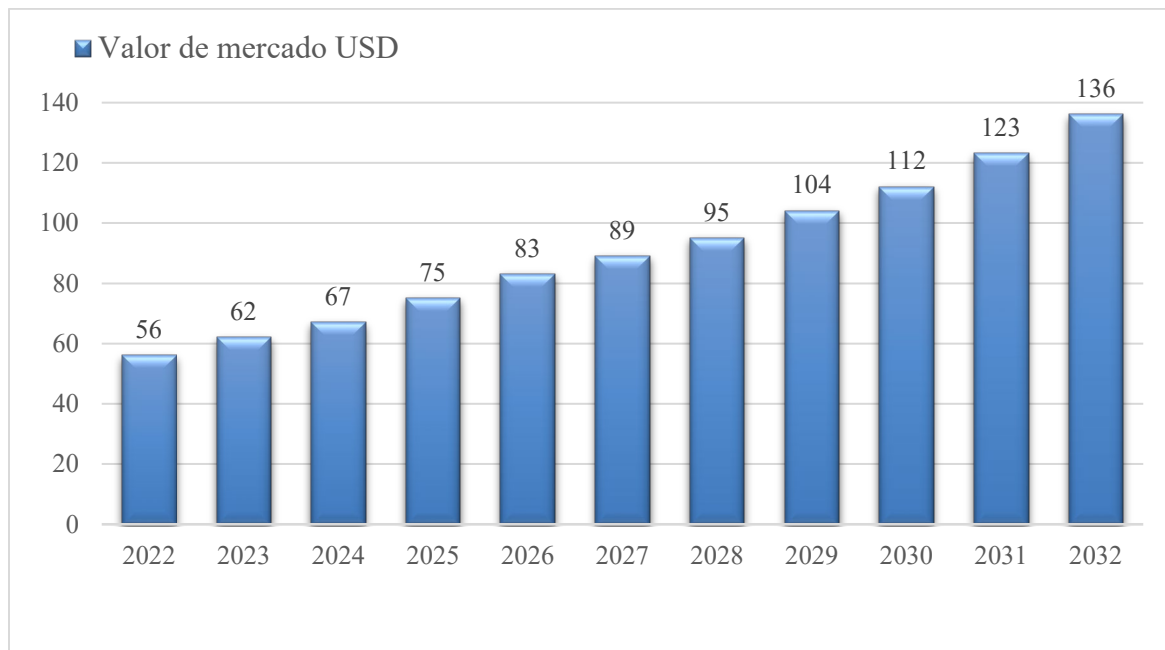
Os cogumelos são fungos macroscópicos compostos por um corpo frutífero, micélio e hifas, que se desenvolvem melhor em substratos úmidos. São alimentos conhecidos há milénios por seu elevado valor nutricional e pela sua potência medicinal, além de ser considerada uma especiaria nobre em pratos culinários. Atualmente sua utilização varia de acordo com a região, podendo ser utilizado como alimento ou para fins medicinais (ANPC, 2022)

O consumo de cogumelos remonta a civilizações antigas, datando de aproximadamente 600 a.C., e tem aumentado globalmente. De acordo com a (FAO, 2024), a China é o maior produtor mundial de cogumelos, com uma produção anual de aproximadamente 5.008.50 toneladas. A Itália segue em segundo lugar com 761.858 toneladas por ano, enquanto os Estados Unidos ocupam a terceira posição com 390.902 toneladas anuais. O Brasil, com uma produção anual de 12.000 toneladas, não figura entre os 10 maiores produtores mundiais (RODRIGUES e OKURA, 2022).

Este aumento no consumo pode ser atribuído aos benefícios nutricionais e medicinais dos cogumelos, que incluem propriedades antioxidantes, reforço do sistema imunológico e baixo teor de sódio e gordura (Kalač, 2009). Estes fatores têm impulsionado a inclusão de cogumelos nas dietas diárias em várias partes do mundo, contribuindo para a expansão do mercado global de cogumelos (Kalač, 2009; REIS, 2014; Jakabová *et al.*, 2024).

As projeções do mercado global dos cogumelos feitos de 2022 a 2032 (10 anos), indicaram um crescimento notório ao longo dos anos com USD 56 bilhões em 2022 e USD 136 bilhões em 2032, como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Projeção do mercado global do cogumelo em USD Biliões até 2032.



Fonte: Statista, 2024.

Existem aproximadamente 2000 espécies de cogumelos comestíveis conhecidas, e cerca de 25 delas são cultivadas para a comercialização (COUTINHO, L. N. 2001). Dentre estes, destacam-se o champignon-de-paris (*Agaricus bisporus*), cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) e Shiitake (*Lentinula edodes*) como os mais consumidos a nível mundial com 77%, 22.1% e 0.2% respectivamente (RODRIGUES e OKURA, 2022).

No Brasil a produção do cogumelo ainda é reduzida em comparação com a China, Estados Unidos, Itália, Índia entre outros, dessa forma, a demanda do país é suprida por cogumelos importados da China (ANPC, 2021). A Tabela 3 ilustra uma síntese dos dados sobre o consumo de cogumelos no Brasil.

Tabela 2 - Consumo de cogumelos por espécie no Brasil.

Espécie	% de Consumo	Referência
Champignon-de-paris <i>(Agaricus bisporus)</i> ,	88,0 72.9	(RODRIGUES e OKURA, 2022) (Silva <i>et al.</i> , 2017)
Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	9.0 10.2	(Duprat e Souza, 2003) (Silva <i>et al.</i> , 2017)
Shimeji (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	22.1 21.0	(Mayett Y. <i>et al.</i> , 2006) (RODRIGUES e OKURA, 2022)
Cogumelo Piedade (<i>Agaricus blazei</i>)	3.0 6.7	(RODRIGUES e OKURA, 2022) (Silva <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Elaborado pelo autor.

1.3.1. Aminas Biogênicas em Cogumelos

Os cogumelos são alimentos ricos em proteínas, minerais, aminoácidos essenciais, vitaminas e fibras, qualificando-os como alimentos funcionais. Estas características nutricionais fazem dos cogumelos um meio favorável para o crescimento de microrganismos com atividade descarboxilase, que podem produzir aminas biogênicas (Furlani e Godoy, 2007; RODRIGUES e OKURA, 2022). Além disso, o valor funcional dos cogumelos é amplamente reconhecido por suas propriedades antioxidantes, imunomoduladoras e pela presença de compostos bioativos que contribuem para a prevenção de doenças crônicas, destacando-se como um componente valioso na alimentação saudável e na promoção do bem-estar geral (Chang e Miles, 2004).

Estudos mostram que as aminas encontradas em cogumelos são a putrescina, cadaverina, histamina, espemidina, espermina, tiramina e triptamina (Dos Reis *et al.*, 2015; Coelho, 2012; Dadáková *et al.*, 2009; REIS, 2014). A Tabela 3 ilustra a relação das aminas encontradas nas espécies de cogumelos mais consumidas.

Tabela 3 - Relação de aminas biogênicas encontradas em cogumelos.

Espécie	Aminas encontradas	Referência
Champignon-de-paris <i>(Agaricus bisporus)</i> ,	Tiramina	(Kalač, 2009; Dadáková et al., 2009; Jakabová et al., 2024).
	Triptamina	
	Putrescina	
	Histamina	
	Espermidina	
	Espermina	
Cogumelo ostra (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	Tiramina	(Furlani & Godoy, 2007; Kalač, 2009; Dadáková et al., 2009; REIS, 2014; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011)
	Espermina	
	Triptamina	
	Cadaverina	
Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	Tiramina	(Dadáková et al., 2009; REIS, 2014)
	Espermidina	
	Cadaverina	
Shimeji (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	Tiramina	(REIS, 2014; Coelho, 2012; Dadáková et al., 2009; Kalač, 2009; Jakabová et al., 2024)
	Feniletilamina	
	Triptamina	
	Putrescina	
	Cadaverina	
	Histamina	
Cogumelo Piedade (<i>Agaricus blazei</i>)	Espermidina	(REIS, 2014; Kalač, 2009; Dadáková et al., 2009)
	Triptamina	
	Putrescina	
	Cadaverina	

Fonte: elaborado pelo autor.

1.3.1.1.Importância do Estudo de Aminas Biogênicas em Cogumelos

Os cogumelos estão cada vez mais presentes nas refeições de famílias ao redor do mundo, impulsionados pela crescente tendência do vegetarianismo, que tem se consolidado globalmente nos últimos anos. Esse movimento é motivado por fatores como a preocupação com a saúde,

sustentabilidade ambiental e ética animal (Mendonça da Costa Birchal, Cunha Moura e Vasconcelos, 2025). Países da Europa Ocidental, como Alemanha e Reino Unido, apresentam taxas de vegetarianismo que variam entre 10% e 14% da população, enquanto na Índia, onde a prática tem raízes culturais e religiosas, estima-se que cerca de 30% da população adote essa dieta (Chard *et al.*, 2024).

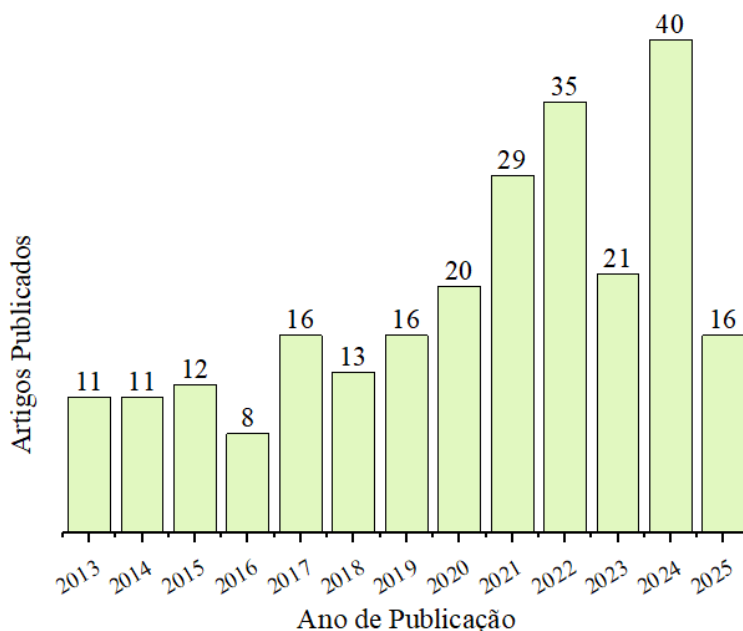
No Brasil, o crescimento do vegetarianismo tem sido notável nas últimas décadas. Dados de 2021 do Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE) indicam que cerca de 14% da população brasileira se declara vegetariana, o que representa aproximadamente 30 milhões de pessoas. Esse aumento reflete não apenas uma maior conscientização sobre os impactos ambientais da produção de carne, mas também uma mudança nos padrões de consumo, com a ampliação da oferta de produtos à base de vegetais no mercado nacional.

Um dos principais desafios enfrentados por vegetarianos e veganos é a obtenção adequada de proteínas, uma vez que a carne é tradicionalmente vista como a principal fonte desse nutriente (Leitão *et al.*, 2024). Nesse contexto, os cogumelos têm ganhado destaque como uma alternativa viável e nutritiva. Embora os cogumelos não sejam considerados uma fonte de proteína completa, pois não contêm todos os aminoácidos essenciais em proporções ideais, eles oferecem proteínas de alta qualidade, além de serem ricos em fibras, vitaminas do complexo B e compostos bioativos com propriedades antioxidantes e imunomoduladoras (Chang e Miles, 2004).

A segurança e a qualidade dos alimentos são fundamentais para sua comercialização e consumo, dado que intoxicações, doenças e até mortes causadas pelo consumo de alimentos contaminados têm sido relatadas globalmente. Isso faz com que as pessoas se tornem mais vigilantes em relação a eventos que possam ter consequências locais e internacionais (Dos Reis *et al.*, 2015; Jabłońska-Rys *et al.*, 2020; Jakabová *et al.*, 2024).

Essa crescente preocupação, aliada ao crescimento da produção dos cogumelos, tem incentivado um aumento no interesse acadêmico pelo estudo dos cogumelos, levando a um crescimento significativo na produção de trabalhos científicos sobre o tema (Figura 5).

Figura 5 - Representação gráfica do número de produções dos últimos 13 anos sobre cogumelos e aminas biogênicas.



Fonte: elaborado pelo autor; acervo da base de dados *Web of Science* utilizando “*biogenic amines and mushrooms or bioactive compounds and mushrooms*”, como palavras-chave.

Pesquisadores estão focados em identificar e mitigar os riscos microbiológicos associados ao consumo de cogumelos, além de explorar suas propriedades nutricionais e benefícios à saúde, contribuindo assim para um consumo mais seguro e informado desses alimentos funcionais (Jabłońska-Ryś *et al.*, 2020).

Para ilustrar as interconexões nas pesquisas sobre cogumelos, foi gerado um segundo mapa bibliométrico utilizando dados textuais extraídos dos resumos e títulos da mesma bibliografia, abrangendo o período de 2013 a 2025, com base na *Web of Science* (Figura 6). Esse mapa, desenvolvido por meio do software *VOSviewer* (van Eck e Waltman, 2020), destaca a centralidade do termo “*mushroom*”, evidenciando a relevância crescente dos estudos sobre cogumelos e suas múltiplas interconexões com diferentes áreas do conhecimento. Dentre os termos analisados, observa-se a incidência significativa da palavra “*histamine*”, indicando que essa amina é a de maior recorrência nos estudos avaliados. Essa informação sugere um interesse predominante na histamina em pesquisas sobre cogumelos, possivelmente devido ao seu potencial impacto na

segurança alimentar e na saúde humana. Além disso, a relação de "mushroom" com termos como "toxic compound" e "food toxin" reforça a necessidade de investigações sobre a presença e os efeitos das amins biogênicas nesses organismos, com implicações diretas para o consumo e regulamentação de produtos fúngicos comestíveis.

Figura 6 - Mapa bibliométrico de coocorrência de palavras constantes no título e resumo da bibliografia utilizada.



Legenda: Base de dados – *web of Science*; palavras-chave - “*biogenic amines and mushrooms or bioactive compounds and mushrooms*”; filtros – 2013 a 2025, área de pesquisa, química analítica, ciência de alimentos, biotecnologia e microbiologia aplicada, bioquímica molecular; artigos retornados – 77; tipo de análise – coocorrências; unidade de análise – dados do texto (título e resumo); ocorrência – mínimo de 10 ocorrências. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Um aspecto curioso observado na análise bibliométrica é a presença da palavra-chave "antennal lobe", que se refere à principal estrutura do cérebro de insetos responsável pelo processamento de informações sensoriais. Essa estrutura apresenta uma conexão com a histamina, um neurotransmissor que, juntamente com a octopamina e a dopamina, desempenha um papel fundamental na neurotransmissão no lobo antenal. Além disso, o gráfico destaca o termo "food" (alimento), que está diretamente relacionado ao comportamento de forrageamento de insetos, como as abelhas. A sensibilidade gustativa modulada por BAs permite que esses insetos detectem e selecionem fontes alimentares de alta qualidade, como néctar rico em açúcares. A relação entre

insetos e cogumelos pode ser explicada pelo hábito micetófago de algumas espécies, que se alimentam de fungos, destacando a importância ecológica e nutricional dos cogumelos na cadeia alimentar.

Este mapa enfatiza os esforços científicos no estudo de compostos tóxicos nos alimentos e nos cogumelos em particular.

1.4. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS E PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO EM COGUMELOS

A determinação de BAs e o preparo de amostras são procedimentos importantes em análises químicas, particularmente na indústria de alimentos e em pesquisa biomédica. As BAs presentes em alimentos podem ser separadas e determinadas por diversas técnicas analíticas. Dentre as mais utilizadas, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC) e cromatografia em camada delgada (*Thin Layer Chromatography*, TLC), conforme descrito por Dadáková, Křížek e Pelikánová (2009), Coelho (2012) e Reis (2014). Recentemente, a eletroforese capilar (CE) tem ganhado relevância como uma técnica alternativa para a separação e determinação dessas aminas em diferentes matrizes (Kubáň e Kubáň, 2023; Jakabová, Árvay, et al., 2024).

Ao comparar essas técnicas, a HPLC é amplamente reconhecida por sua alta sensibilidade e capacidade de análise de compostos em concentrações muito baixas, sendo ideal para amostras complexas (Dadáková et al., 2009). A CG, por sua vez, apresenta excelente resolução para compostos voláteis e termicamente estáveis, mas exige uma etapa de derivatização para aminas não voláteis, o que pode aumentar o tempo de preparo (Papageorgiou *et al.*, 2018). Já a TLC é uma técnica simples e econômica, mas com menor precisão e sensibilidade, geralmente usada para análises qualitativas ou como método de triagem (Papageorgiou *et al.*, 2018). A CE destaca-se pela alta eficiência de separação, permitindo resolver compostos quimicamente semelhantes com o uso de capilares estreitos e campos elétricos intensos (Li *et al.*, 2024). Ela requer menor volume de amostras e reagentes, sendo mais sustentável e econômica em comparação com técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (Gupta, Kurmi e Patel, 2023; Li *et al.*, 2024). Sua flexibilidade permite ajustar parâmetros facilmente, otimizando a análise de diferentes BAs e permitindo a detecção simultânea de múltiplos analitos (Li *et al.*, 2024). Além disso, a CE assim como a HPLC, é altamente automatizável e compatível com tecnologias avançadas, como a

espectrometria de massa, o que aumenta a sensibilidade e a especificidade, tornando-a ideal para laboratórios que buscam eficiência e precisão (Kubáň e Kubáň, 2023; Böhm, 2024). Apesar da CE ser uma técnica difundida para a determinação de BAs, não foram encontrados registros de trabalhos descritos na literatura utilizando a CE para a determinação de BAs em amostras de cogumelos.

De uma forma geral, a preparação das amostras de cogumelos utiliza uma extração ácida. Os ácidos mais utilizados são o tricloroacético (TCA) ou ácido clorídrico (HCl) para processos de *clean up*. O uso de TCA (5% ou 10 % v/v) é um procedimento amplamente empregado devido à sua eficácia na desnaturação de proteínas, facilitando a liberação e posterior quantificação das BAs presentes nas amostras (Dadáková, Křížek e Pelikánová, 2009; Coelho, 2012; REIS, 2014; RYŠ *et al.*, 2022). O uso de 1 mol L⁻¹ de HCl para extração também tem sido relatado na literatura para a extração de BAs em amostras de alimentos (Dos Reis, Custódio e Glória, 2015).

Um dos desafios contínuos na análise de BAs em alimentos como os cogumelos por CE é a complexidade da matriz alimentar, que pode interferir na separação e detecção das amins (Li *et al.*, 2024). Para mitigar esse problema, diversos estudos têm explorado diferentes estratégias de pré-tratamento da amostra e métodos de derivatização das BAs para aumentar a sensibilidade e seletividade da técnica (Vasconcelos *et al.*, 2021; Gupta, Kurmi e Patel, 2023; Li *et al.*, 2024).

Além disso, a combinação da CE com diferentes tipos de detecção, como detecção de fluorescência induzida por laser (LIF) e espectrometria de massas (MS), tem permitido avanços significativos na sensibilidade e especificidade da análise de BAs (Böhm, 2024; Li *et al.*, 2024). Estudos descritos na literatura (Xiao *et al.*, 2017) mostraram que, com a CE-LIF, foi possível alcançar limites de detecção extremamente baixos, na ordem de picomolares, para amins como a histamina em conservas de peixe. Já a combinação da CE-MS, discutida por (Böhm, 2024), mostrou-se promissora para a análise de amins em vinhos, permitindo não apenas a quantificação precisa, mas também a identificação estrutural das amins presentes.

O desenvolvimento tecnológico na área também possibilitou que a CE fosse aplicada em uma variedade de alimentos, desde produtos fermentados como queijos e embutidos até bebidas alcoólicas e frutos do mar (Gupta, Kurmi e Patel, 2023; Kubáň e Kubáň, 2023; Li *et al.*, 2024). Pesquisas indicam que os limites de detecção para as amins variam significativamente

dependendo da técnica e do tipo de alimento analisado, mas, de forma geral, a CE tem demonstrado ser uma ferramenta robusta para a análise de BAs em diferentes matrizes alimentares (Tabela 2).

Tabela 4 - Métodos analíticos desenvolvidos para análise de aminas biogênicas em alimentos.

Amostra	Técnica Utilizada	Eletrólito	Aminas	Derivatização	LOD	Referência
Folha de tabaco	CE-LIF	25 mmol/L de borato (pH 9,35), 40 mmol/L SDC, 10% acetoneitrila	PUT, HIS, CAD, TIR, TRIP, 2-FENL, ESP, ESPM	3-(2-Furoil)quinolina-2-carboxaldeído	0,5 - 10 nmol/L ⁻¹	(Liu, Yang e Lu, 2003)
Molho de soja Queijo Vinho	CE-LIF	25 mmol/L de borato (pH 9,35), 40 mmol/L SDC, 10% acetoneitrila	HIS, TIR, CAD, PUT, TRIP	Isotiocianato de fluoresceína isômero I (FITC)	N/I	(Liu, Yang e Lu, 2003)
Cerveja e vinho	CE – MS/MS	0.5 M ácido acético (pH 2.5)	PUT, CAD, HIS, TIR, TRIP, FENL, UROC	N/A	1 - 2 µg/L ⁻¹	(Daniel <i>et al.</i> , 2015)
Cerveja	CE – UV	Borato 10 mM + β-ciclodextrina 10 mM, pH 4.5	PUT, CAD, HIS, TIR, TRIP	N/A	0,36 - 3,67 µmol/L ⁻¹	(He <i>et al.</i> , 2017)
Cerveja, Vinho, Salame e Queijo	CZE - DC	15 mM istidina + 5 mM ácido adípico + 1,5 mM ácido sulfúrico + 0,1 mM ácido etilenodiaminotetracético + 0,1% hidroxietilcelulose + 50% metanol	CAD, PUT, AGM, HIS, TRI TIR	N/I	2 – 5 µmol/L ⁻¹	(Kvasnička e Voldřich, 2006)
Carne enlatada	CE – IND	20,0 mM imidazol, 8,0 mM β-cd 0,5 mM ácido etilenodiaminotetraacético e 6,0% MEOH, pH = 4,5	SPD, SPM, PUT, HIS, CAD, TIR e EA	N/A	0,14 – 1,98 mg/L	(Wang, Xu e Yang, 2022)
Arroz, Licor, soja e tofu.	CE – DAD	20 mM Imidazol + 1 mM EDTA + 8 mM β-CD + 5% MeOH, pH=4,5	PUT, HIS, CAD, SPD, SPM, TRI, TIR	N/A	N/I	(De Yixuan <i>et al.</i> , 2023)
Carne de porco e Camarão	MSPD - CE	20 mM Ácido fórmico, 50% v/v MEOH, pH=4,0	HIS, PEA. TRI, TIR	N/A	0,03 - 0,19 mg/kg ⁻¹	(He, Nie e Dong, 2024)

Vinho	CE – LIF	25 mM solução borato, pH = 10,5	HIS, SPM, SPD, CAD, PUT, PHE	FTIC (1:10)	0,01 - 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	(Feng <i>et al.</i> , 2008)
Arroz, Vinagre e Licor	CE – MSPE	20 mM Imidazol + 1 mM EDTA + 8 mM β -Cd + 5% MEOH, pH=4,5	PUT, HIS, CAD, SPD, SPM, PHE, TIR, TRI	N/A	1,0 – 6,1 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$	(Fan <i>et al.</i> , 2023)
Cerveja e Vinho	CZE-MS	500 mM Ácido acético, pH=2,5	CAD, PHE, PUT, SPD, TRI, TIR	N/A	N/I	(Daniel <i>et al.</i> , 2015)
Kefir, Queijo e Iogurte	CE-C ⁴ D	500 mM Ácido α -hidroxi-isobutírico, pH 2,05	CAD, HIS, PUT, SPD, TIR	N/A	N/I	(Adimcilar, Öztekin e Bedia Erim, 2017)
Ração de peixe	CE-LIF	50 mM Borato, pH=9,3	GIZ	FITC	0,03 – 2,11 ng/mL^{-1}	(Xiao <i>et al.</i> , 2017)
Cerveja	Microchip - CE	20 mM Fosfato, pH=2,5	TRI, HIS, ETL, ETN	N/A	1 – 2,8 ng/L^{-1}	(Dossi <i>et al.</i> , 2011)
Vinho	CZE	20 mM Potássio, pH=6	HIS, PHE, TIR	N/A	1,1 – 7 ng/L^{-1}	(Ginterová <i>et al.</i> , 2012)
Cerveja e Vinho	CE-ITP Condumet rico	5 mM Ba(OH) ₂ + 15 mM valina + 1% hidroxietilcelulose, pH=8,5.	TRI, TIR, PUT, SPD, CAD, HIS, PHE	N/A	N/I	(Jastrzębska, A e Szlyk, 2014)
Queijo e Iogurte	CZE - UV	120 mM Ácido fosfórico, pH=2,5	CAD, HIS, PUT, TRI, TIR	DNS-CL	5 – 10 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$	(Mantoanelli, Gonçalves e Pereira, 2020)
Uvas	CE - MS	100 mM Ácido fórmico	CAD, DET, HIS SPM, SPD, PHE, M, PUT	N/I	3,1 – 25 ng/L^{-1}	(Woźniakiewicz <i>et al.</i> , 2018)

Pepino	CE -MS	2,5 mM ácido acético, pH=3,5	HIS, PUT, CAD SPM, SPD, TIR, TRI, PHE, DOP, NE	N/I	0,2 – 1,5 µg /L ⁻¹	(Guo, Guo e Chen, 2019)
--------	--------	---------------------------------	---	-----	-------------------------------	----------------------------

Legenda: MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DHPG: diidroxifenilglicol; 5-HT: 5-hidroxitriptamina; C4D: detecção condutométrica sem contato; CAD: cadaverina; CAR: carnosina; CE: eletroforese capilar; CZE: eletroforese capilar em zona; FITC: isotiocianato de fluroesceína; GIZ: gizzerosina; DA: dopamina; E: epinefrina; ETL etilamina; ETN: etanolamina; FITC: isotiocianato de fluroesceína; GIZ: gizzerosina; HIS: histamina; ITP: isotacoforese; LIF: fluorescência induzida por laser; MECK: cromatografia eletrocínética micelar; MS/MS: espectrometria de massa em tandem; M: metanefrina; NM: normetanefrina; NE: norepinefrina; NQS: 5 – HT: Serotina; 1,2-naftoquinona-4-sulfonato; EA: Etanolamina; OA: octopamina; PHE: feniletilamina; PUT: putrescina; SPD: espermidina; SPM: espermina; TRIS: α,α,α -tris(hidroximetil)aminometano; TRI: triptamina; TIR: tiramina; VMA: ácido vanililmandelico; HVA: ácido homovanílico; UV: ultravioleta; N/A: Não aplicável; N/I: Não indicado.

1.5. ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE) é amplamente reconhecida como uma técnica eficaz para a separação de diferentes classes de compostos e está baseada no transporte de espécies eletricamente carregadas em um meio líquido sob a influência de um campo elétrico (Gupta, Kurmi e Patel, 2023). A separação ocorre no interior de capilares com dimensões que podem variar de 25 a 100 μm de diâmetro interno e de 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com uma solução tampão ou eletrólito de corrida (Tavares, 1997; Weinberger, 2000). Uma das grandes vantagens da CE é sua compatibilidade com os princípios da química verde (baixo consumo de amostras, baixa geração de resíduos, redução de derivados, baixo risco de acidentes e vazamentos), tornando-a uma técnica sustentável. A CE é capaz de separar uma ampla quantidade de analitos que podem variar desde pequenos íons até macromoléculas o que demonstra sua eficácia e versatilidade na análise de diferentes analitos (Kostal, Katzenmeyer e Arriaga, 2008). Cabe mencionar que a CE não só promove a eficiência analítica como também minimiza o impacto ambiental, alinhando-se às práticas sustentáveis modernas.

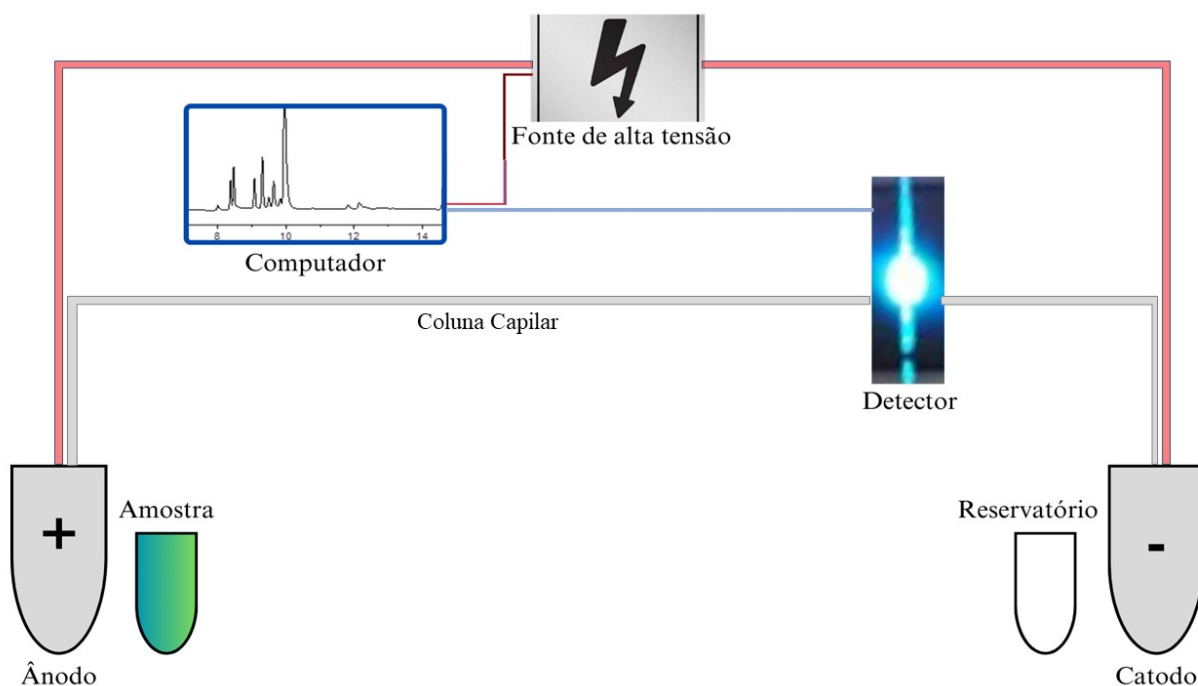
Os fundamentos básicos CE envolvem a aplicação de uma diferença de potencial entre dois eletrodos em uma solução iônica, o que resulta no transporte de corrente elétrica conduzida pelos íons presentes na solução. O transporte de corrente está diretamente relacionado às características dos íons, como carga, massa e raio efetivo, onde íons menores com maiores cargas possuem mobilidades elevadas, resultando em um maior transporte de corrente (Spudeit, Dolzan e Micke, 2012). Entretanto, a CE não é uma técnica de separação simples, sua complexidade supera até mesmo a HPLC. Enquanto a HPLC pode ser complexa devido às diversas tecnologias instrumentais envolvidas, uma vez ajustado, o processo cromatográfico tende a fluir sem necessidade de modificações subsequentes. Em contraste, a CE exige a otimização de múltiplos parâmetros para alcançar uma separação eficaz, tornando-se uma técnica mais desafiadora de implementar e ajustar (Jager e Tavares, 2001).

A CE está baseada na mobilidade iônica e na geração de um fluxo eletrosmótico (EOF). Esse fluxo é mantido pela interação do eletrólito de corrida com a diferença de potencial nos eletrodos, ao longo do capilar e com a superfície de carga interna do capilar. Essa corrente deve possibilitar a migração adequada dos analitos até o detector em um tempo específico. O sinal resultante no detector é representado como um eletroferograma, um gráfico que mostra a relação

entre o tempo e a intensidade dos componentes de uma mistura separada por eletroforese em um meio de suporte, neste caso, o capilar de sílica fundida (Beckers e Bocek, 2003; Tavares, 1997).

A representação simplificada do processo de CE é apresentada na Figura 7, que ilustra a migração dos analitos dentro de uma coluna capilar de sílica fundida. As extremidades dessa coluna são inseridas em dois reservatórios, denominados "vials", contendo um eletrólito adequado, geralmente uma solução tampão. A coluna capilar é preenchida com a solução tampão de um dos reservatórios, e os eletrodos de platina estabelecem o contato elétrico entre o capilar e a fonte de alta tensão (Ali, Aboul-Enein e Gupta, 2006). Após a introdução da amostra, aplica-se uma tensão elétrica ao longo da coluna para efetuar a separação dos compostos de interesse. Próximo ao reservatório de saída, um sistema de detecção está conectado a um computador equipado com software especializado para a aquisição e tratamento dos dados. O controle térmico é mantido acondicionando o capilar em um cartucho, por meio do qual circula ar ou líquido para manter a temperatura constante (Tavares, 1997; Steiner. *et al.*, 2009).

Figura 7 – Representação do sistema de eletroforese capilar (CE).



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de (ALTRIA, 1996).

1.5.1. Introdução da Amostra

A amostra pode ser introduzida no capilar por métodos electrocinéticos ou hidrodinâmicos. A injeção electrocinética envolve a criação de um gradiente de potencial ao longo do comprimento do capilar por um período determinado. Por outro lado, a injeção hidrodinâmica utiliza um gradiente de pressão, estabelecido por pressurização, vácuo em um reservatório, ou por gravidade, elevando um reservatório em relação ao outro, com a amostra sendo introduzida por sifonagem (ALTRIA, 1996)

Durante a injeção electrocinética, a introdução da amostra no capilar é resultado da combinação das velocidades electroforética e electrosmótica. A quantidade de matéria injetada depende da mobilidade electroforética do soluto, das condutividades da amostra e do meio condutor, assim como da magnitude do fluxo electrosmótico. No entanto, esse método pode resultar em amostragem não representativa, especialmente quando a amostra contém solutos de baixa mobilidade, próximos aos limites de detecção. Esse tipo de injeção é comumente aplicado na electroforese capilar em gel (Tavares, 1997).

Na injeção hidrodinâmica, introduz-se uma alíquota representativa da composição do soluto, no capilar. O tempo de injeção, viscosidade da solução tampão, diferença de pressão estabelecida e dimensões do capilar, são fatores determinantes do volume da injeção (nL) (Beckers e Bocek, 2003). Por ser baseada estritamente na transferência de volume, a injeção hidrodinâmica é mais precisa que a electrocinética (Tavares, 1997).

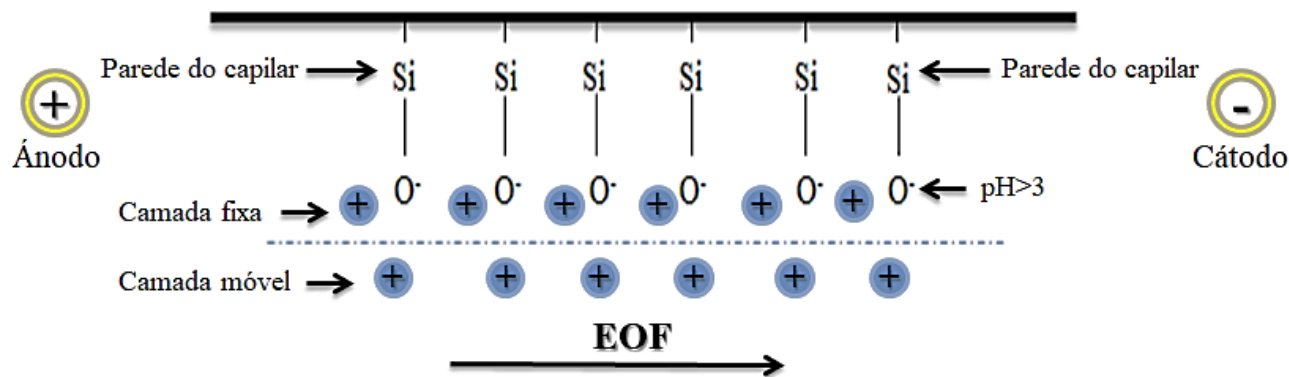
A escolha da introdução das amostras no capilar é uma etapa muito importante pois resultados interpretados inadequadamente podem surgir caso haja falhas nesse processo. A reprodutibilidade dos resultados está diretamente relacionada à precisão da técnica de injeção (Tavares, 1997).

1.5.2. Princípios de Separação: O Eletrólito de Fundo e o Fluxo Electrosmótico

O fluxo electrosmótico (EOF) é gerado ao aplicar alta tensão a um capilar preenchido com um eletrólito, conhecido como eletrólito de corrida na CE. Esse fluxo ocorre quando o eletrólito de corrida, em pH superior a 3, interage com os grupos silanóis (SiOH) na superfície interna do capilar, perdendo um próton e tornando-se grupos silanoatos (SiO⁻) (Beckers e Bocek, 2003). A carga negativa resultante na parede interna do capilar desenvolve uma camada dupla de cátions ao

seu redor, produzidos pelo eletrólito de corrida (Figura 8). A camada interna de cátions é estacionária, enquanto a camada externa, menos atraída pela carga negativa, pode mover-se ao longo do capilar. Sob a influência do campo elétrico aplicado, os cátions livres movem-se em direção ao cátodo, criando um fluxo de íons (Weinberger, 2000; Beckers e Bocek, 2003).

Figura 8 – Representação do fluxo eletrosmótico no interior de um capilar de sílica fundida.



Fonte: elaborado pelo autor, adaptado de (DE QUEIROZ e JARDIM, 2018).

O EOF é controlado principalmente pelo pH do eletrólito, que afeta a ionização dos grupos silanóis. Em valores de pH abaixo de 2, a maioria dos grupos silanóis está protonado, o que reduz significativamente o EOF (ALTRIA, 1996). Para manter o EOF é essencial usar soluções tampão como eletrólito de corrida. As soluções tampão são compostas por ácidos ou bases fracas que podem aceitar ou doar prótons (H^+), o que ajuda a manter o pH do meio estável, mesmo com a introdução de um ácido ou base adicional. Alguns exemplos de tampões comumente usados em CE incluem fosfato, borato, citrato, acetato e Tris (trishidroximetilamino metano). Esses tampões desempenham um papel fundamental na garantia da estabilidade do pH e, portanto, do EOF durante a eletroforese capilar (Weinberger, 2000; Kostal, Katzenmeyer e Arriaga, 2008).

1.5.2.1. Fatores que Afetam a Separação em Eletroforese Capilar

Mudanças no EOF afetam de forma significativa as separações em CE. O efeito Joule é um fator significativo que influencia o EOF na eletroforese capilar. O efeito Joule ocorre quando correntes elétricas atravessam um meio condutor, gerando calor. Esse calor provoca gradientes de temperatura que podem afetar as propriedades do fluido e alterar o transporte de massa. Além disso, tanto a mobilidade eletroforética quanto o EOF são influenciados pela viscosidade do eletrólito de fundo, que varia com a temperatura. À medida que a temperatura aumenta, a

viscosidade diminui, tornando essencial manter uma temperatura uniforme dentro do capilar para mitigar o efeito Joule. Esse controle preciso da temperatura é crucial para garantir a estabilidade do EOF durante a eletroforese capilar (XUAN e LI, 2005).

Outros fatores importantes a serem considerados incluem intervalo de pH desejado, a estabilidade térmica e a transparência do solvente no comprimento de onda de trabalho (Solvent UV cut off). Em relação à transparência, é essencial observar que a absorção de radiação UV pelo tampão fosfato começa a se intensificar em concentrações superiores a 50 mmol L^{-1} , especialmente quando o comprimento de onda utilizado é de 205 nm. Isso implica que a concentração de tampão utilizada não deve exceder esse limite, caso contrário, afetaria a detecção em CE (Kostal, Katzenmeyer e Arriaga, 2008). No que diz respeito à temperatura, o Tris é sensível ao aumento da temperatura. A variação de temperatura pode causar variações no pH da solução de Tris, o que, por sua vez, pode afetar a seletividade de uma separação. Portanto, ao escolher um tampão, é importante considerar sua estabilidade térmica para evitar variações indesejadas no pH durante a análise, o que poderia comprometer os resultados das análises (XUAN e LI, 2005).

Independentemente dos ajustes de pH, concentração do eletrólito de corrida e espécies iônicas, a ordem de migração das substâncias durante a eletroforese capilar, em modo normal (injeção no anodo), será sempre a mesma, direcionando-se ao cátodo: primeiro os cátions primários, seguidos pelas espécies neutras e, finalmente, os ânions (ALTRIA, 1996). Para alterar essa ordem de migração, podem ser utilizados tensoativos catiônicos como modificadores do EOF ou pode-se recobrir o capilar, permitindo que os ânions sejam os primeiros a migrar (ALTRIA, 1996). Além disso, em equipamentos modernos, é possível inverter a polaridade do potencial aplicado, o que também permite a inversão da ordem de migração das substâncias. Essa funcionalidade é particularmente útil em aplicações que requerem controle específico da ordem de migração das espécies durante a CE (ZHANG *et al.*, 1997; František e Michal, 2006).

Um aspecto crítico é o controle da quantidade de solução nos frascos de entrada e saída, bem como nos frascos de amostra. É essencial evitar o enchimento excessivo desses frascos, pois, quando pressurizados, o excesso de líquido pode causar vazamentos, resultando em um potencial problema de fuga de corrente. Portanto, é necessário garantir que esses frascos sejam preenchidos de maneira adequada durante o processo de eletroforese capilar para evitar tais complicações (ZHANG *et al.*, 1997; XUAN e LI, 2005).

1.5.2.2. Tensão e Corrente Máxima

A velocidade eletrosmótica e a velocidade eletroforética em CE são diretamente proporcionais ao potencial elétrico aplicado, o que permite que tensões mais altas resultem em tempos de separação mais curtos (XUAN e LI, 2005). Contudo, o limite máximo de tensão suportado pelas tecnologias atuais é de 30 kV, devido ao efeito Joule, que pode causar aquecimento desigual no interior do capilar, e à resistência do eletrólito de corrida ao fluxo de corrente. Esses fatores podem levar à perda de resolução e, em casos extremos, à quebra do capilar. Portanto, é recomendável não operar no limite máximo de tensão e, em vez disso, determinar a tensão mais adequada para o sistema de CE, garantindo uma separação eficaz e precisa (Spudeit, Dolzan e Micke, 2012).

O monitoramento da corrente elétrica juntamente com o sinal do detector é de extrema importância na CE, pois a corrente deve ser mantida constante ao longo de todo o procedimento. Quedas ou oscilações da corrente podem ocorrer devido a diversos fatores, como a presença de ar nos frascos de amostra ou no eletrólito de corrida, níveis elevados de umidade, vazamentos de eletrólito de corrida no equipamento, alta condutividade na superfície do capilar ou mesmo um capilar quebrado. Uma queda de corrente causado por um capilar quebrado pode, em geral, resultar em uma descarga elétrica audível, levando à paralisação total do equipamento até que o capilar seja substituído. Portanto, é fundamental monitorar a corrente durante todo o processo de eletroforese capilar para identificar e corrigir prontamente quaisquer problemas de corrente que possam comprometer a qualidade da análise (ZHANG *et al.*, 1997).

1.5.3. Métodos de Detecção Empregados em Eletroforese Capilar

Os métodos de detecção empregados em CE são frequentemente adaptados, com pequenas modificações, da técnica de HPLC. A escolha do método de detecção apropriado envolve diversos critérios, como sensibilidade, seletividade, ruído e intervalo linear de concentração. Além disso, os detectores devem responder de forma independente ao tipo de solução utilizada, sem contribuir para o alargamento das bandas (Tavares, 1997).

Os detectores utilizados na CE e na HPLC são classificados em dois tipos principais: universais e específicos. Os detectores universais medem a diferença entre uma propriedade do soluto e a da solução, enquanto os detectores específicos medem uma propriedade particular do soluto. Na classe dos detectores universais, encontram-se os detectores de índice de refração e de

condutividade, além de outros que empregam métodos indiretos. Já os detectores específicos incluem aqueles baseados na absorção na região UV/VIS, fluorescência, espalhamento Raman, espectrometria de massa, amperometria e radiometria (Tavares, 1997; ZHANG *et al.*, 1997). A escolha adequada do detector é essencial para garantir a qualidade e a confiabilidade dos resultados analíticos, possibilitando avanços significativos na pesquisa e na aplicação prática dessas técnicas. Os detectores específicos são considerados mais vantajosos em relação aos universais, pois estes permitem que em casos em que a matriz da amostra é complexa, e desejando se minimizar interferências do *background*, apresentem melhores resultados favorecidos pelo seu alto nível de sensibilidade, e fornecem intervalos mais amplos de resposta linear, além de apresentarem melhor relação sinal/ruído (Weinberger, 2000). A Tabela 5 apresenta os detectores disponíveis para o sistema de CE.

Tabela 5 - Tipos de detectores e seus limites de detecção (LOD) instrumentais utilizados em eletroforese capilar (CE).

Técnica de detecção	Limite de detecção (LOD)
UV/VIS – direto	10^{-5} a 10^{-6}
UV/VIS – indireto	10^{-4} a 10^{-5}
Absorbância direta	10^{-5} a 10^{-8} (comprimento de caminho padrão)
Absorbância indireta	10^{-8} (comprimento de caminho estendido) 10^{-5} a 10^{-8}
Refração fototérmica	10^{-7} a 10^{-8}
LIF (Fluorescência induzida por laser) direta na coluna	$<10^{-13}$ 10^{-10} a 10^{-11} (nativa)
LIF pós-coluna	10^{-16} a 10^{-18} (molécula única)
LIF indireta	10^{-5} a 10^{-7}
Potenciométrico	10^{-6} a 10^{-8}
Condutividade	10^{-7} a 10^{-8}
Amperométrico	10^{-7} a 10^{-8}
Índice de refração	10^{-5}
Raman	10^{-6}
Radiofrequência (RMN)	10^{-3}
Radioisótopo	10^{-10}
Vibração capilar induzida por laser	10^{-8} (derivação química) 10^{-5} (nativa)

Fonte: elaborado pelo autor, modificado de (Tavares, 1997; Swinney & Bornhop, 2000; Önal, 2007; Adimcilar et al., 2017).

1.5.3.1. Detecção Direta

Um dos principais desafios associados à CE, é a sensibilidade de detecção, especialmente para analitos que não apresentam absorção significativa no ultravioleta (UV) ou fluorescência intrínseca como a maioria das BAs. Para contornar essa limitação, a detecção direta com derivatização fluorescente tem sido amplamente empregada, combinando alta seletividade e sensibilidade com a simplicidade operacional da detecção por fluorescência (ALTRIA, 1996).

Nesse contexto, a derivatização consiste na modificação química dos analitos com reagentes que introduzem grupos fluorescentes em sua estrutura, permitindo sua detecção direta por sistemas de fluorescência acoplados à CE. Os reagentes mais utilizados incluem ortoftaldeído (OPA), fluoresceína isotiocianato (FITC), 9-fluorenilmetil cloroformiato (FMOC-Cl), entre outros, que reagem com grupos funcionais específicos como aminas, tióis e ácidos carboxílicos (Böhm, 2024).

A derivatização pode ser realizada antes da separação (pré-coluna) ou, em sistemas mais avançados, dentro do capilar (on-line). A abordagem pré-coluna é mais comum devido à sua simplicidade, permitindo o controle das condições de reação antes da injeção da amostra (Gupta, Kurmi e Patel, 2023). Por outro lado, a derivatização on-line oferece vantagens como maior reprodutibilidade e minimização de perdas por adsorção ou degradação, sendo especialmente útil em análises de alto rendimento e automação (ALTRIA, 1996; Da Rosa et al., 2018)

A principal vantagem da detecção por fluorescência com derivatização é a alta sensibilidade, frequentemente alcançando limites de detecção na ordem de picomolar (pM) ou até femtomolar (fM), valores inferiores aos obtidos por detecção UV (Ali, Aboul-Enein e Gupta, 2006). Além disso, a fluorescência proporciona maior seletividade, reduzindo interferências da matriz e aumentando a confiabilidade da análise de amostras complexas, como fluidos biológicos, extratos alimentares e águas residuais (Mantoanelli, Gonçalves e Pereira, 2020).

Entretanto, a aplicação da derivatização fluorescente requer atenção a alguns fatores críticos, como o tempo de reação, o pH do meio, a estabilidade dos derivados e a compatibilidade do reagente com o eletrólito de fundo utilizado na separação (Mantoanelli, Gonçalves e Pereira,

2020). A escolha do reagente derivatizante deve considerar também a especificidade pela funcionalidade do analito e a intensidade da emissão fluorescente do derivado (Li *et al.*, 2024).

A detecção direta com derivatização fluorescente tem sido particularmente valiosa na análise de aminoácidos, peptídeos, drogas, micotoxinas, contaminantes emergentes e aminas biogênicas, contribuindo significativamente para o avanço da eletroforese capilar como técnica de separação de alto desempenho (Kostal, Katzenmeyer e Arriaga, 2008; Li *et al.*, 2024). Sua combinação com estratégias de pré-concentração e sistemas microfluídicos tem ampliado ainda mais suas aplicações em análises de traços e ambientes de diagnóstico rápido (DE QUEIROZ e JARDIM, 2018).

1.5.3.2. Detecção Indireta

Na detecção indireta, o composto de interesse não é diretamente responsável pelo sinal no detector, como o UV-Vis. O método se baseia no uso de um co-íon absorvente como componente principal do eletrólito de corrida. (Gupta, Kurmi e Patel, 2023). O co-íon apresenta forte absorção de UV ou emissão de fluorescência. À medida que os analitos migram no capilar, seus picos são observados devido as mudanças na absorção de luz que ocorre em função do deslocamento de carga do co-íon absorvente, criando "lacunas" no sinal medido, o que permite inferir a presença e concentração dos analitos (Fan *et al.*, 2023).

A escolha co-íon deve levar em consideração sua compatibilidade com o pH e a força iônica do eletrólito de corrida, além de possuir um coeficiente de absorção elevado para garantir sensibilidade adequada (Weinberger, 2000). Além disso, o método se destaca pela facilidade de ajustar o sinal detector por meio de modificações na composição do eletrólito, proporcionando flexibilidade para uma ampla variedade de BAs (Weinberger, 2000; Fan *et al.*, 2023).

Um dos pontos críticos no desenvolvimento de um método eficaz de detecção indireta é a escolha de um co-íon apropriado. Diversos compostos têm sido utilizados como co-íons em CE, como tampões com cromóforos, como o ácido 2,6-piridindicarboxílico (PDC), ácido ftálico e imidazol, todos capazes de criar um sinal de referência estável no espectro UV (Ali, Aboul-Enein e Gupta, 2006; He *et al.*, 2017; Jakabová *et al.*, 2024; Kaczmarczyk *et al.*, 2022)

O co-íon ideal deve apresentar uma absorção constante, evitando mudanças bruscas no sinal de fundo que possam interferir na detecção dos analitos. Além disso, a mobilidade eletroforética do co-íon deve ser diferente da dos analitos para que o deslocamento e as lacunas possam ser claramente identificados (Weinberger, 2000; Kaczmarczyk *et al.*, 2022).

A principal vantagem da detecção indireta é a capacidade de detectar compostos que não apresentam atividade cromófora ou fluorescente intrínseca, como é o caso de algumas BAs. Isso amplia o espectro de analitos que podem ser detectados por CE. Além disso, métodos indiretos permitem trabalhar com menores quantidades de amostra, o que é benéfico em estudos de controle de qualidade de alimentos, onde amostras limitadas podem estar disponíveis (Spudeit, Dolzan e Micke, 2012; Gubartallah *et al.*, 2018).

Entretanto, a detecção indireta apresenta limitações que devem ser cuidadosamente gerenciadas. Uma delas é a necessidade de selecionar um eletrólito de corrida que não interfira na separação dos analitos, algo que pode se mostrar desafiador em sistemas mais complexos (He *et al.*, 2017). Outro ponto importante é que a sensibilidade do método indireto é diretamente influenciada pela concentração e absorção do co-íon, o que exige otimizações frequentes para manter a qualidade do sinal (Gupta, Kurmi e Patel, 2023).

Nos últimos anos, avanços na otimização dos parâmetros da CE têm permitido aumentar a sensibilidade e a precisão da detecção indireta. Por exemplo, a introdução de modificadores no eletrólito de corrida, como tensoativos e ciclodextrinas, tem sido explorada para melhorar a seletividade do método (Kaczmarczyk *et al.*, 2022; Gupta, Kurmi e Patel, 2023). Esses avanços abrem novas possibilidades para a aplicação da CE na análise de compostos não cromóforos, aumentando seu uso em ambientes regulatórios e industriais.

1.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODO

A validação de métodos analíticos é uma etapa crucial na análise de compostos em amostras alimentares, garantindo exatidão e reprodutibilidade dos resultados obtidos (ICH, 2005). De forma geral, a validade de um método envolve diferentes parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (Shrivastava e Gupta, 2011).

1.6.1. Seletividade/Especificidade

A seletividade ou especificidade de um método refere-se à sua capacidade de diferenciar o analito de outros componentes presentes na matriz alimentar (ICH, 2005). No caso da CE, este parâmetro é especialmente relevante, visto que amostras de alimentos frequentemente contêm vários compostos que podem interferir na análise, como aminoácidos e outros produtos de manipulação de proteínas (Ali, Aboul-Enein e Gupta, 2006). A validação da seletividade pode ser feita comparando-se cromatogramas de amostras fortificadas com aminas biogênicas e amostras sem a adição de analitos (ICH, 2005; Kostal, Katzenmeyer e Arriaga, 2008).

1.6.2. Precisão

A precisão de um método é definida como a concordância entre resultados sucessivos, expressando a variabilidade do método em condições idênticas (Tavares, 1997). A precisão pode ser avaliada por meio de ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, onde os ensaios de repetibilidade envolvem uma análise repetida de uma amostra em três diferentes níveis de concentração (baixa, média e alta) ao longo de um único dia (n= 3), enquanto os ensaios de precisão intermediária abrangem análises em três diferentes níveis de concentração (baixa, média e alta) feitas em três dias consecutivos (n= 9) (Li *et al.*, 2024). Resultados precisos são essenciais para garantir que pequenas variações no procedimento experimental não afetem a quantificação dos solutos de interesse (ICH, 2005).

1.6.3. Exatidão

A exatidão refere-se à *proximidade* entre o valor obtido experimentalmente e o valor verdadeiro ou aceito como correto (ICH, 2005). A exatidão de um método analítico pode ser avaliada por meio de ensaios de recuperação que envolve a fortificação das amostras com quantidades conhecidas do analito de interesse (*spike*). As amostras são fortificadas com o analito de interesse em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método. As amostras fortificadas são submetidas ao processo de extração e comparadas com padrões de mesmas concentrações que não foram submetidas à extração. A recuperação é calculada com base na equação abaixo:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{A_{af} - A_{asf}}{A_{sp}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

A_{af} = área da amostra fortificada;

A_{asf} = área da amostra sem fortificação;

A_{sp} = área da solução padrão.

Um método validado deve demonstrar boas taxas de recuperação que podem variar de 80 – 110% (Li *et al.*, 2024).

1.6.4. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O LOD e o LOQ são parâmetros fundamentais para definir a sensibilidade do método (ICH, 2005; Shrivastava e Gupta, 2011). O LOD refere-se à menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada com precisão, enquanto o LOQ é a menor quantidade que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (Tavares, 1997; ICH, 2005). Pode ser feita utilizando sinal/ruído 3 e sinal ruído de 10 respectivamente (ICH, 2005) ou pela regressão linear da curva analítica de acordo com as equações abaixo:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_y}{b} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_y}{b} \quad (3)$$

Onde:

S_y = Desvio-padrão residual da regressão (ou erro padrão da resposta);

b = Inclinação da curva de calibração.

1.6.5. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito dentro de um intervalo de trabalho específico (Shrivastava e Gupta, 2011; Gupta, Kurmi e Patel, 2023). Para avaliar a linearidade de um método, diferentes soluções padrão em diferentes concentrações são preparadas, constrói-se uma curva analítica, e a linearidade é geralmente expressa pelo coeficiente de correlação (R), que quanto mais próximo do valor 1 maior a probabilidade de que exista uma relação linear definida entre as variáveis x e y (ICH, 2005; Kubáň e Kubáň, 2023).

2. OBJETIVOS

Considerando a presença de amins biogênicas em diferentes alimentos e sua toxicidade, torna-se importante o desenvolvimento de métodos e técnicas eficientes na determinação de amins biogênicas neste tipo de matriz. Devido a inexistência de informação sobre a utilização da técnica de eletroforese capilar para a determinação de amins biogênicas em cogumelos, o objetivo geral deste trabalho é desenvolver um método analítico para determinação e quantificação de amins biogênicas em amostras de cogumelos utilizando a técnica de eletroforese.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Avaliar diferentes metodologias de extração para cogumelos;
- ✚ Otimizar uma metodologia de CE para separação de amins biogênicas;
- ✚ Validar o método de CE estabelecido;
- ✚ Aplicar o método desenvolvido para avaliação qualitativa e quantitativa em amostras de cogumelos.

3. METODOLOGIA

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

As análises experimentais, foram feitas em um equipamento de eletroforese capilar, modelo G7100A da *Agilent Technologies*, equipado com um detector de arranjo de diodos (*Diode Array Detection* – DAD), com comprimento de onda no intervalo de 190 – 600 nm (UV-Vis), com sistema de controle de temperatura do tipo *Peltier* e respectivo programa de aquisição e processamento de dados.

Foram usados capilares de sílica fundida da *Polymicro Technologies, USA*, com 75 µm de diâmetro interno e 58,5 cm de comprimento, com janela de detecção de aproximadamente 0,3 cm, aberta a 50 cm do detector pela remoção do revestimento de poliamida do capilar por meio de aquecimento. As injeções foram feitas pelo modo hidrodinâmico.

Para garantir a reprodutibilidade, a estabilidade do sistema e a precisão dos resultados analíticos, o condicionamento dos capilares foi realizado no início de cada dia experimental. O procedimento envolveu a lavagem sequencial dos capilares com solução de hidróxido de sódio a 1,0 mol L⁻¹, seguida de enxágue com água ultrapura e, por fim, com o eletrólito de corrida, sendo cada etapa conduzida por 30 minutos. Essa estratégia permitiu a remoção de contaminantes e resíduos, a ativação da superfície interna do capilar, a estabilização do ambiente químico e a minimização de interações não específicas. Entre as análises, o condicionamento foi realizado com eletrólito de corrida por um período de 5 minutos.

3.2. SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES PADRÃO

Os solventes, reagentes e soluções padrão utilizados são de grau analítico, e a água ultrapura foi obtida pelo sistema *Millipore Milli-Uni-Direct Q® 3UV (18,2 MΩ cm-1)*. A descrição de todos os solventes, reagentes e soluções padrão utilizados estão na Tabela 6.

Todas as aminas biogênicas reagentes e soluções foram manuseados e armazenados segundo as indicações dos fabricantes até o momento da sua utilização.

Tabela 6 – Solventes, reagentes e soluções padrão utilizadas no experimento.

Aminas Biogénicas	Massa molar	Grau de pureza	Fabricante
Cadaverina	175,10	~98%	Sigma-Aldrich
Espermina	202,34	≥ 97%	Sigma-Aldrich
Espermidina	145,25	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Triptamina	196,68	99%	Sigma-Aldrich
Histamina	184,07	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Putrescina	161,07	≥ 98%	Chem-Cruz
Tiramina	173,64	98%	Alfa-Aesar
Benzilamina	107,15	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Trietilamina	101,19	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
1,7 Diaminoheptano	130,23	98%	Sigma-Aldrich
Dopamina	189,64	≥ 98%	Sigma-Aldrich
Reagentes			
Cloreto de dansila (DNS)	289,75	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Carbonato de sódio	105,99	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
Éter coroa	74,12	99%	Sigma-Aldrich
Tetraborato de sódio	381,37	99%	Dinamica
Dodecil sulfato de sódio	288,38	≥99%	Sigma-Aldrich
β - Ciclodextrina	1134,98	≥99%	Sigma-Aldrich
α – Ciclodextrina	972,84	≥99%	Sigma-Aldrich
Imidazol	68,08	≥99%	Sigma-Aldrich
EDTA	292,40	≥99,5%	Sigma-Aldrich
Ácidos-bases e solventes			
Ácido tricloacético (TCA)	163,39	≥99%	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico	97,99	≥85%	Merck
Ácido clorídrico	36,46	37%	Merck
Ácido adípico	174,20	99%	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	40,00	97%	Êxodo Científica
Acetonitrila (ACN)	41,05	99,8%	J. T Baker
Etanol	46,07	≥99%	Merck
Metanol	32,04	99,98%	Merck

Fonte: elaborado pelo autor.

3.3. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

3.3.1. Soluções Padrão das Aminas Biogênicas

As soluções padrão de BAs e do padrão interno (PI) foram preparadas individualmente. As soluções estoque de cada amina, foram preparadas dissolvendo 0,0100 g de cada BA em 100,0 mL ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹ (solução aquosa) e foram armazenadas sob refrigeração por até 1 mês. As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente diluindo-se a solução de estoque com a solução aquosa de HCl 0,1 mol L⁻¹.

3.3.2. Solução de Cloreto de Dansila (DNS) a 10 000 ppm

A solução derivatizante foi preparada dissolvendo 100,0 mg de cloreto de dansila em 10,00 mL de acetonitrila.

3.3.3. Solução de Ácido Tricloroacético (TCA) a 10%

A solução de ácido tricloroacético a 10% m/v, foi preparada dissolvendo 50,00 g de ácido tricloroacético em 500,0 mL de água ultrapura.

3.3.4. Solução de Imidazol

A solução de 100 mmol L⁻¹ de imidazol foi preparada dissolvendo 0,3404 g de imidazol em 50 mL de água ultrapura.

3.3.5. Solução de Éter Coroa

A solução de 200 mmol L⁻¹ de éter coroa foi preparada dissolvendo 3,725 g de éter coroa (Diciclohexil-18-coroa-6) em 50 mL de água ultrapura.

3.3.6. Soluções de α -cd e β -cd

As soluções de 5 mmol L⁻¹ de α -cd e β -cd foram preparadas dissolvendo 0,56749 g e 0,48642 g, respectivamente em 10 mL de água ultrapura.

3.3.7. Solução de EDTA

A solução de 10 mmol L⁻¹ de EDTA foi preparada dissolvendo 0,058448 g de EDTA em 20 mL de água ultrapura.

3.3.8. Solução de Ácido Adípico

A solução de 10 mmol L^{-1} de ácido adípico foi preparada dissolvendo 0,014614 g de ácido adípico em 10 mL de água ultrapura.

3.4. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE AGARICUS BISPORUS

As amostras de cogumelos frescos foram adquiridas em mercado local. Tendo sido analisadas três variedades diferentes, o *Hiratake*, *Champignon de Paris* e o *Porto Belo* (uma parte da amostra foi conservada em congelamento e a outra em refrigeração).

3.4.1. Extração

Dois métodos de extração foram avaliados, de modo a identificar o melhor método para a extração de amins em amostras de cogumelos: o primeiro método avaliado foi adaptado de (Dos Reis, Custódio e Glória, 2015) e (Adimeilar, Öztekin e Bedia Erim, 2017), que consistiu na lavagem e enxague das amostras em papel toalha, em seguida pesou-se 3 g da amostra de cogumelos previamente homogeneizada utilizando um mixer. Em seguida, foi adicionado 8 mL de TCA a 10% ou 5% v/v a amostra homogeneizada. A amostra foi mantida por uma hora em agitação (agitador magnético) e centrifugada a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi filtrado (*Minisart® RC25 Syringe Filter 0,22 μm*). A amostra foi mantida na geladeira por uma hora para a precipitação das proteínas, em seguida nas mesmas condições às anteriores, a solução foi centrifugada, e filtrada dentro de um balão de 10 mL e o volume completado com o ácido extrator. O segundo método baseou-se no descrito por (Rong, Zhongqi e Xue, 2022) e (Mantoanelli, Gonçalves e Pereira, 2020), em que se utilizou como ácido extrator o HCl nas concentrações de 1 mol L^{-1} e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O tratamento da amostra e procedimentos para extração foram os mesmos descritos no primeiro método.

3.4.2. Processo de Derivatização

A derivatização das BAs foi feita misturando 2 mL da solução padrão das amins, 0,8 mL de hidróxido de sódio a 6 mol L^{-1} e 2 mL de cloreto de dansila. As misturas foram mantidas ao abrigo da luz durante 5 min, e a fase orgânica foi injetada no equipamento (Mantoanelli, Gonçalves e Pereira, 2020).

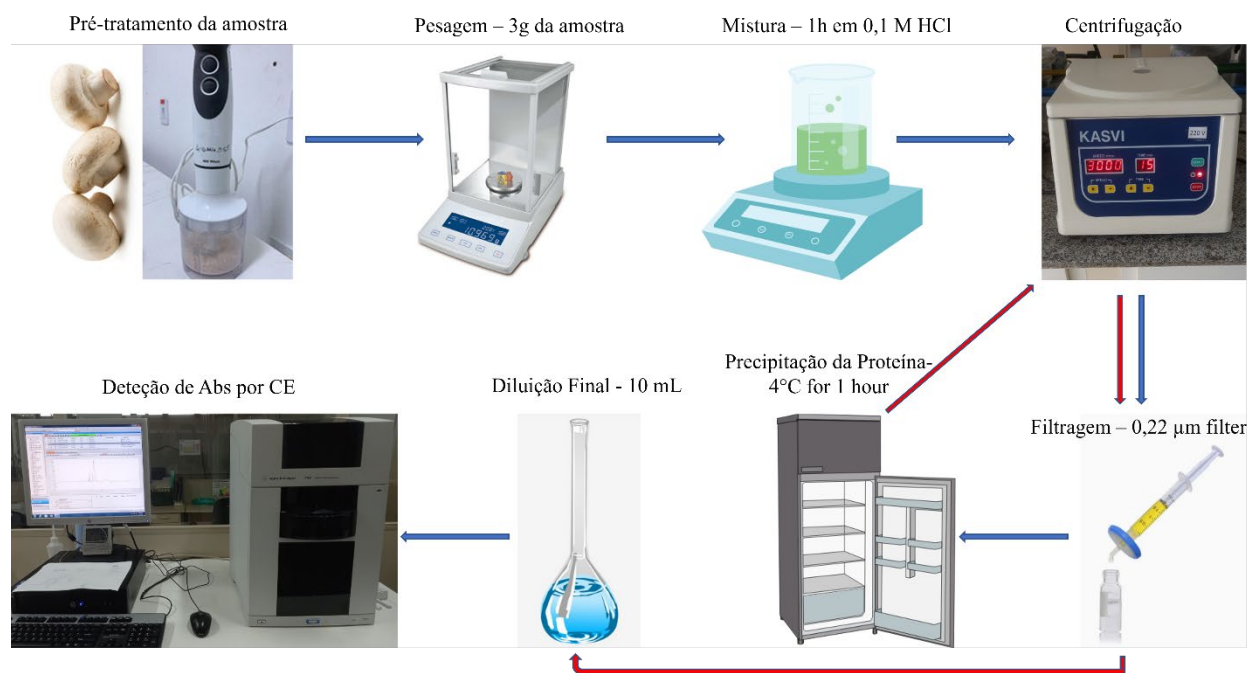
3.5. VALIDAÇÃO

A validação foi feita obedecendo as regras do (ICH, 2005), observando os parâmetros da seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. A validação foi feita conforme descrito na secção 1.6.

3.6. FLUXOGRAMA

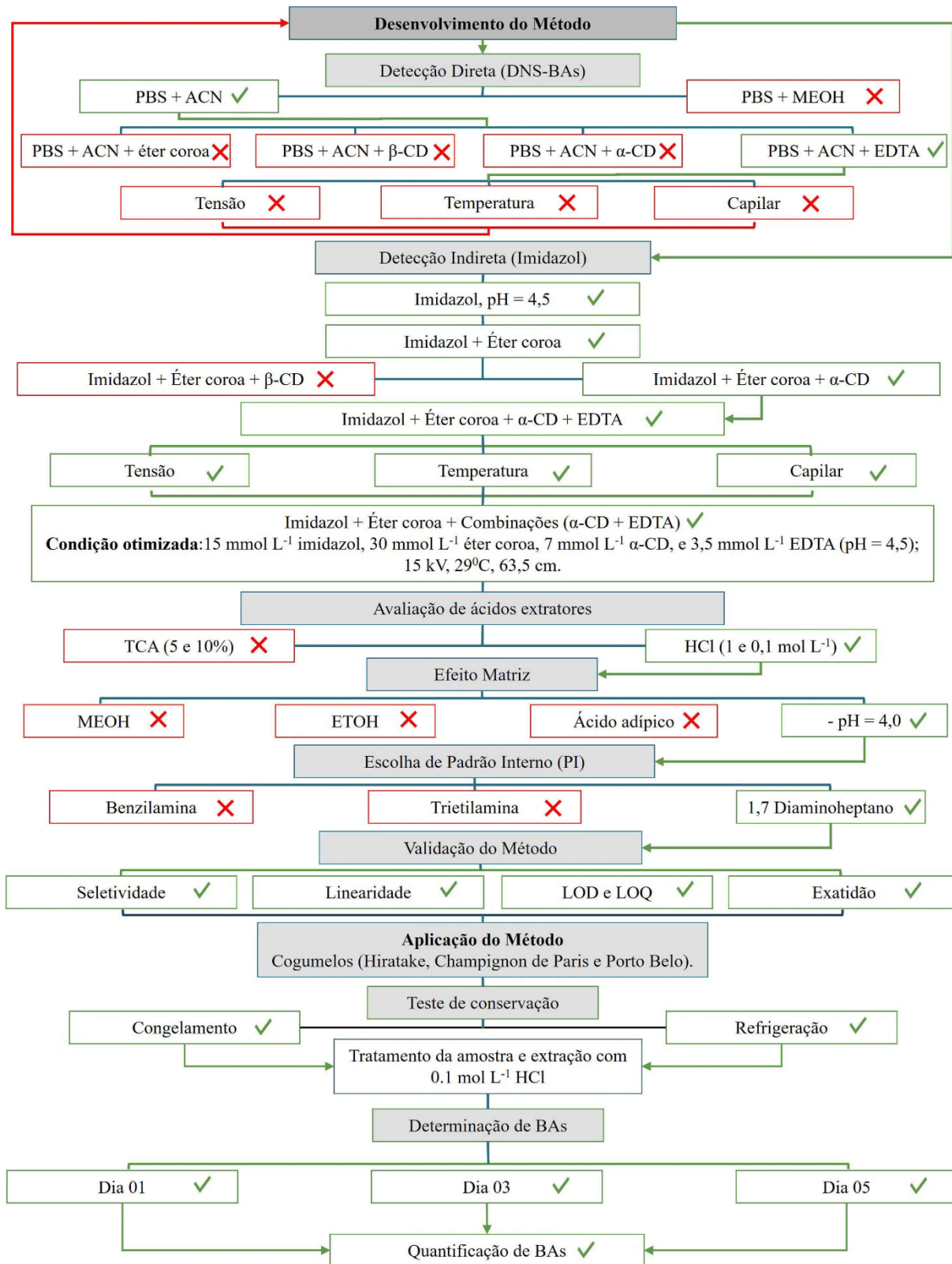
As etapas referentes ao pré-tratamento e à extração das aminas biogênicas (BAs) estão sistematizadas no fluxograma apresentado na Figura 9. O desenvolvimento do método analítico, bem como sua aplicação prática, encontra-se esquematizados na Figura 10.

Figura 9 – Pré-tratamento e extração de BAs em amostras de cogumelos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Fluxograma da metodologia utilizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS E INSTRUMENTAIS

4.1.1. Detecção Direta

A detecção das BAs tanto por UV assim como por fluorescência exige a sua derivatização. O cloreto de dansila (DNS-Cl), é um dos agentes derivatizantes comumente utilizados para esse fim, pois reage com aminas primárias e secundárias formando adutos fluorescentes de fácil detecção na região UV (BUCHANAN et al., 1982; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

A reação de derivatização das BAs com DNS-Cl, melhora a formação de derivados estáveis, a seletividade e sensibilidade do método analítico (Vasconcelos *et al.*, 2021). A reação só é possível após a desprotonação das aminas, que acontece quando o pH do meio se encontra básico (acima dos pKas das BAs), sendo assim recomenda-se o uso da solução de NaOH na derivatização (Wang, Xu e Yang, 2022; De Yixuan *et al.*, 2023). O procedimento de derivatização com DNS realizado neste trabalho, foi baseado no método descrito por (Mantoanelli, Gonçalves e Pereira, 2020). Para a otimização do método diferentes parâmetros instrumentais e analíticos foram avaliados como mostra a Tabela 7.

Tabela 7- Condições analíticas avaliadas para o desenvolvimento do método direto para separação de BAs por Eletroforese Capilar.

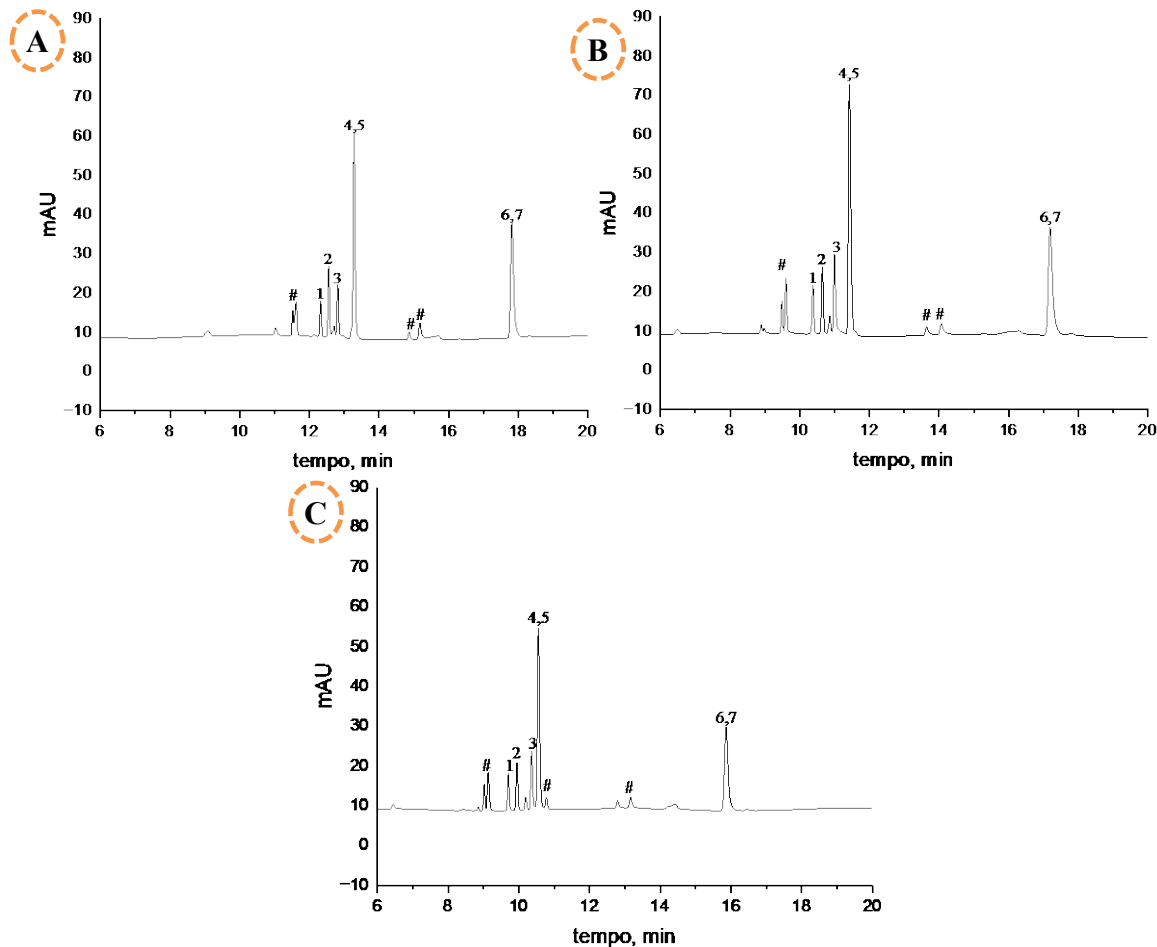
Variável	Figura
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 5% ACN – pH=2,5	Figura 9
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 7,5% ACN – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 10% ACN – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 2,5% MEOH – pH=2,5	Figura 10
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 5% MEOH – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 7,5% MEOH – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 20 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 7,5% ACN – pH=2,5	Figura 11
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 40 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 7,5% ACN – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 60 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 7,5% ACN – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 5 mmol L ⁻¹ de β-CD + 7,5% ACN – pH=2,5	Figura 12 A
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 10 mmol L ⁻¹ de β-CD + 7,5% ACN – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 5 mmol L ⁻¹ de α-CD + 7,5% ACN – pH=2,5	Figura 12 B
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 10 mmol L ⁻¹ de α-CD + 7,5% ACN – pH=2,5	
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 0,5 mmol L ⁻¹ de EDTA + 7,5% ACN – pH=2,5	Figura 13
140 mmol L ⁻¹ de PBS + 1 mmol L ⁻¹ de EDTA + 7,5% ACN – pH=2,5	

A concentração do eletrólito de corrida inicialmente selecionada para esse trabalho foi baseada no trabalho desenvolvido por (Mantoanelli, Gonçalves e Pereira, 2020). Para aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos, modificar a seletividade dos analitos e alterar o fator de capacidade (razão entre os analitos incorporados fora e dentro da micela), são comumente utilizados modificadores orgânicos (como etanol, metanol, acetonitrila, isopropanol) e aditivos como ciclodextrinas (CD), dobecil-sulfato de sódio (SDS), Éter Coroa (Li *et al.*, 2024).

Inicialmente foram investigadas três diferentes concentrações de acetonitrila (ACN) a ser adicionada a solução tampão fosfato (PBS, 140 mmol/L): 5% v/v de ACN, 7,5% v/v e 10% v/v de ACN. A condição que utilizou a concentração de 5% ACN apresentou vários picos bem definidos ao longo do tempo de migração, especialmente entre 10 e 16 min, porém não apresentou uma separação efetiva das aminas avaliadas, tendo coeluído a espermina com a espermidina e tiramina

com a triptamina (Figura 11 A). Já a condição de 7,5% ACN (Figura 11 B) mostra um perfil dos picos mais separados entre si, com um tempo de separação mais longo em comparação com a condição de 5% ACN, com um pico significativo por volta de 13 minutos, não tendo também separado efetivamente todas as aminas, pois apresentou coeluição das mesmas aminas da concentração 5% ACN. Por outro lado, a condição de 10% ACN (Figura 11 C) exibiu um padrão de picos diferente, apresentando menor sinal analítico, com um tempo de migração relativamente menor e com a separação entre os picos mais próximo, indicando uma tendência a coeluição. Nas três condições avaliadas não foi efetivamente separado a espermina da espermidina e tiramina da triptamina (Figura 11). Os resultados da ACN sugerem que concentrações maiores deste composto induzem a redução do sinal analítico das BAs e coeluição das BAs. Por outro lado, concentrações mais baixas, embora apresentem um sinal analítico e resolução satisfatórios, o ACN ainda não é eficaz para a separação das 7 BAs de interesse.

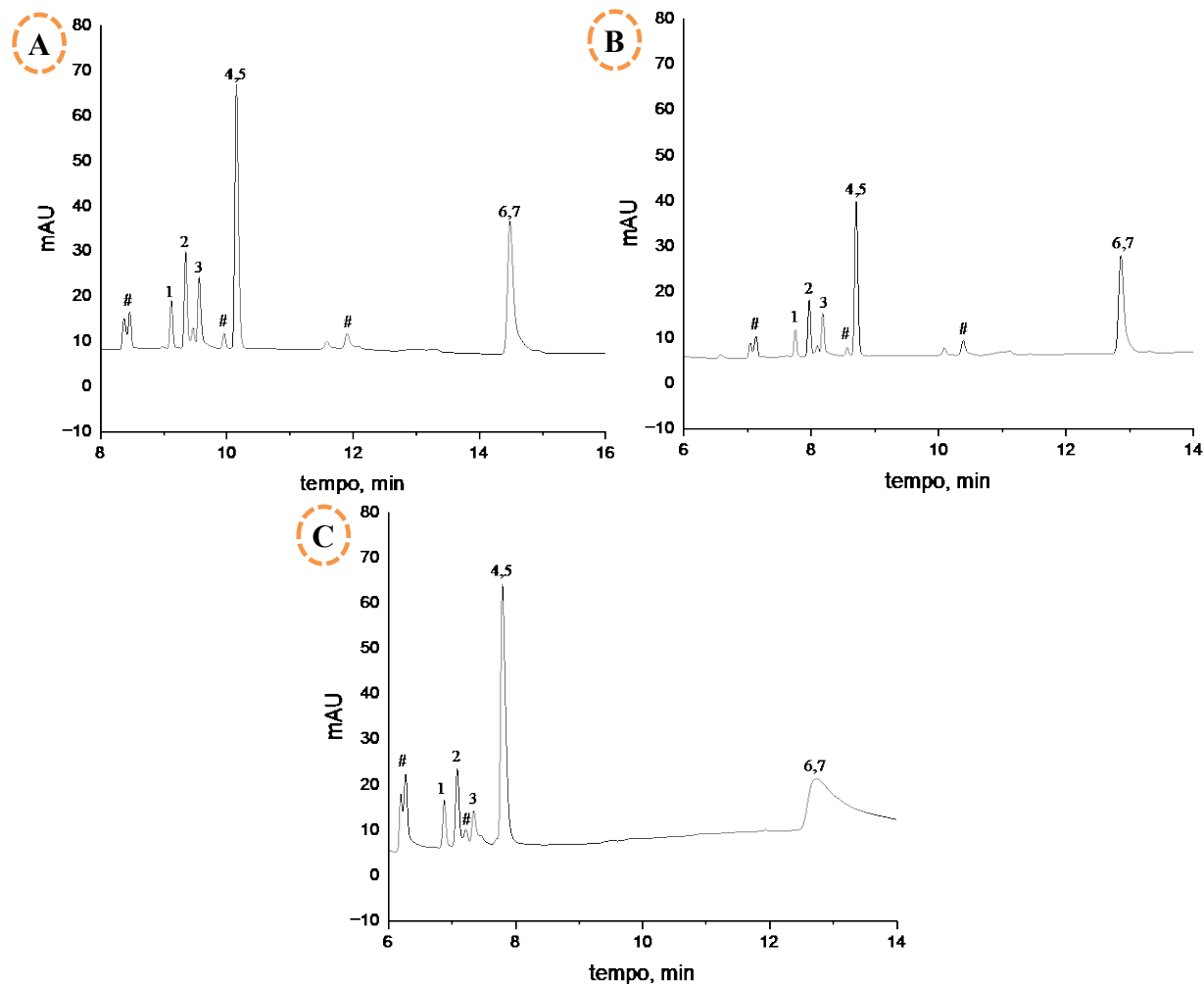
Figura 11 - Efeito da adição do ACN no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.



Legenda: A. 5% de ACN; B. 7,5% de ACN; C. 10% de ACN; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 140 mmol L⁻¹ PBS, 5%, 7,5% e 10% ACN, (pH = 2,5). **Instrumentação:** 23°C; 5s x 30 mBar; 16 kV; 214 nm. **Picos #.** Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Para avaliar qual seria o melhor solvente a ser selecionado o metanol foi testado em comparação com a acetonitrila, diferentes concentrações de metanol (MeOH) foram avaliadas, conforme ilustrado na Figura 12. As condições testadas foram: 2,5% v/v, 5% v/v e 7,5% v/v de MeOH.

Figura 12 - Efeito da adição do metanol no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.



Legenda: A. 2,5% de MEOH; B. 5% de MEOH; C. 7,5% de MEOH. **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 140 mmol L⁻¹ PBS, 7,5% ACN, (pH = 2,5). **Instrumentação:** 23°C; 5s x 30 mBar; 16 kV; 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Ao avaliar o impacto da concentração de metanol (MeOH) no eletrólito de corrida, observou-se que a condição de 2,5% v/v de MeOH resultou em picos bem definidos ao longo do tempo de migração, especialmente no intervalo entre 8 e 15 min. No entanto, apesar da alta eficiência, a separação entre alguns deles foi insuficiente, com a coeluição da espermina com a espermidina, assim como da tiramina com a triptamina. Aumentando a concentração de MeOH para 5% v/v, foi observado um sinal analítico de menor intensidade e um tempo de separação

efetiva ligeiramente reduzido em comparação à condição de 2,5% v/v. Porém, a separação entre os picos das BAs e a eficiência da separação como um todo, não apresentaram diferenças significativas, tendo também, se observado a persistência da coeluição entre espermina-espermidina e tiramina-triptamina.

Com a concentração de 7,5% v/v de MeOH, a migração das BAs foi acelerada, o que pode ser atribuído à maior concentração de metanol, que altera as interações dos analitos com o eletrólito de corrida. Esse efeito, comum em condições com solventes orgânicos, tende a reduzir a polaridade do meio, aumentando a mobilidade eletroforética dos compostos (Gupta, Kurmi e Patel, 2023). No entanto, assim como nas concentrações mais baixas, a coeluição da espermina com a espermidina e da tiramina com a triptamina persistiu. Além disso, o pico referente a tiramina e triptamina apresentou-se mal definido, tanto em termos de intensidade do sinal analítico quanto de estabilidade da linha de base.

Esses resultados demonstram que, embora o aumento da concentração de MeOH tenha influência direta no tempo de migração das aminas, ele não melhora substancialmente a resolução das aminas biogênicas coeluídas. Assim, apesar de ser uma variável importante na otimização da eletroforese capilar, a simples modificação da concentração de metanol no eletrólito de corrida não foi suficiente para resolver os problemas de coeluição observados.

Com base nos resultados obtidos, a condição com 7,5% v/v de ACN apresentou a melhor separação das BAs em comparação com as demais condições testadas, tanto com ACN quanto com MeOH. Embora essa condição tenha gerado um tempo de separação ligeiramente maior, o que pode ser visto como uma desvantagem em termos de análise, o sinal analítico foi mais intenso e a separação entre os picos mostrou-se mais eficiente, proporcionando uma resolução superior entre os analitos. O equilíbrio entre a maior eficiência dos picos e a melhora na resolução sugere que a utilização de 7,5% v/v de ACN oferece um desempenho superior, mesmo com o leve aumento no tempo de análise, justificando sua escolha para a continuidade dos experimentos.

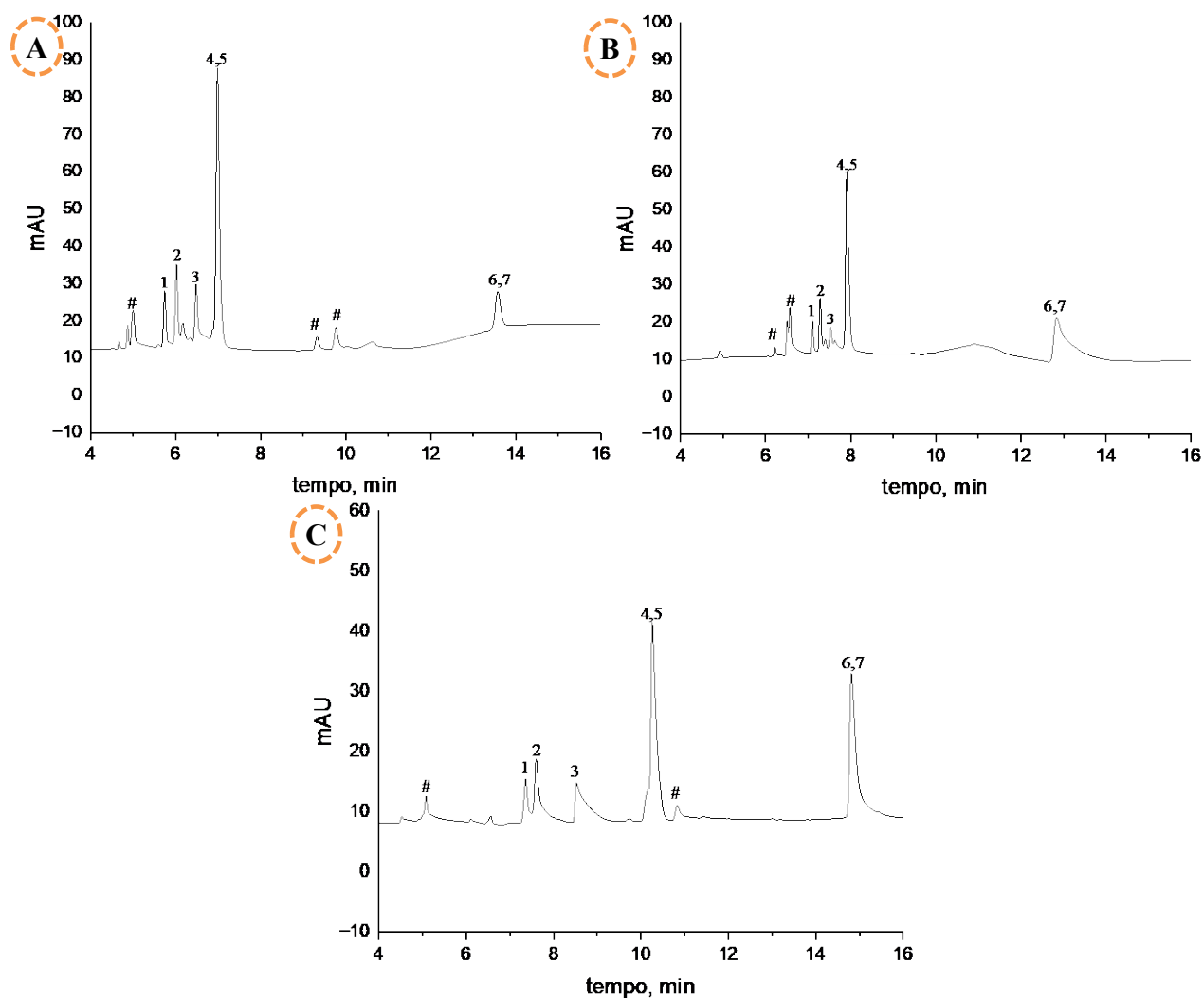
Com o objetivo de otimizar a separação outros aditivos foram avaliados. A função primária do éter coroa é atuar como agente complexante seletivo, formando complexos estáveis com certos cátions, como o sódio (Na^+) ou o potássio (K^+), que podem estar presentes no eletrólito de corrida.

Esse complexo influencia diretamente o comportamento de migração dos analitos, afetando a seletividade e a eficiência da separação (Beckers e Bocek, 2003; Ali, Aboul-Enein e Gupta, 2006).

No contexto de separação de BAs, o éter coroa pode alterar a mobilidade eletroforética ao interagir com os cátions presentes no meio eletrolítico (Gupta, Kurmi e Patel, 2023). Essa interação afeta a força iônica do eletrólito, modificando a densidade de carga das aminas ou sua interação com a fase móvel (Gupta, Kurmi e Patel, 2023; Maráková *et al.*, 2020). Como resultado, o tempo de migração pode ser ajustado, e a separação entre analitos pode ser aprimorada, especialmente em casos em que há coeluição, como observado entre espermina e espermidina, ou tiramina e triptamina. Além disso, o éter coroa pode atuar indiretamente ao modificar o equilíbrio entre os analitos e o eletrólito de corrida, reduzindo interações não específicas e aumentando a resolução entre analitos estruturalmente semelhantes (Beckers e Bocek, 2003; De Yixuan *et al.*, 2023). Em sistemas com diferença de mobilidade dos analitos reduzida, como na separação de aminas biogênicas, o uso de éter coroa pode promover uma melhor diferenciação e uma separação mais eficiente, ajustando a interação entre os compostos e o meio eletrolítico (De Yixuan *et al.*, 2023). Estudos descritos na literatura demonstram que o éter coroa pode ser eficaz na melhoria da seletividade da separação de cátions em soluções complexas (Beckers e Bocek, 2003; Maráková *et al.*, 2020; Seyfinejad *et al.*, 2022; De Yixuan *et al.*, 2023), o que sugere um potencial significativo para otimização em análises de compostos polares e carregados, como as aminas biogênicas.

Com o objetivo de avaliar o efeito da adição de éter coroa no sistema de separação a concentração de acetonitrila foi mantida em 7,5% v/v, e diferentes concentrações de éter coroa foram adicionados ao eletrólito. A Figura 13 apresenta os resultados obtidos. O eletrólito foi composto por tampão fosfato (PBS, 140 mmol/L⁻¹) com 7,5% de ACN contendo 20 mmol L⁻¹, 40 mmol L⁻¹ e 60 mmol L⁻¹ de éter coroa, respectivamente.

Figura 13 - Efeito da adição de Éter coroa no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.



Legenda: **A.** 20 mmol L⁻¹ de Éter Coroa; **B.** 40 mmol L⁻¹ de Éter Coroa; **C.** 60 mmol L⁻¹ de Éter Coroa; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 140 mmol L⁻¹ PBS, 7,5% ACN (pH = 2,5). **Instrumentação:** 23°C; 5s x 30 mBar; 16 kV; 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

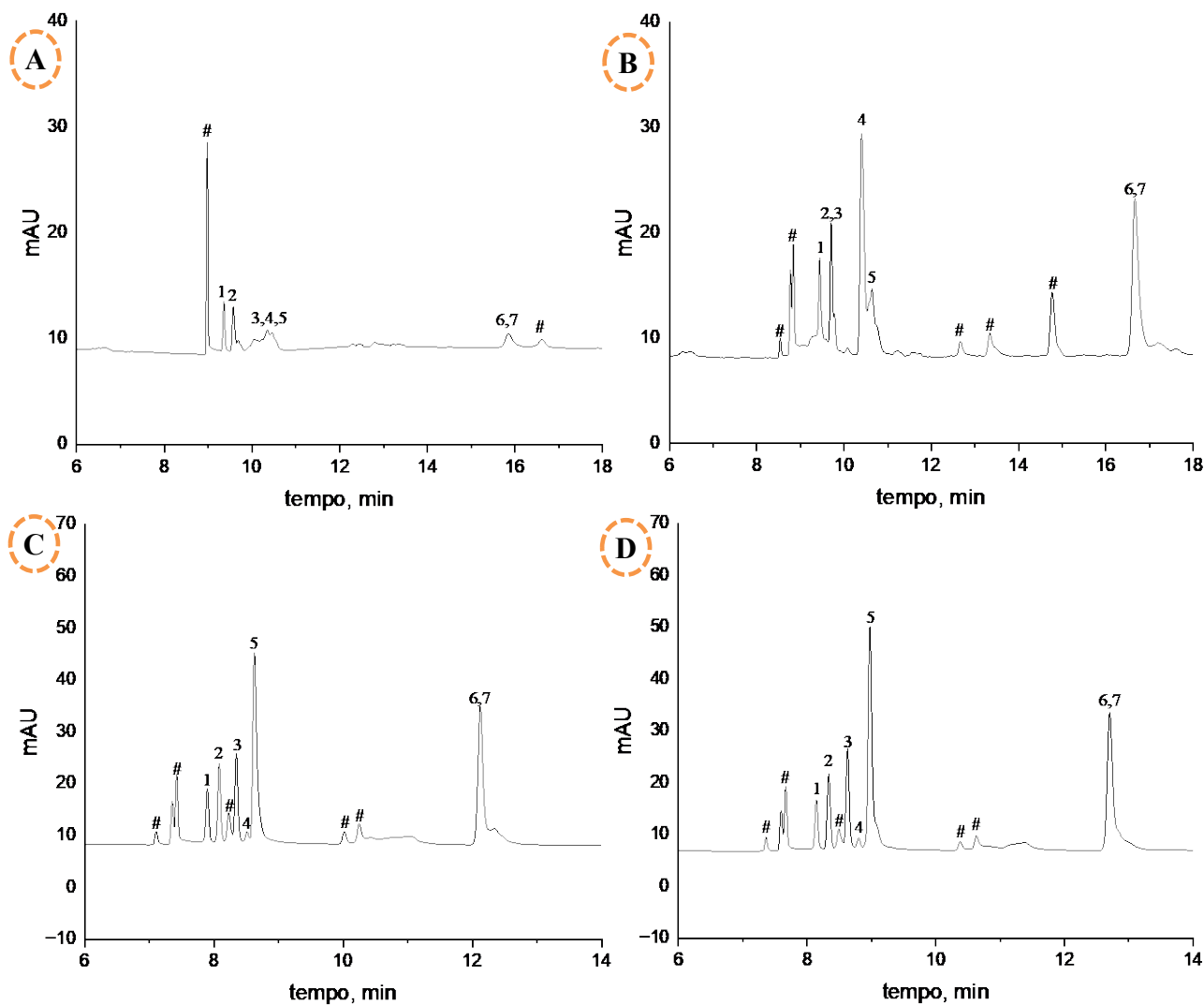
Como pode ser observado os resultados não demonstraram ganhos significativos com a utilização do éter coroa. Na concentração de 20 mmol L⁻¹, apesar de ter proporcionado um tempo de separação relativamente curto, o sinal analítico foi baixo e a resolução foi insatisfatória. Não houve separação dos picos de espermina e espermidina, assim como de tiramina e triptamina, que permaneceram coeluídos. Dado o não desempenho na separação dos analitos, essa condição

mostrou-se inviável para a análise das aminas biogênicas. Na concentração de 40 mmol L⁻¹ de éter coroa, observou-se um tempo de separação ainda mais reduzido (12 min). Contudo, a resolução foi inferior, com picos muito próximos e menor intensidade do sinal analítico em comparação com as condições utilizando apenas ACN.

Embora o tempo de migração tenha diminuído, a eficiência de separação e a qualidade do sinal analítico foram prejudicadas, tornando essa concentração igualmente inadequada para a separação efetiva das BAs. A condição com 60 mmol L⁻¹ de éter coroa também não apresentou resultados satisfatórios. A coeluição dos picos de espermina-espermidina e tiramina-triptamina persistiu, indicando que o aumento da concentração de éter coroa não favorece a resolução dos analitos. O sistema de separação continuou apresentando problemas de coeluição e baixa qualidade do sinal, o que limita a aplicação do éter coroa nessas condições experimentais para esse tipo de análise, assim esse aditivo foi descartado nos experimentos seguintes.

A utilização de ciclodextrinas (CD α e β) para separação de BAs baseia-se na capacidade que estes têm de formar complexos de inclusão, em que as CDs encapsulam parcialmente as moléculas de BAs, alterando as suas propriedades de migração (Sebestyén, Buvári-Barcza e Rohonczy, 2012). A principal diferença entre a α e β CD está na sua cavidade, em que a α -CD possui uma cavidade interna menor, com diâmetro interno de aproximadamente 4,7 – 5,3 Å, o que a permite encapsular moléculas menores formando complexos e alterando a mobilidade das moléculas menores ou mais hidrofóbicas, enquanto que a β -CD possui uma cavidade maior, com um diâmetro interno de 6 – 6,5 Å, o que a permite encapsular moléculas maiores formando complexos de inclusão e desacelerando a mobilidade de BAs maiores ou mais hidrofóbicas (Matuskova *et al.*, 2022). A Figura 14 representa os resultados obtidos com a adição de CD α e β ao eletrólito de corrida.

Figura 14 - Efeito da adição de β -cd e α -cd no eletrólito de corrida para separação de BAs– DNS utilizando o modo CZE.



Legenda: A. 5 mmol L⁻¹ de β -cd; B. 10 mmol L⁻¹ de β -cd; C. 5 mmol L⁻¹ de α -cd; D. 10 mmol L⁻¹ de α -cd; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 140 mmol L⁻¹ PBS, 7,5% ACN, (pH = 2,5). **Instrumentação:** 23°C; 5s x 30 mBar; 16 kV; 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

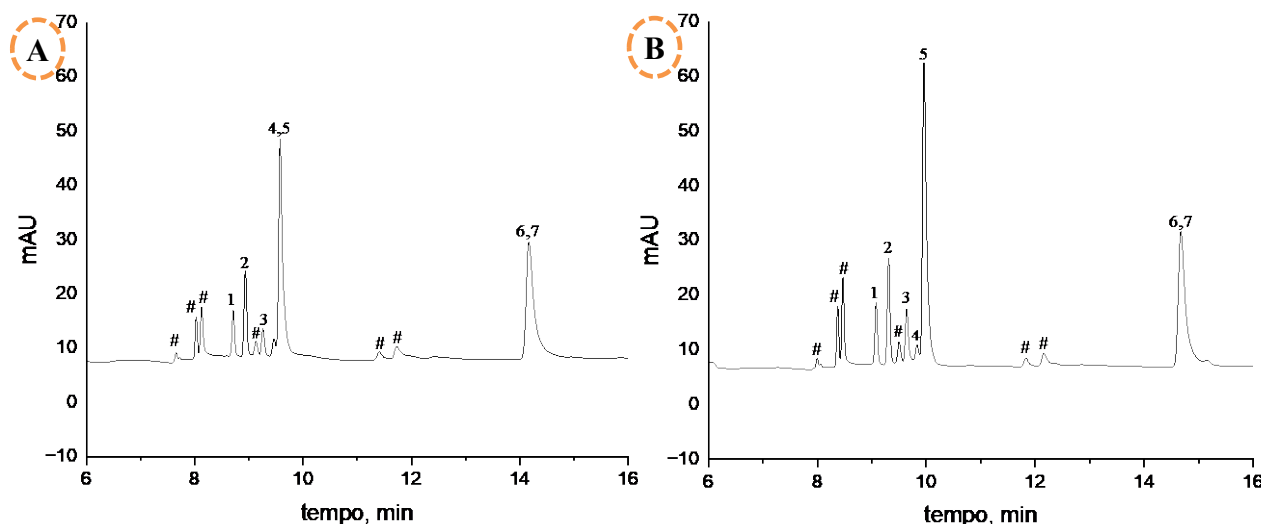
A adição de β -CD nas concentrações de 5 mmol L⁻¹ e 10 mmol L⁻¹ não proporcionou resultados satisfatórios no sistema de separação dos analitos de interesse. Na condição de 0,5 mmol L⁻¹, foi observada a coeluição de putrescina, espermina e espermidina, o que comprometeu a qualidade da separação. A coeluição entre tiramina e triptamina permaneceu

inalterada em ambas as concentrações avaliadas. Ainda assim, a adição de β -CD não se mostrou eficaz para resolver as coeluições críticas.

Por outro lado, a adição de α -CD ao eletrólito proporcionou resultados mais satisfatórios no sistema de separação, especialmente na separação de espermina e espermidina, que se mostraram resolvidas. No entanto, o sinal analítico da espermina foi reduzido, comprometendo a detecção deste analito. Apesar dessa melhoria pontual, a coeluição entre tiramina e triptamina permaneceu, indicando que a α -CD não foi capaz de resolver completamente os problemas de coeluição nesse sistema. Em termos de tempo de separação e resolução entre os picos, tanto a β -CD quanto a α -CD não apresentaram resultados que justificassem a incorporação ao eletrólito de corrida. Embora a α -CD tenha mostrado um potencial ligeiramente superior na separação de alguns analitos, a qualidade do sinal analítico e a persistência da coeluição sugerem que o uso de ciclodextrinas, nas concentrações avaliadas, não é suficiente para otimizar a separação das BAs. Devido a esse desempenho insatisfatório, a β -CD e a α -CD foram descartadas para continuidade dos experimentos.

O EDTA desempenha um papel crucial na separação de BAs em CE, atuando principalmente como quelante de íons metálicos (Lili *et al.*, 2016). Sua capacidade de complexar íons como cálcio, magnésio e ferro previne interferências que poderiam comprometer a eficiência eletroforética. Ao estabilizar o pH do eletrólito de corrida, o EDTA garante maior reprodutibilidade e precisão nos resultados (Steiner. *et al.*, 2009). Além disso, ao reduzir a adsorção das BAs nas paredes do capilar de sílica fundida, o EDTA contribui para melhor eficiência e definição dos picos no eletroferograma, melhorando a resolução e a qualidade da separação. As concentrações de EDTA avaliadas foram de 0,5 e 1 mmol L⁻¹. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos.

Figura 15 - Efeito da adição de EDTA no eletrólito de corrida para separação de BAs – DNS utilizando o modo CZE.



Legenda: A. 0,5 mmol L⁻¹ de EDTA; B. 1 mmol L⁻¹ de EDTA. **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 140 mmol L⁻¹ PBS, 7,5% ACN, (pH = 2,5). **Instrumentação:** 23°C; 5s x 30 mBar; 16 kV; 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A adição de 1 mmol L⁻¹ de EDTA ao eletrólito proporcionou a separação entre espermidina e espermina. No entanto, a coeluição entre tiramina e triptamina persistiu, o que mostra que, apesar dos avanços, o método ainda apresenta limitações na separação completa de todas as aminas avaliadas.

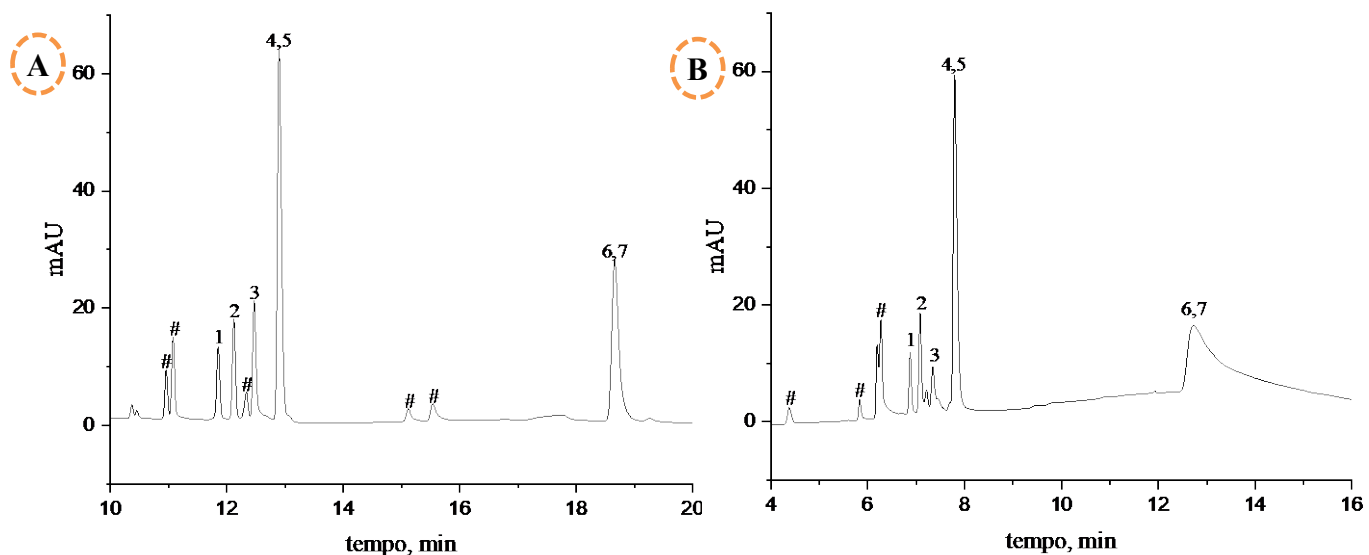
Cabe mencionar que em relação ao sinal analítico, a adição de EDTA não interferiu de forma negativa, com exceção do pico correspondente à espermina, que apresentou uma intensidade de absorvância reduzida. Embora a incorporação do EDTA ao eletrólito de corrida tenha claramente proporcionado avanços na separação das aminas, o método proposto ainda não apresentava a separação de todas as aminas avaliadas de forma completa, e o desafio da coeluição entre tiramina e triptamina permaneceu.

4.1.1.1.Otimização dos Parâmetros Instrumentais

Com o objetivo de otimizar o sistema de separação, foram avaliadas diferentes condições instrumentais. Os primeiros parâmetros avaliados foram a tensão aplicada e o comprimento do

capilar. Os melhores resultados foram obtidos com uma tensão de 16 kV, sendo possível observar uma melhor separação entre os picos, com uma separação satisfatória entre a maioria das aminas. Entretanto, as aminas espermina e espermidina, bem como tiramina e triptamina, permaneceram coeluídas (Figura 16). A voltagem de 16 kV foi, portanto, selecionada para os experimentos subsequentes.

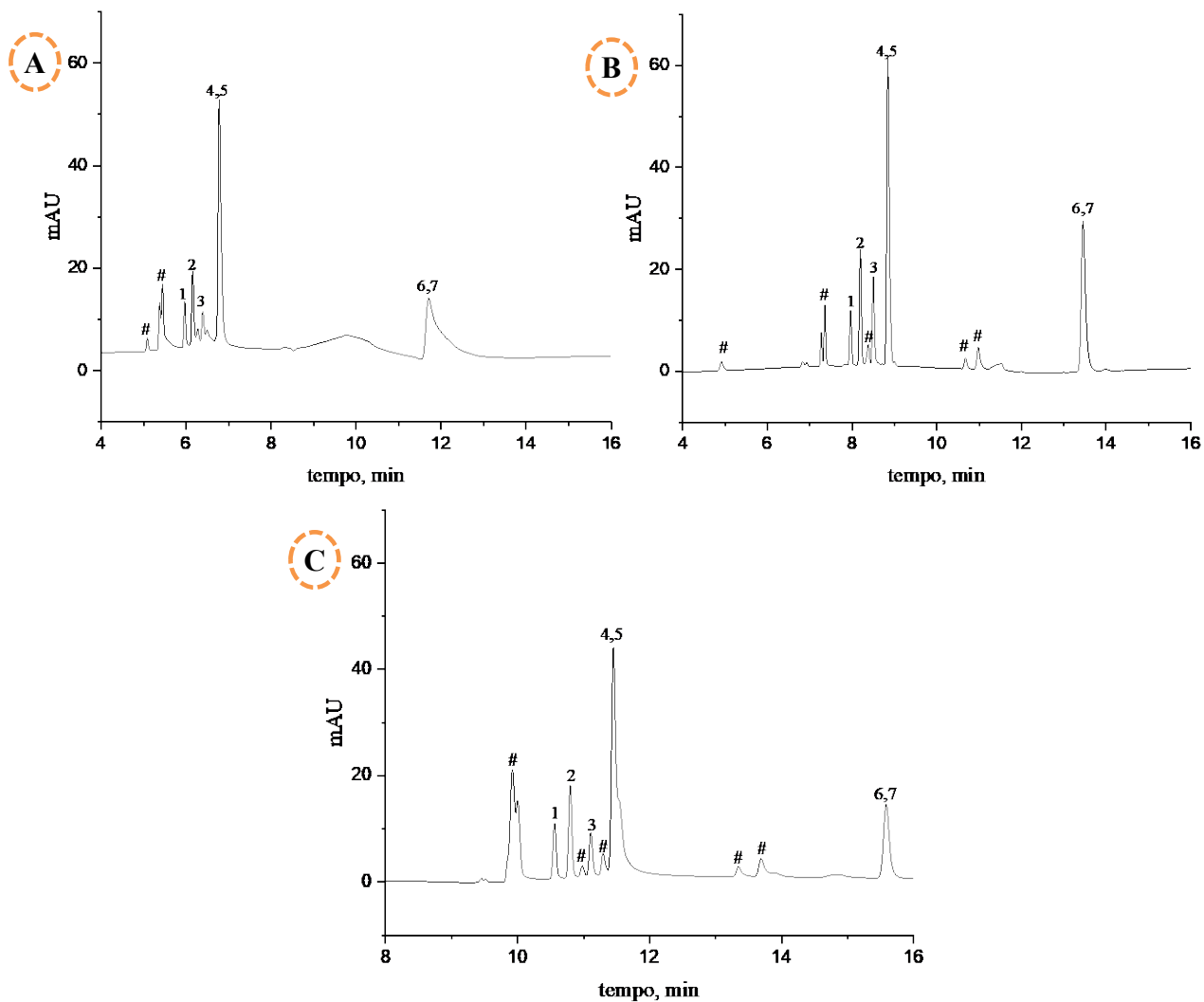
Figura 16 – Efeito da tensão no sistema de separação.



Legenda: A. 16 KV; B. 18 KV; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 140 mmol L⁻¹ PBS, 7,5% ACN, 1 mmol L⁻¹ EDTA, (pH = 2,5). **Instrumentação:** 23°C; 5s x 30 mBar; 214 nm; 53,5 cm de capilar. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A Figura 17 apresenta o efeito do comprimento do capilar no sistema de separação, foram avaliados capilares de diferentes comprimentos (48,5 cm, 53,5 cm e 58,5 cm), sendo o capilar de 53,5 cm o que apresentou a melhor resolução. Nessa condição, obteve-se uma melhor separação das BAs com um sinal analítico satisfatório e com tempos de migração variando dos 6 aos 15 min.

Figura 17 - Efeito do comprimento do capilar no sistema de separação.



Legenda: A. 48,5 cm; B. 53,5 cm; B. 58,5 cm; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 140 mmol L⁻¹ PBS, 7,5% ACN, 1 mmol L⁻¹ EDTA, (pH = 2,5). **Instrumentação:** 23°C; 5s x 30 mBar; 214 nm; 53,5 cm de capilar. **Picos:** #: Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Além desses parâmetros, foram testadas diferentes temperaturas da coluna (23 °C, 25 °C e 28 °C). Observou-se, no entanto, uma queda de tensão associada ao aumento da temperatura (> 23°C), razão pela qual não foram apresentadas as Figuras. Esse comportamento pode ser explicado pelo efeito da temperatura na condutividade do eletrólito de corrida. Em sistemas de CE, o aumento da temperatura tende a aumentar a condutividade da solução eletrolítica, resultando em

uma queda de tensão aplicada, pois a corrente elétrica torna-se maior a temperaturas elevadas (ALTRIA, 1996; Li *et al.*, 2024). Esse fenômeno, conhecido como efeito joule, pode comprometer a separação eletroforética ao reduzir a eficiência de separação e aumentar a dispersão dos picos.

Apesar da otimização das condições instrumentais, com a escolha de 16 kV e um capilar de 53,5 cm, a separação entre espermina-espermidina e tiramina-triptamina permaneceu insatisfatória, com esses analitos apresentando coeluição. Assim, foi desenvolvido um método de detecção indireta como uma alternativa para superar as limitações impostas pela coeluição entre as aminas, buscando melhorar a sensibilidade e a precisão dos resultados.

4.1.2. Detecção Indireta

A detecção indireta utiliza um eletrólito de corrida contendo um co-íon que apresenta um alto valor de absorção na região do UV-vis, em um comprimento de onda específico. Um decréscimo da absorbância é observado quando os analitos se deslocam para a janela de detecção, gerando assim picos negativos, referentes aos analitos de interesse (Volpi, 2011). Cabe mencionar que o sinal foi invertido para que os picos das aminas que não absorvem na região do UV fossem registrados com os picos para cima. As aminas que absorvem apresentam picos negativos. Diferentes condições analíticas e instrumentais foram avaliadas e estão descritas na tabela 8 e 9.

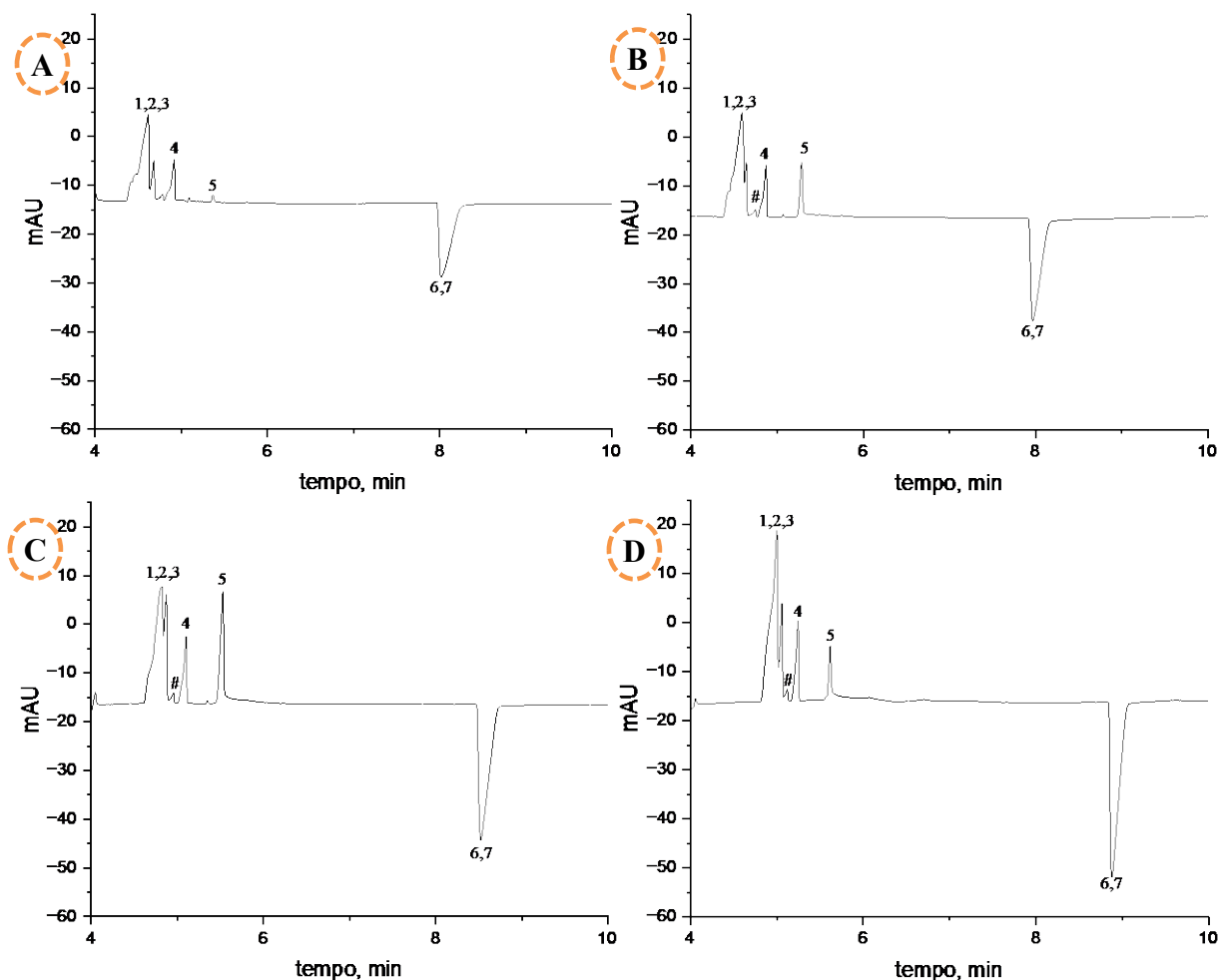
Tabela 8 – Condições analíticas avaliadas para o desenvolvimento do método indireto para separação de BAs por Eletroforese Capilar.

Variável	Figura
10 mmol L ⁻¹ de Imidazol – pH = 4,5	Figura 16
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol – pH = 4,5	
20 mmol L ⁻¹ de Imidazol – pH = 4,5	
30 mmol L ⁻¹ de Imidazol – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol – pH = 2,5	Figura 17
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 10 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa – pH = 4,5	Figura 18
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 20 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 5 mmol L ⁻¹ de β-CD – pH = 4,5	Figura 19
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 10 mmol L ⁻¹ de β-CD – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 15 mmol L ⁻¹ de β-CD – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 5 mmol L ⁻¹ de α-CD – pH = 4,5	Figura 20
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 10 mmol L ⁻¹ de α-CD – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 15 mmol L ⁻¹ de α-CD – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 10 mmol L ⁻¹ de α-CD + 0,5 mmol L ⁻¹ de EDTA – pH = 4,5	Figura 21
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 10 mmol L ⁻¹ de α-CD + 1 mmol L ⁻¹ de EDTA – pH = 4,5	
15 mmol L ⁻¹ de Imidazol + 30 mmol L ⁻¹ de Éter Coroa + 10 mmol L ⁻¹ de α-CD + 1,5 mmol L ⁻¹ de EDTA – pH = 4,5	

Legenda: pH: potencial hidrogênio; β-CD: beta ciclodextrina; α-CD: alfa ciclodextrina; mmol: milimolar.

O uso de imidazol como eletrólito de corrida para a determinação de BAs em alimentos está bem documentado na literatura. Quando é necessária a seletividade na separação, uma variedade de aditivos, como ácidos orgânicos e agentes complexantes, pode ser adicionada ao eletrólito de corrida (Pereira e Tavares, 2004). Para a otimização do método de separação, foi avaliado diferentes concentrações do imidazol (Tabela 8), onde selecionou-se a condição de 15 mmol L^{-1} de imidazol para os testes posteriores, pois este embora tenha apresentado um sinal analítico menor em relação às condições com concentrações mais altas (20 e 30 mmol L^{-1}), a separação dos analitos foi melhor, além disso o aumento da concentração pode produzir o efeito joule (ALTRIA, 1996) (Figura 18).

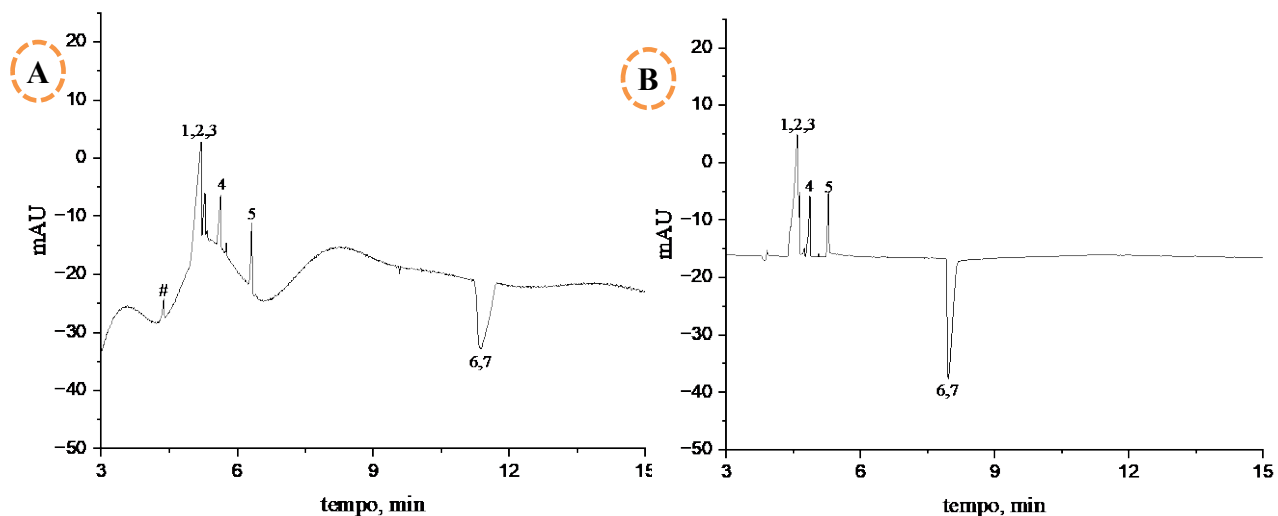
Figura 18 – Efeito da concentração do imidazol no sistema de separação.



Legenda: A. 10 mmol L⁻¹ imidazol; B. 15 mmol L⁻¹ imidazol; C. 20 mmol L⁻¹ imidazol; D. 30 mmol L⁻¹ imidazol; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Antes de avaliar o efeito de aditivos e agentes complexantes ao eletrólito de corrida, foi verificado o efeito do pH do eletrólito (pH: 2,5 e 4,5) no sistema de separação. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos.

Figura 19 - Efeito do pH na determinação e separação de aminas biogênicas.



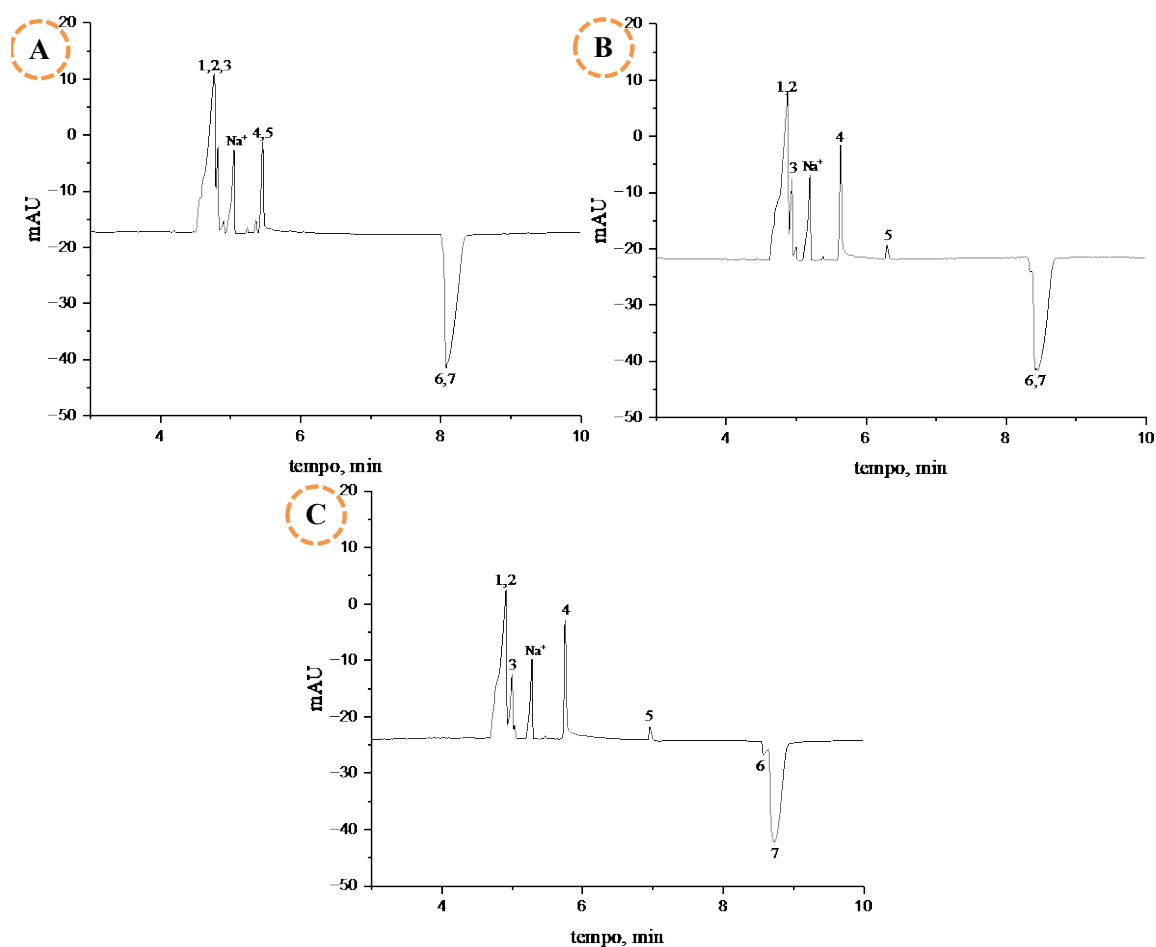
Legenda: A. pH = 2,5; B. pH = 4,5; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ imidazol. **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Os valores de pH avaliados foram selecionados com base na literatura como ideais para a separação de BAs pelo método de detecção indireta (Katarína *et al.*, 2020) (Rong, Zhongqi e Xue, 2022). A influência do pH do eletrólito de corrida na seletividade é notável, pois ele altera a ionização dos solutos e, conseqüentemente, a sua mobilidade eletroforética, além de impactar o tempo de migração ao modificar EOF. Além disso, a escolha do pH também pode afetar a estabilidade dos solutos e a resolução entre os picos, tornando-o um parâmetro essencial na otimização dos métodos eletroforéticos. Os resultados mais promissores foram obtidos com eletrólito de corrida a um pH de 4,5 sendo mantido para as análises subseqüentes.

Desde que o sistema apresentava coeluição entre as aminas, a próxima etapa foi avaliar o efeito de aditivos ao eletrólito de corrida. O primeiro aditivo avaliado foi o éter coroa como agente complexante. O éter-coroa é um seletor quiral que promove a separação por meio da formação de um complexo de inclusão entre o grupo NH₄⁺ do soluto e o éter-coroa. A eficácia desse reconhecimento depende da interação secundária entre os substituintes do éter-coroa e os grupos funcionais do analito (ALTRIA, 1998). Assim, se os complexos formados tiverem mobilidades diferentes dos solutos livres, haverá uma variação no tempo de migração, permitindo a separação

de diferentes analitos (ALTRIA, 1996). Para este teste foram avaliadas diferentes concentrações de éter coroa que variam de 10-30 mmol L⁻¹. O eletrólito de corrida foi constituído de 15 mmol L⁻¹ de imidazol, 4,5 de pH. A condição utilizando a concentração mais alta de éter coroa (30 mmol L⁻¹), mostrou-se ser mais promissora para a separação das BAs, tendo apresentado um eletroferograma com melhor separação dos analitos, incluindo o aumento do número de picos sugerindo que o éter coroa é um complexante promissor na separação de BAs por detecção indireta (Figura 20).

Figura 20 - Efeito da adição de Éter Coroa no eletrólito para separação de aminas biogênicas pelo método de detecção indireta.

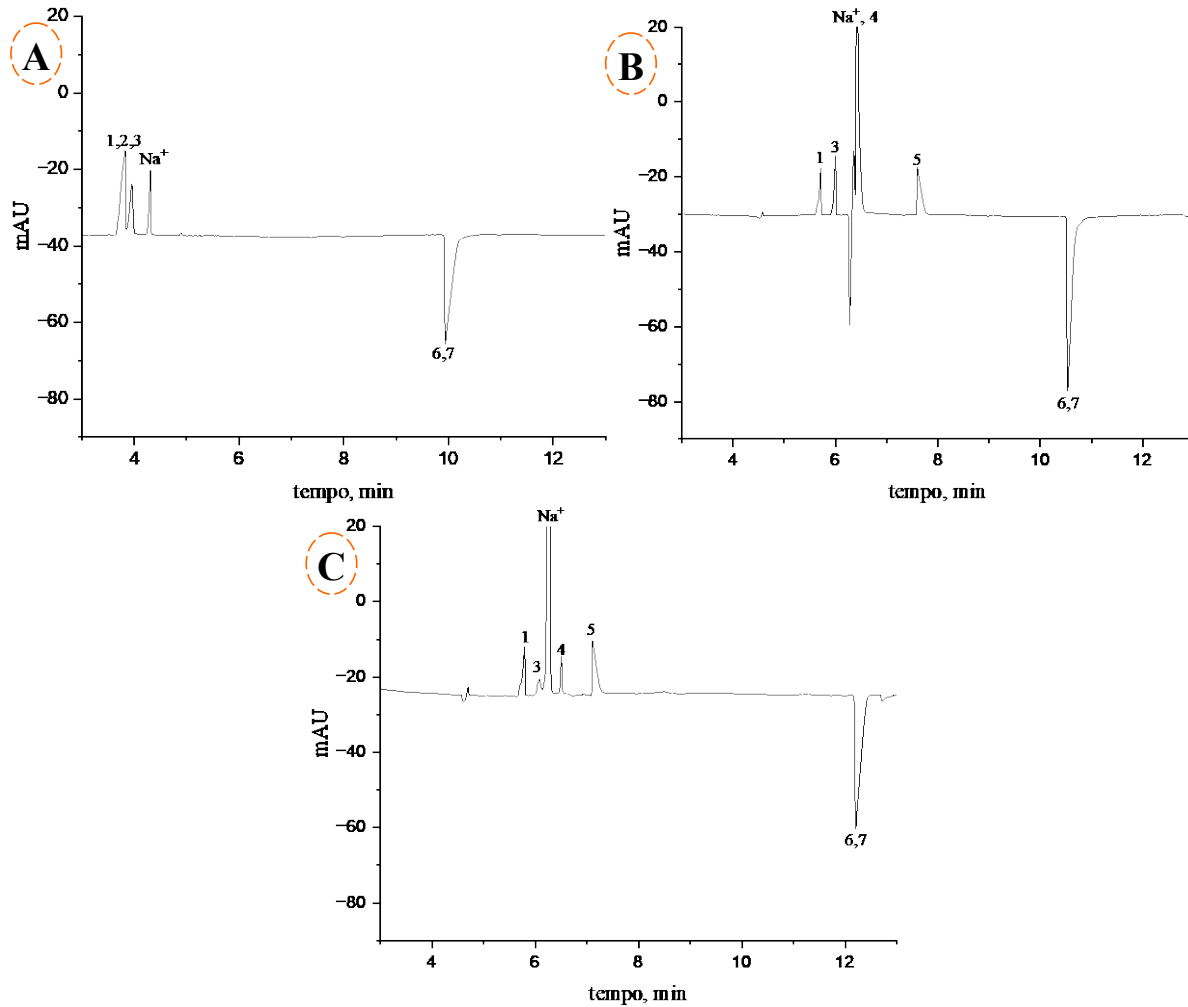


Legenda: A. 10 mmol L⁻¹ Éter Coroa; B. 20 mmol L⁻¹ Éter Coroa; C. 30 mmol L⁻¹ Éter Coroa; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

O eletrólito contendo 15 mmol L⁻¹ de imidazol e 30 mmol L⁻¹ de éter coroa apresentou resultados promissores para a separação das aminas, demonstrando uma separação entre os picos da tiramina e triptamina. Além disso, em termos de sinal analítico, essa condição apresentou uma excelente magnitude de sinal. Apesar de não ter sido possível separar a putrescina, histamina e cadaverina, essa condição foi selecionada para as próximas etapas.

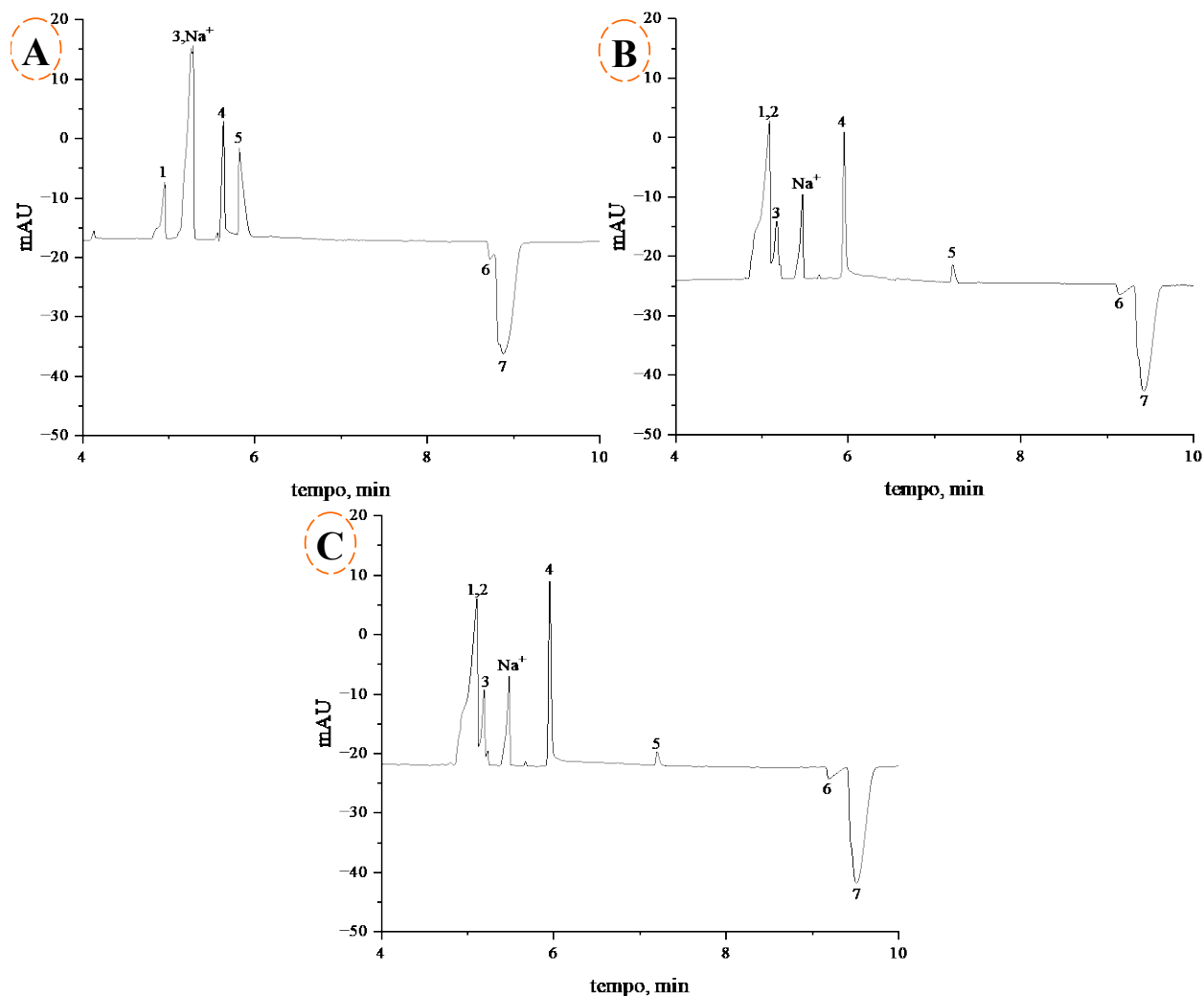
A próxima etapa de otimização do sistema de separação consistiu em avaliar a utilização de ciclodextrinas (β e α) como agentes complexantes. As β e α -ciclodextrinas possuem estrutura com uma cavidade (diferem entre si pelo tamanho da cavidade) hidrofóbica e superfície externa hidrofílica, fazendo com que os solutos não solúveis na fase aquosa se distribuam entre elas e as micelas, possibilitando a separação (BAKER, 1995). A adição da β -cd no eletrólito não proporcionou melhora expressiva na separação (Figura 21), porém a α -cd apresentou melhora na resolução dos picos (Figura 22).

Figura 21 - Efeito da adição da β -ciclodextrina na separação das aminas biogênicas.



Legenda: A. 2,5 mmol L⁻¹ de β -cd; B. 5 mmol L⁻¹ de β -cd; C. 10 mmol L⁻¹ de β -cd; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, pH = 4,5. **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Figura 22 - Efeito da adição da α -ciclodextrina na separação das aminas biogênicas.



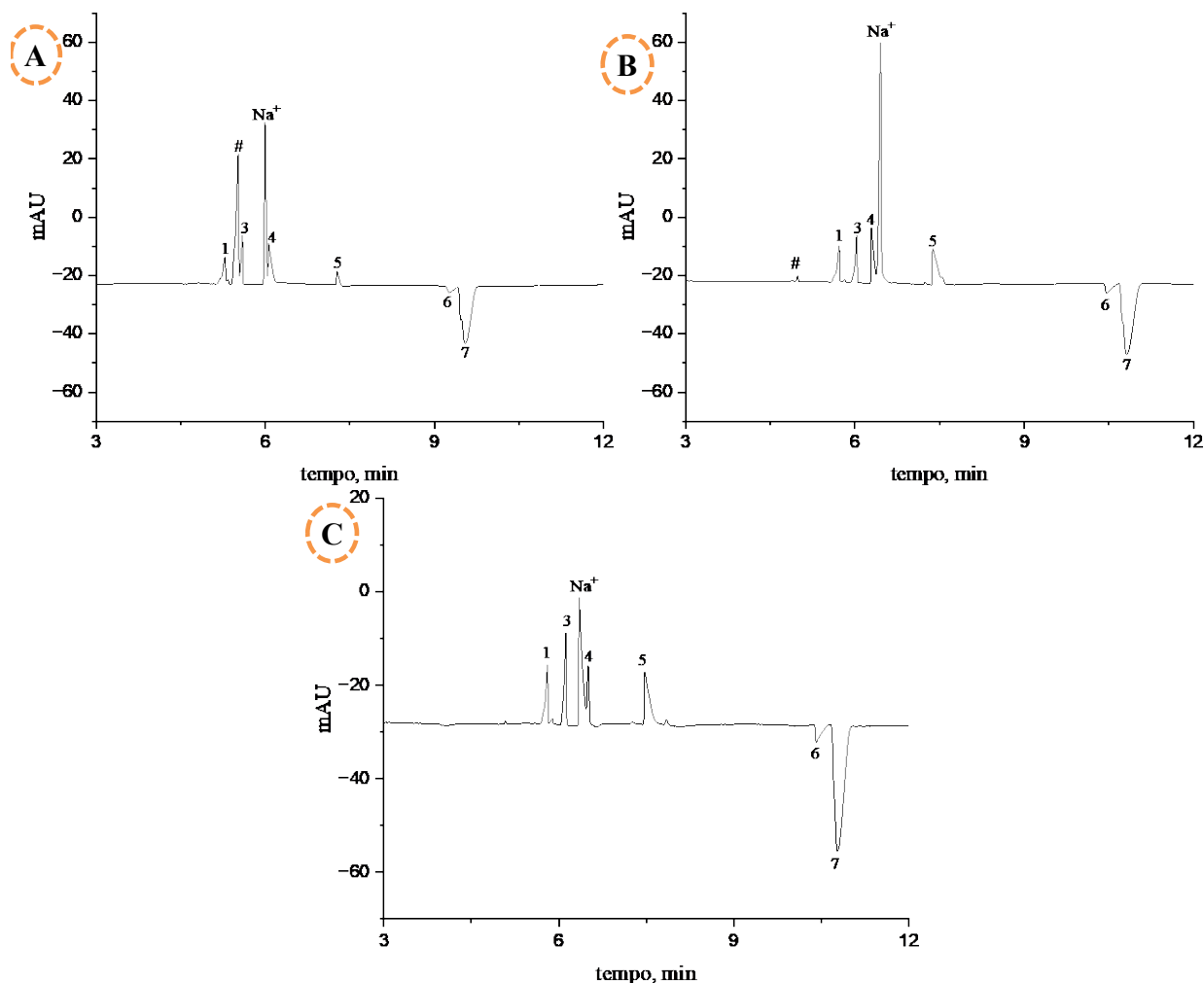
Legenda: A. 2,5 mmol L⁻¹ de α -cd; B. 5 mmol L⁻¹ de α -cd; C. 10 mmol L⁻¹ de α -cd; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, pH = 4,5. **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Spermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A condição que apresentou os melhores resultados foi com o eletrólito de corrida composto por 15 mmol L⁻¹ de imidazol, 30 mmol L⁻¹ de éter coroa e 10 mmol L⁻¹ de α -ciclodextrina (α -CD). Essa combinação permitiu uma separação entre a maioria das BAs de interesse, com um sinal analítico satisfatório. No entanto, a separação dos analitos ainda não estava completa, uma vez que a cadaverina e a histamina permaneceram coeluídas. A coeluição entre cadaverina e histamina

pode estar relacionada às suas propriedades estruturais e químicas semelhantes (He *et al.*, 2017). Ambas as moléculas possuem grupos funcionais que podem interagir de forma similar com o eletrólito e os modificadores de separação, como o éter coroa e a α -CD (He *et al.*, 2017; De Yixuan *et al.*, 2023).

Para tentar resolver a coeluição entre cadaverina e histamina, foi adicionado ao eletrólito um agente quelante, o EDTA. Diferentes concentrações de EDTA foram avaliadas ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, 1 mmol L^{-1} e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$), sendo que a concentração de 1 mmol L^{-1} proporcionou a melhor separação das BAs. Essa concentração permitiu uma melhora significativa na resolução dos picos, sem comprometer a intensidade do sinal analítico. (Figura 23).

Figura 23 – Efeito da adição de EDTA no sistema de separação das aminas biogênicas.



Legenda: A. 0,5 mmol L⁻¹ EDTA; B. 1 mmol L⁻¹ EDTA; C. 1,5 mmol L⁻¹ EDTA. **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 10 mmol L⁻¹ α -cyclodextrina (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A composição do eletrólito que proporcionou melhores resultados foi uma mistura contendo 15 mmol L⁻¹ de imidazol, 30 mmol L⁻¹ de éter coroa, 10 mmol L⁻¹ de α -cd e 1 mmol L⁻¹ EDTA. Embora esta condição não tenha permitido a detecção da histamina, destaca-se por ter apresentado melhor separação entre as demais aminas. Para resolver o problema de detecção da histamina, foram avaliadas diferentes condições instrumentais.

4.1.2.1.Otimização das Condições Instrumentais

O método desenvolvido apresentou resultados parcialmente satisfatórios na separação das BAs uma vez que histamina não foi detectada no sistema de separação. Aliado a esse comportamento do sistema, foram observadas frequentes variações no sistema de separação, principalmente relacionadas ao tempo de migração, tendo ocasionado coeluição entre os picos em algumas corridas. Para minimizar essas variações, os parâmetros instrumentais (tensão, temperatura e comprimento do capilar) foram avaliados e otimizados. Esse estudo visou melhorar a resolução entre os picos, garantindo a detecção da histamina e evitar que pequenas variações em parâmetros como temperatura não interferissem significativamente na separação. Os parâmetros investigados estão sumarizados na Tabela 9.

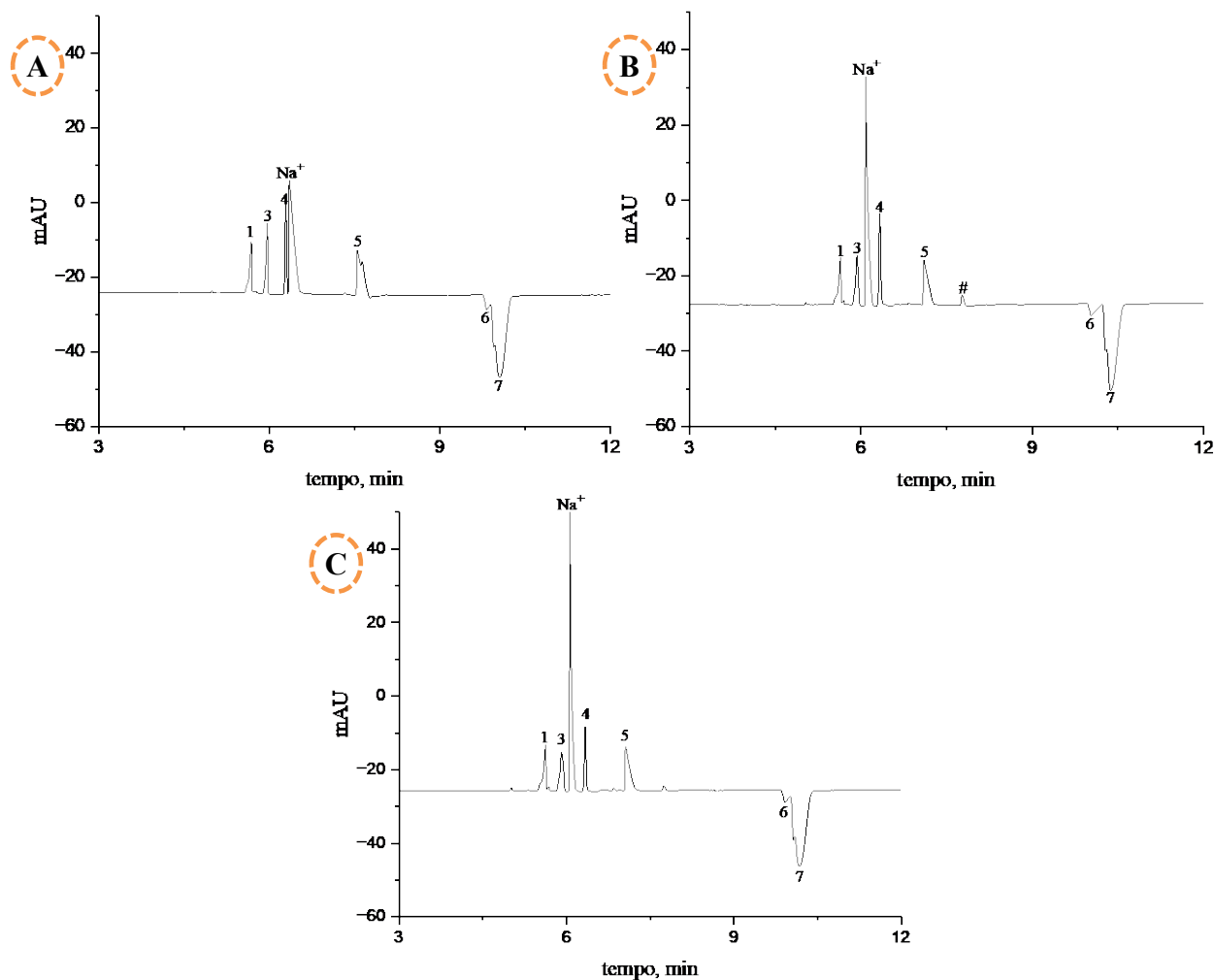
Tabela 9 - Condições instrumentais avaliadas para a separação de aminas biogênicas.

Parâmetro	Condição	Figura
Tensão	V= 14 KV	Figura 22
	V= 15 KV	
	V=16 KV	
Temperatura	t = 25 ⁰ C	Figura 23
	t = 27 ⁰ C	
	t = 29 ⁰ C	
Tamanho do capilar	Cap = 48,5 cm	Figura 24
	Cap = 53,5 cm	
	Cap = 58,5 cm	

Inicialmente avaliou-se a tensão do sistema (14, 15 e 16 KV) (Figura 24). Na detecção indireta, a tensão pode também influenciar a intensidade do sinal detectado, sendo necessário ajustá-la para otimizar a sensibilidade e minimizar a interferência de fundo (ALTRIA, 1996). Portanto, a otimização da tensão aplicada é essencial para alcançar separações eficientes e precisas das BAs. Além disso, a tensão influencia a estabilidade térmica do sistema, com tensões elevadas, a temperatura aumenta, o que acaba afetando a separação (Fan *et al.*, 2023). A compatibilidade da tensão com o eletrólito de corrida é também um fator importante a ser avaliado, pois alguns eletrólitos podem decompor-se ou sofrer reações indesejadas sob tensões elevadas. O objetivo de

se avaliar a tensão do sistema é de melhorar separação dos analitos, além de reduzir o tempo de análise. A resolução mais promissora foi obtida com a tensão de 15 KV (Figura 24 B).

Figura 24 – Efeito da tensão na separação das amins biogênicas pelo sistema de detecção indireta.

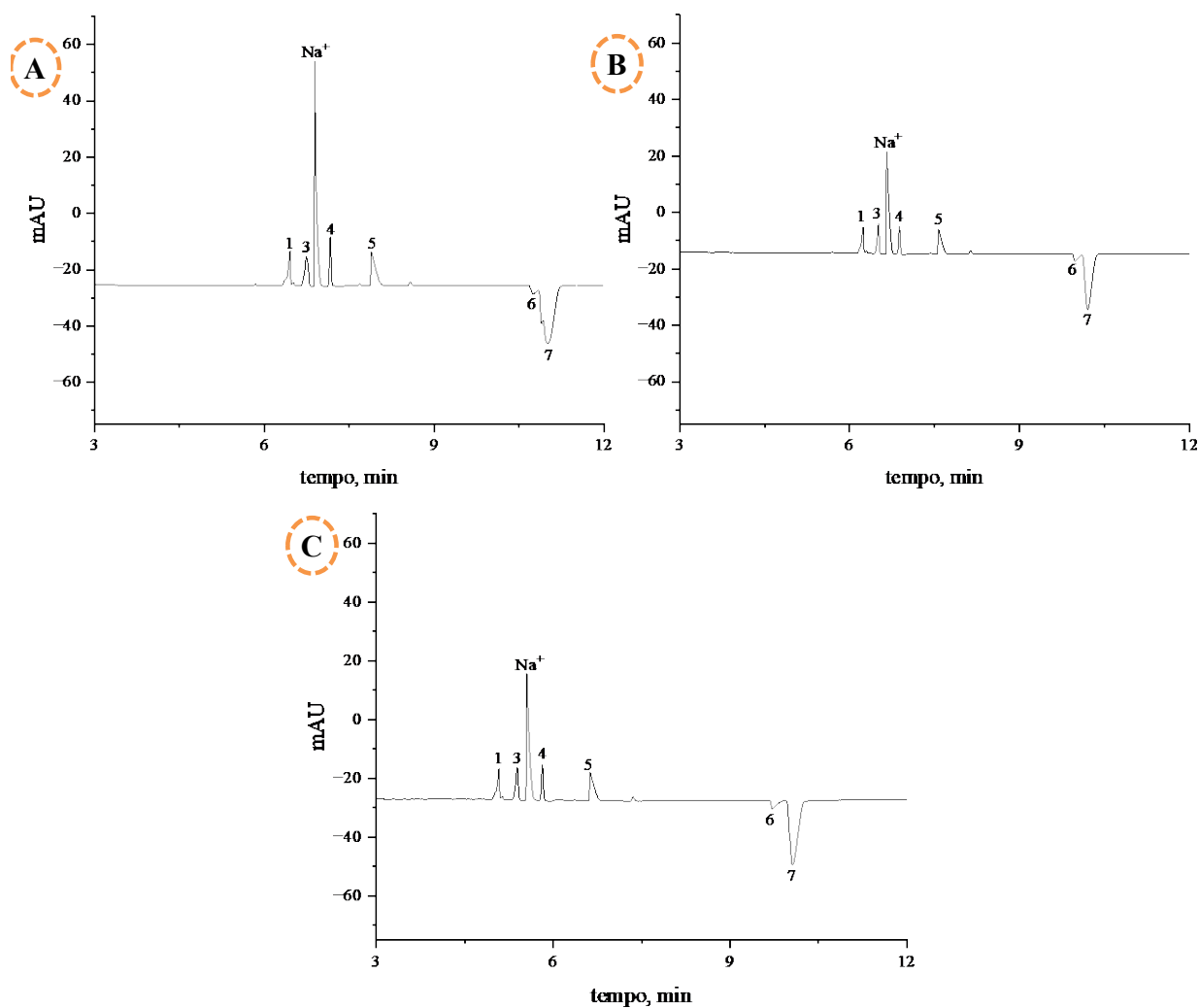


Legenda: A. 14 kV; B. 15 kV; C. 16 kV. **Padrão de Amins:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 10 mmol L⁻¹ α -cyclodextrina, e 1 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; Capilar 75 μ m d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Spermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A utilização de altos valores de tensão do sistema pode ocasionar o aumento da temperatura da coluna capilar, por essa razão, a temperatura (Figura 25) e o tamanho do capilar (Figura 26) foram ajustados. O principal problema no desenvolvimento deste método, está relacionado com a

detecção da histamina e separação da triptamina e a tiramina, uma vez que estes últimos tendem a coeluir. Com temperaturas mais baixas (25 e 27 °C) foi possível separar com uma boa resolução as primeiras 4 aminas (putrescina, cadaverina, espermidina e espermina), porém, sem a detecção da histamina e com a coeluição entre triptamina com tiramina. A temperatura de 29 °C foi selecionada porque apresentou resolução e tempo de análise satisfatórios para todos analitos, exceto para histamina que não foi detectada no sistema (Figura 25 C).

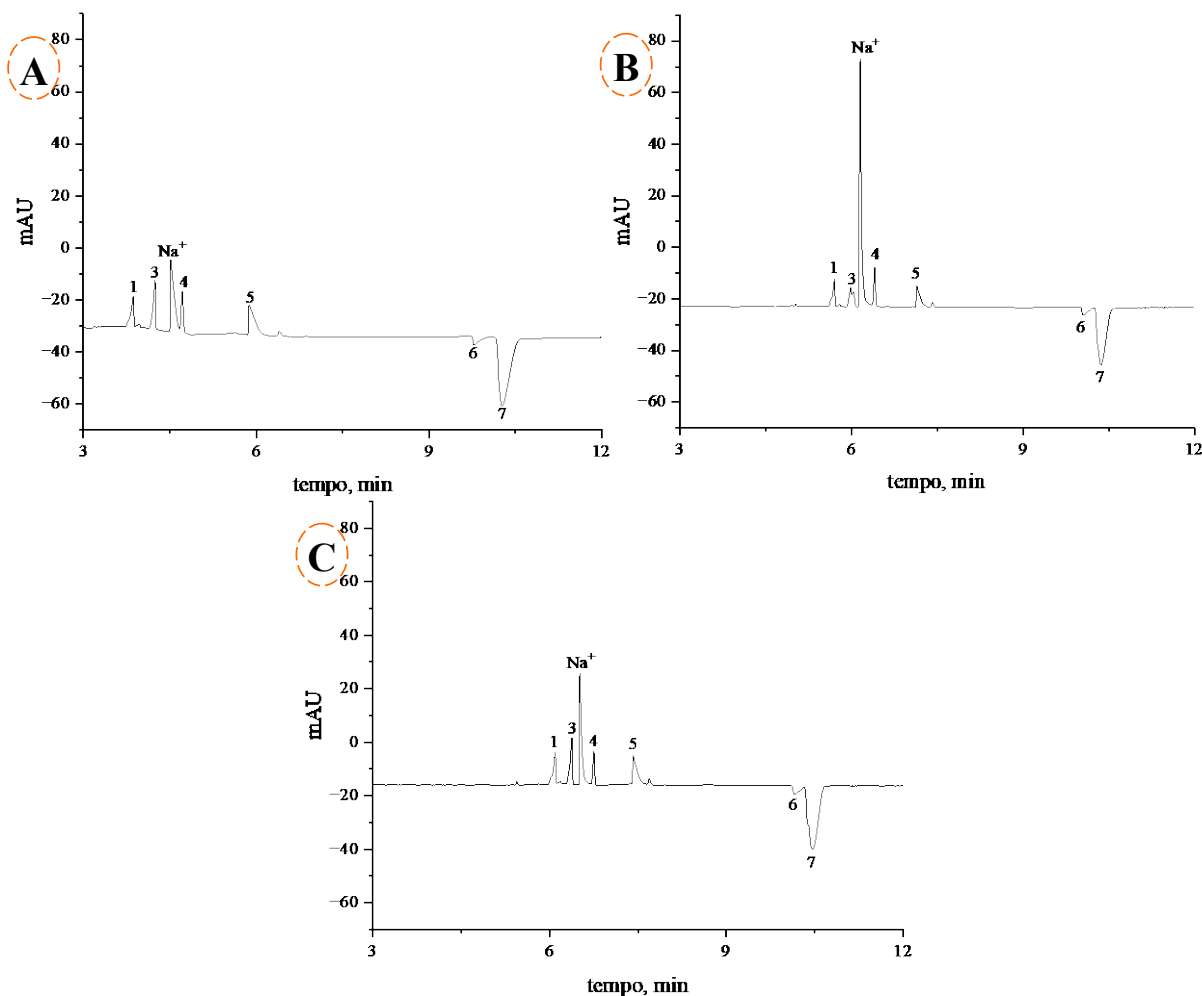
Figura 25 – Efeito da temperatura no sistema indireto de separação das aminas biogênicas.



Legenda: A. 25° C; B. 27° C; C. 29° C. **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 10 mmol L⁻¹ α-ciclodextrina, e 1 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,5). **Instrumentação:** 15 KV; 5s x 30 mBar; Capilar 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

O tamanho do capilar tem um impacto significativo na separação dos analitos. O comprimento do capilar influencia diretamente a resolução e o tempo de análise: capilares mais longos melhoram a resolução, porém, aumentam o tempo total de análise, enquanto capilares mais curtos aceleram a análise podendo comprometer a resolução (ALTRIA, 1996). Os capilares mais curtos (48,5 cm e 53,5 cm) não apresentaram uma separação dos picos satisfatória, o capilar mais longo (58,5 cm) apresentou os resultados mais promissores (Figura 26 C). Tal comportamento pode estar relacionado ao fato de capilares mais longos proporcionarem um aumento do número de pratos teóricos. A Figura 26 C apresenta o sistema de separação selecionado para as próximas etapas.

Figura 26 Efeito do comprimento do capilar na separação das aminas biogênicas.



Legenda: A. 48,5 cm; B. 53,5 cm; C. 58,5 cm. **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 10 mmol L⁻¹ α -ciclodextrina, e 1 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,5). **Instrumentação:** 15 KV; 5s x 30 mBar; Capilar 75 μ m d.i e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #: Desconhecido; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Todos aos parâmetros analíticos e instrumentais avaliados não foram suficientes para proporcionar a separação completa das sete BAs investigadas, uma vez que a histamina permaneceu indetectável. Dessa forma, novos ajustes foram feitos a partir da melhor condição de separação estabelecida (Figura 26 C). Experimentos anteriores indicaram que a α -ciclodextrina desempenhou um papel positivo na separação entre tiramina e triptamina, enquanto o EDTA contribuiu para uma melhor resolução entre putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina. Diante

dessas observações, decidiu-se avaliar a influência da variação das concentrações desses componentes no eletrólito de corrida mantendo os demais parâmetros analíticos e instrumentais constantes, exceto o comprimento total do capilar que foi ajustado para 63,5 cm (Tabela 10).

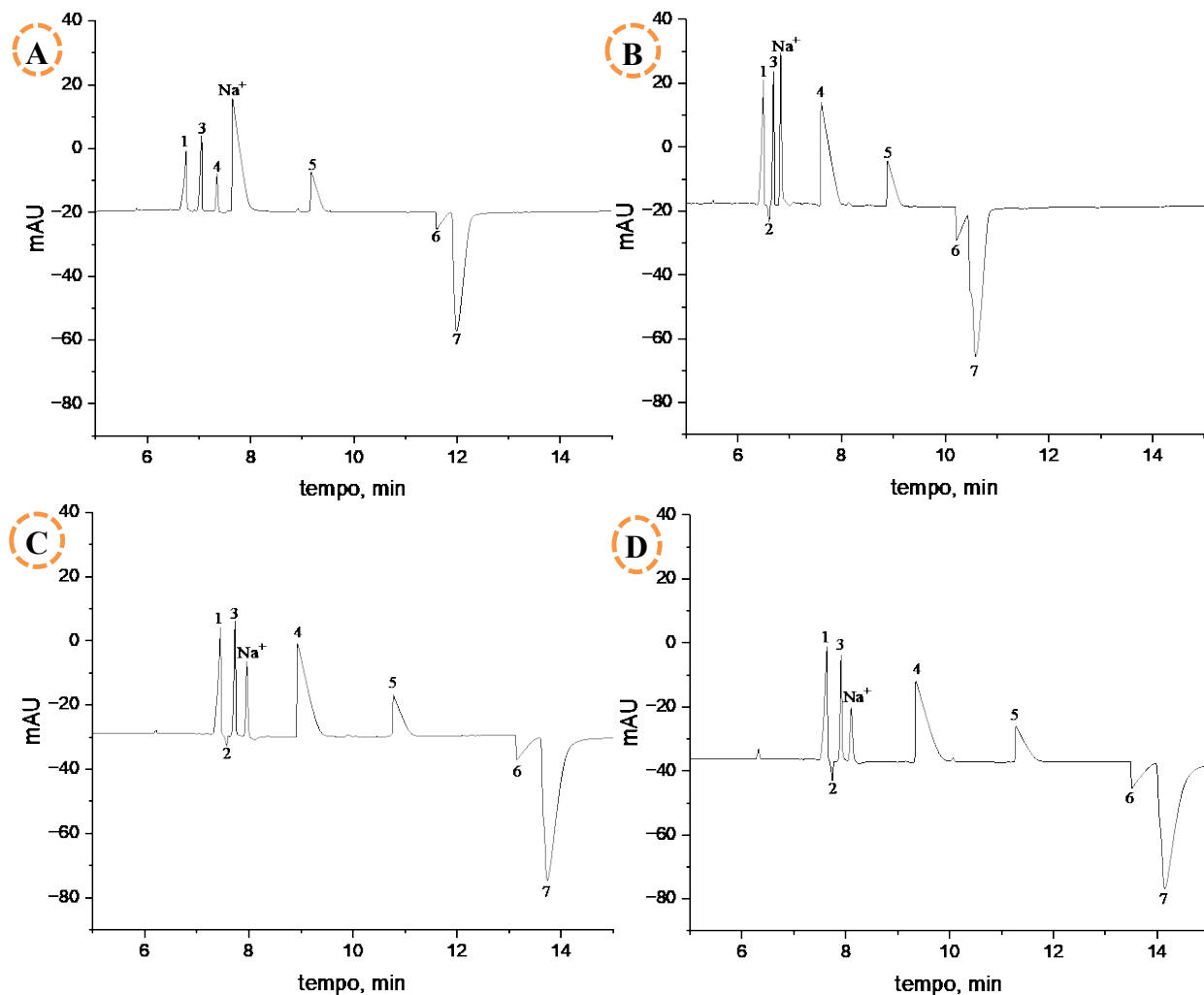
Tabela 10 – Combinações de EDTA e α -ciclodextrina testadas.

Concentração EDTA (Mmol L ⁻¹)	Concentração α -cd (Mmol L ⁻¹)
1,5	15
3,0	10
3,0	7,5
3,5	7,0

Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados demonstraram que a condição com 3,5 mmol L⁻¹ de EDTA e 7 mmol L⁻¹ de α -ciclodextrina no eletrólito de corrida, proporcionou a melhor separação de todas as BAs, incluindo a histamina, conforme ilustrado na Figura 27 D.

Figura 27 – Efeito de diferentes combinações de EDTA e α -ciclodextrina.



Legenda: **A.** 1,5 mmol L⁻¹ EDTA – 15 mmol L⁻¹ de α -cd; **B.** 3 mmol L⁻¹ EDTA – 10 mmol L⁻¹ de α -cd; **C.** 3 mmol L⁻¹ EDTA – 7,5 mmol L⁻¹ de α -cd; **D.** 3,5 mmol L⁻¹ EDTA – 7 mmol L⁻¹ de α -cd. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A α -cd apresentou um efeito seletivo, promovendo uma melhor separação entre tiramina e triptamina, o que se deve à sua capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas orgânicas. Por outro lado, o EDTA, como agente quelante, demonstrou um impacto significativo na resolução das aminas, possivelmente devido à sua interação com cátions metálicos residuais presentes no sistema, reduzindo interferências e melhorando a seletividade da separação.

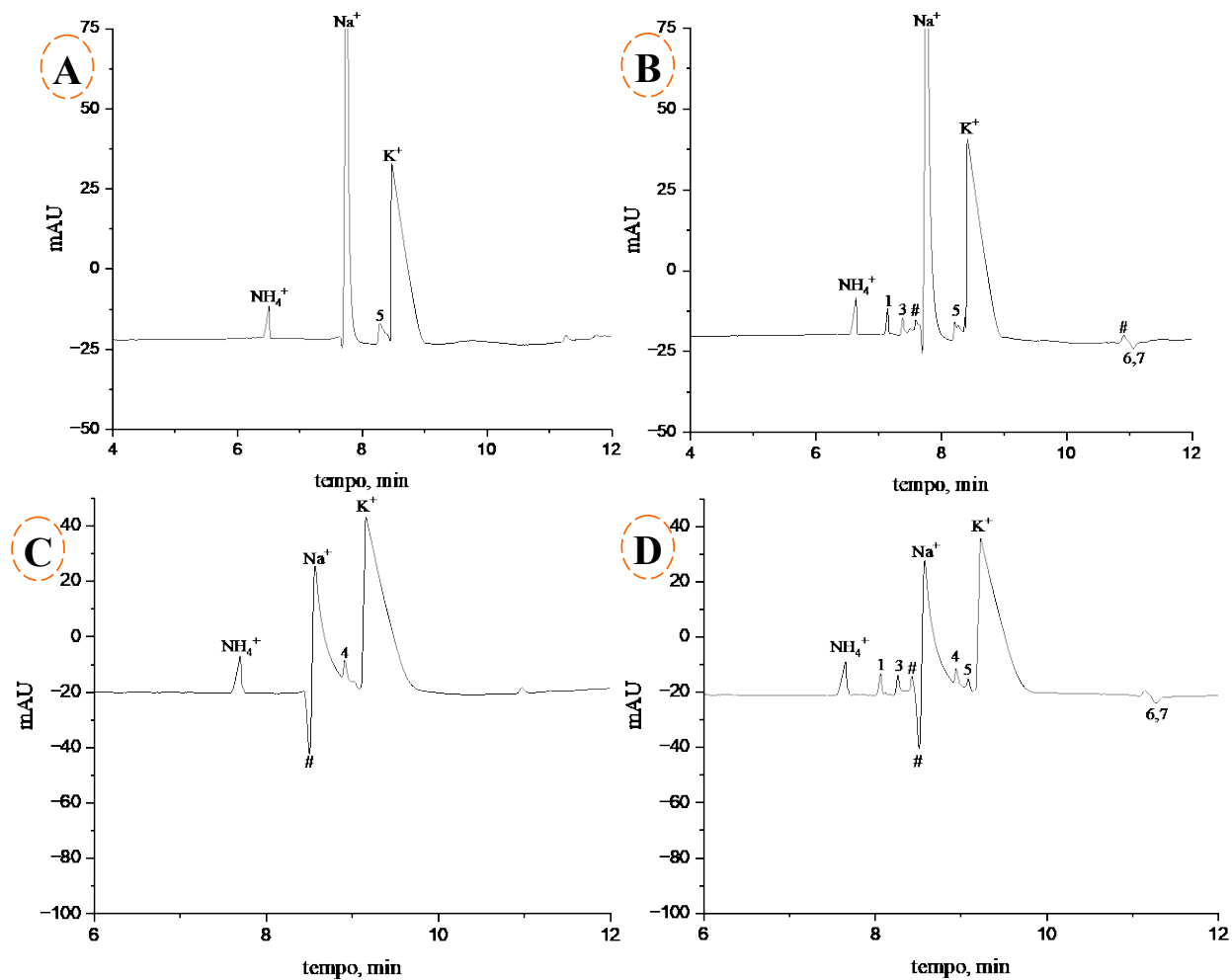
O aumento da concentração do EDTA para 3,5 mmol L⁻¹, associada à redução da concentração de α -ciclodextrina para 7 mmol L⁻¹, mostrou-se uma combinação mais eficiente e foi selecionada como condição otimizada para as próximas etapas.

4.2. Avaliação do Processo de Extração

O procedimento de extração foi avaliado utilizando dois diferentes ácidos em concentrações variadas: TCA (10% m/v, 5% m/v) e HCl (1 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹) (Dos Reis, Custódio e Glória, 2015; Adimcilar, Öztekin e Bedia Erim, 2017) (Rong, Zhongqi e Xue, 2022). O procedimento de extração foi feito como descrito na seção experimental. O teste foi feito utilizando amostras de cogumelos *in natura*. Os resultados, referentes a separação das aminas, estão apresentados na Figura 28 e 29.

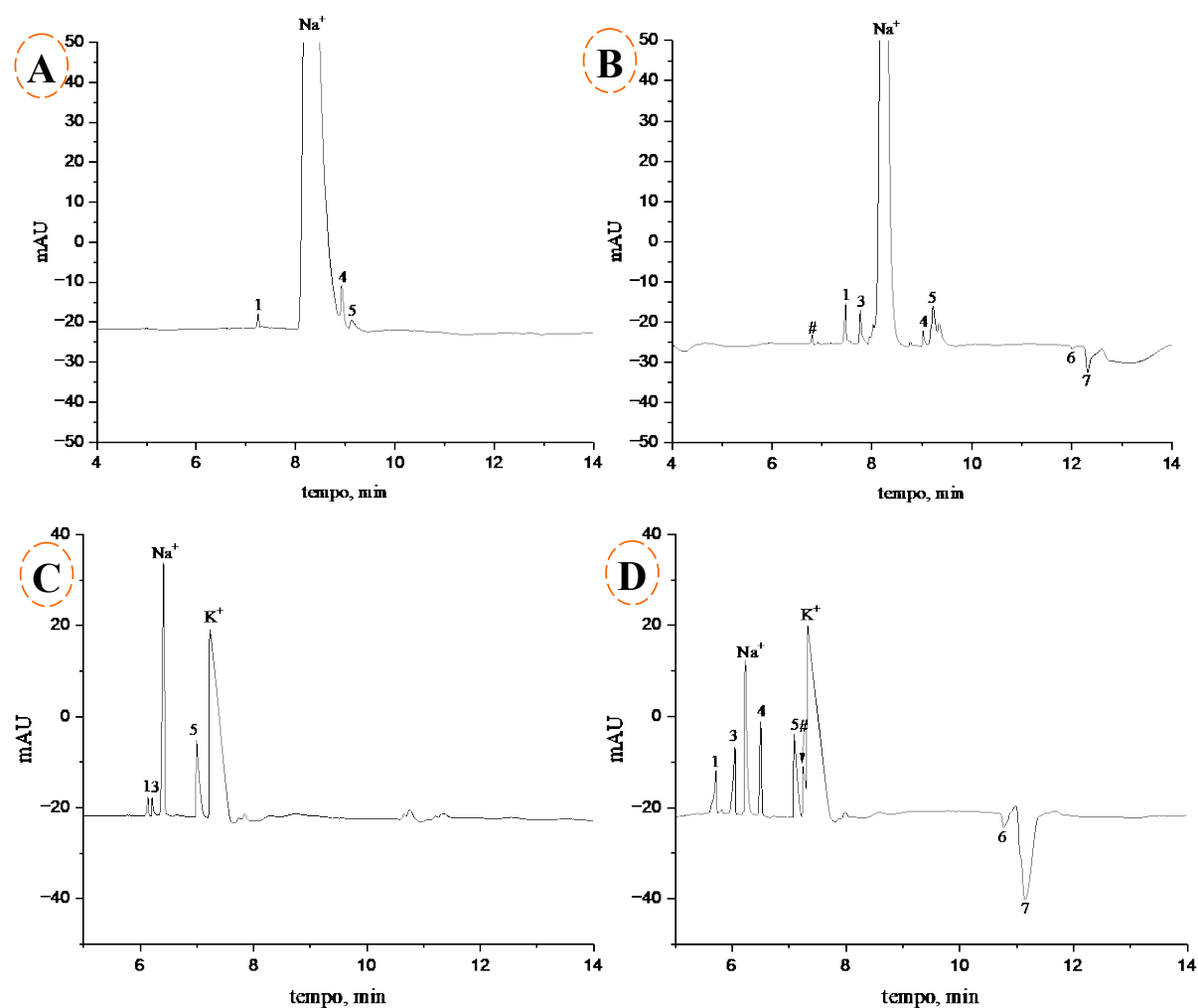
O ácido TCA não proporcionou resultados satisfatórios na extração e separação das BAs, tendo interferido no sinal analítico dos picos durante a separação (Figura 28). Este problema está relacionado ao fato de o TCA ter a capacidade de alterar significativamente o pH da solução eletrolítica, causando a ionização das BAs, alterando sua mobilidade eletroforética e, conseqüentemente, interferindo na resolução entre os picos. Resultados similares foram observados nas amostras extraídas com 1 mol L⁻¹ HCl, em que o sinal analítico da amostra fortificada foi muito reduzido, não tendo separado os analitos na amostra (Figura 29 A). Além da alteração do pH eletrolítico, podem afetar o EOF pela capacidade de adsorver na superfície interna do capilar modificando a superfície (František e Michal, 2006). Para resolver esse problema, avaliou-se a extração das amostras utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹. A Figura 29 D apresenta os resultados obtidos, sendo possível observar que a redução da concentração do HCl proporcionou resultados mais promissores para a separação das BAs, com melhor resolução e sinal analítico.

Figura 28 - Efeito de ácido tricloroacético na extração e separação de aminas biogênicas por detecção indireta em eletroforese capilar.



Legenda: **A.** TCA 5%-Amostra; **B.** TCA 5%-Spike; **C.** TCA 10%-Amostra; **D.** TCA 10%-Spike; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α -cyclodextrina, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #: Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Figura 29 - Efeito de ácido clorídrico na extração e separação de aminas biogênicas por detecção indireta em eletroforese capilar.

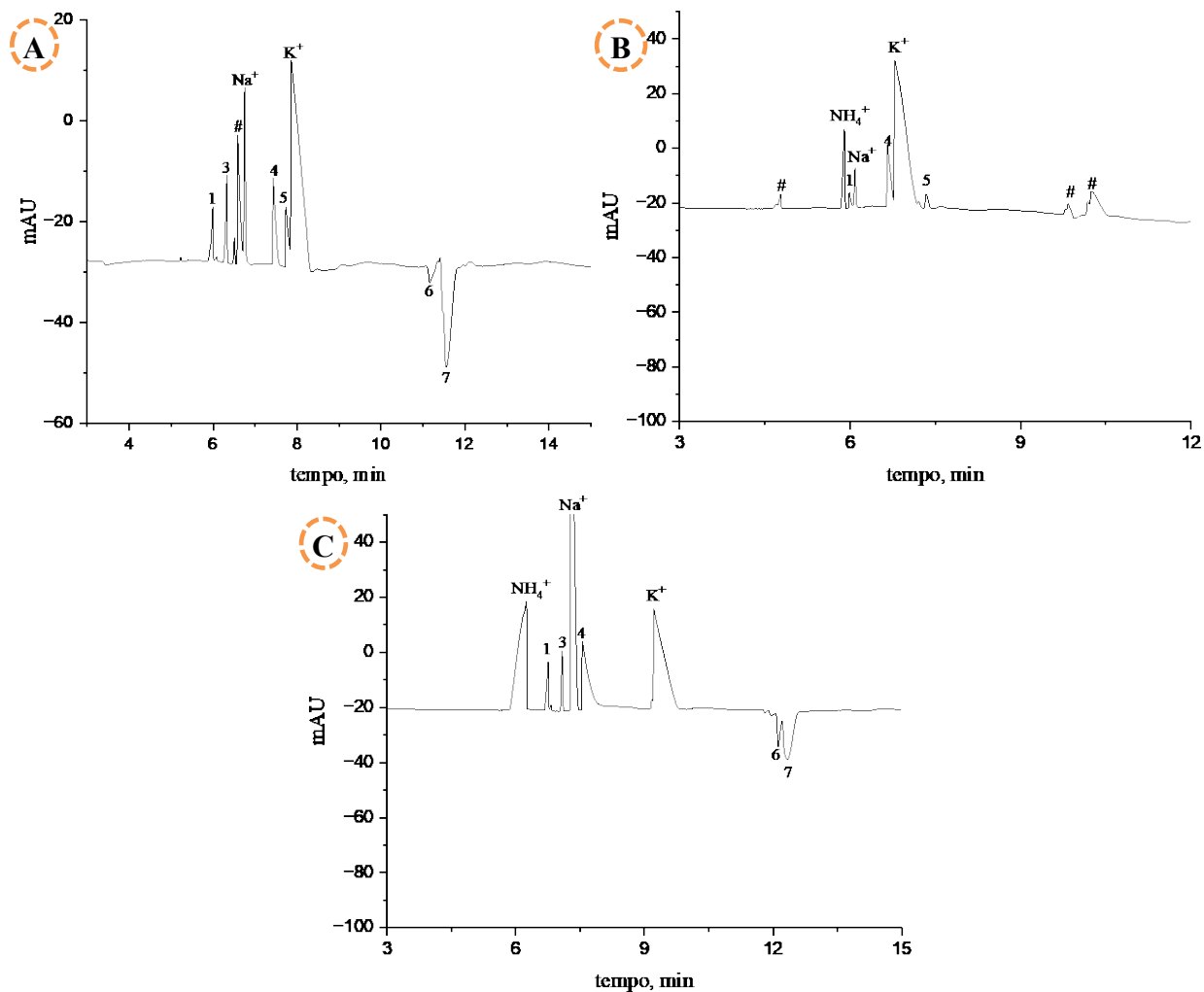


Legenda: A. 1 mol L⁻¹ HCl-Amostra; B. 1 mol L⁻¹ HCl -Spike; C. 0,1 mol L⁻¹ HCl -Amostra; D. 0,1 mol L⁻¹ HCl-Spike; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹; **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α-cd, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5 s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μm d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Em todos os experimentos utilizando amostras de cogumelos foi observada presença de sinal analítico referente a picos desconhecidos que coeluíram com as aminas. Isso sugere efeitos de matriz na amostra, interferindo na separação e detecção precisa das aminas. Para resolver a interferência da matriz, foi avaliado o efeito da adição ao eletrólito de corrida de metanol 5% v/v,

do ácido adípico 5% m/v e do etanol 5% v/v. O metanol atuando como modificador orgânico, influenciou a mobilidade eletroforética dos analitos, mas não impediu a coeluição entre a espermina com o íon potássio (Figura 30 A), mostrando-se ineficaz para resolver o problema da matriz. O etanol por sua vez também como modificador orgânico, não ofereceu resultados satisfatórios na separação das aminas com os íons, tendo apresentado coeluição entre a histamina, cadaverina e sódio, influenciando também na redução de magnitude do sinal analítico da tiramina e triptamina. O ácido adípico, como contra-íon divalente, influenciou significativamente a mobilidade dos analitos divalentes, auxiliando na separação do sódio da cadaverina e espermidina. No entanto, causou a coeluição do íon potássio com a espermina (Figura 30 C).

Figura 30 - Efeito de metanol, etanol e ácido adípico adicionados ao eletrólito para separar íons das aminas biogênicas por detecção indireta.

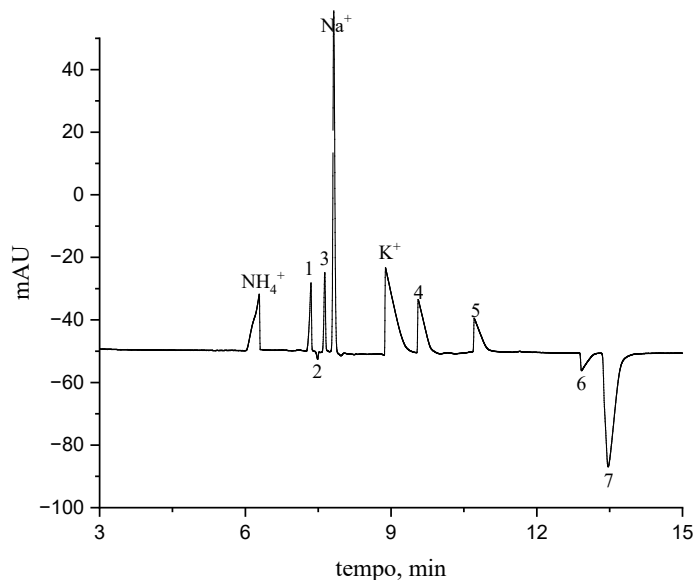


Legenda: **A.** Avaliação de metanol 5% v/v; **B.** Avaliação de etanol 5% v/v; **C.** Avaliação de ácido adípico 5% m/v; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α -cyclodextrina, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,5). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A adição de modificadores orgânicos e ácido adípico não apresentou resultados satisfatórios em relação ao efeito da matriz. Diante disso, foi avaliado o efeito no sistema de separação na redução do pH da solução eletrolítica como estratégia alternativa para melhorar a separação das aminas em presença de íons interferentes.

O valor do pH do eletrólito de corrida foi reduzido de 4,5 para 4,0 com ácido acético 0,1 mol L⁻¹. Essa redução promoveu um resultado positivo na resolução entre os analitos, resultando na separação efetiva de todas as BAs dos íons interferentes, conforme ilustrado na Figura 31.

Figura 31 - Efeito da redução do pH do eletrólito de corrida.



Legenda: Padrão de Aminas: 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α -CD, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,0). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #: Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

A redução do pH contribuiu para a modulação do grau de ionização das BAs, promovendo uma melhor seletividade e reduzindo interações indesejadas com a matriz, sendo assim, essa condição foi selecionada como otimizada para todas etapas subsequentes do experimento.

Devido as variações verificadas nos tempos de migração, foram testadas a benzilamina, trietilamina e 1,7 Diaminoheptano como padrões internos (PI). A utilização de um PI é essencial para aumentar a precisão e a confiabilidade das análises, pois flutuações EOF, temperatura e campo elétrico podem causar variações nos tempos de migração (Beckers e Bocek, 2003; Da Rosa *et al.*, 2018). A razão entre a área do pico do analito e a do PI corrige erros relacionados à evaporação da

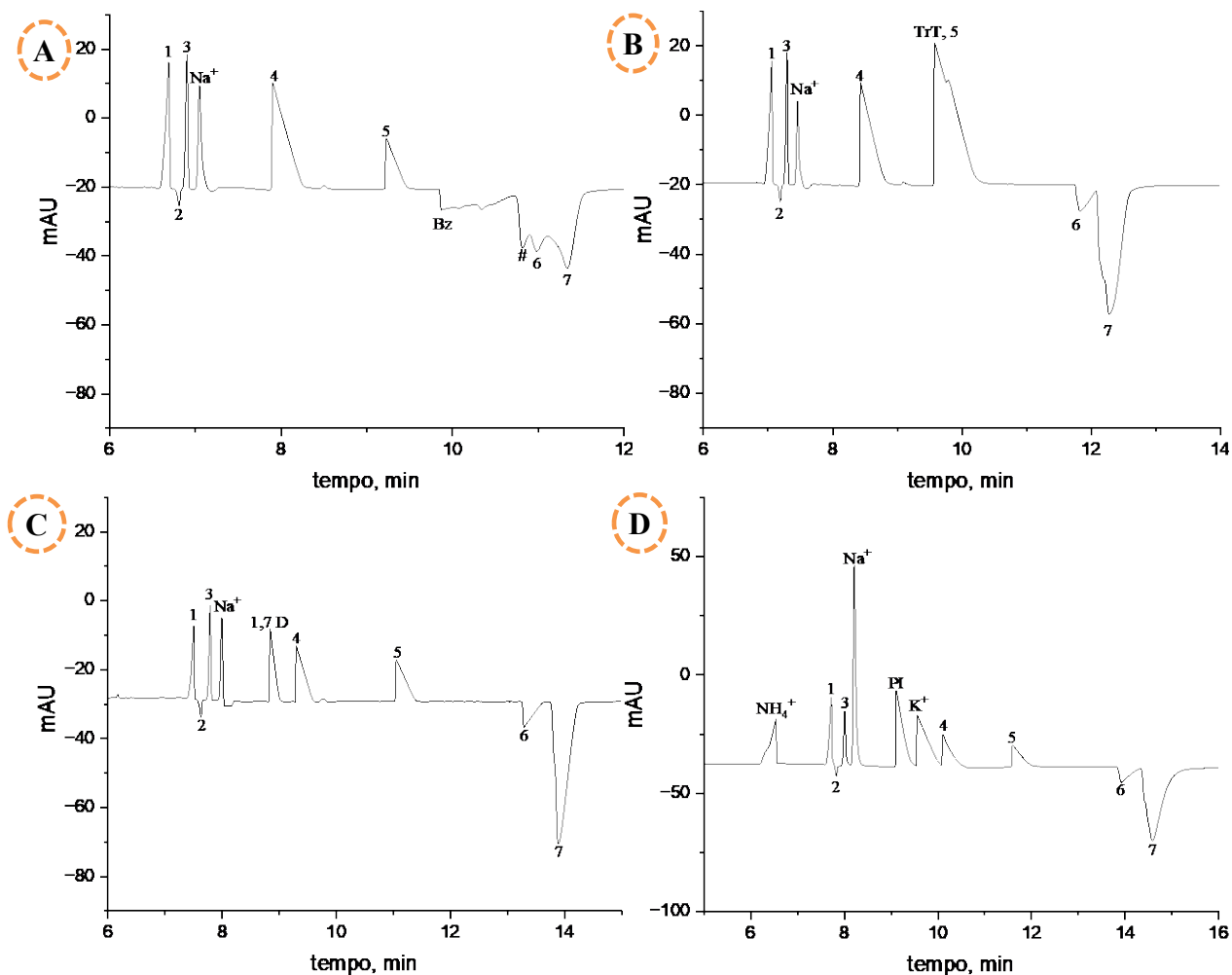
amostra, variações no tempo de migração e alterações nos parâmetros ópticos do capilar. Além disso, a utilização de um PI auxilia na identificação de aminas presentes em amostras reais, uma vez que os tempos de migração relativos (tempo de migração do pico do analito/tempo de migração do PI) são independentes de parâmetros como viscosidade (Pawel, Wozniakiewicz e Koscielniak, 2018). Adicionalmente, a seleção de um PI deve considerar sua estabilidade química, compatibilidade com o sistema de separação e capacidade de gerar um sinal detectável e bem resolvido dos demais picos presentes na amostra (Ali, Aboul-Enein e Gupta, 2006).

A benzilamina apresentou um pico de baixa magnitude no sinal analítico, sendo detectada após a migração da putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina, mas antes da tiramina e triptamina (Figura 32 A). No entanto, sua utilização como padrão interno mostrou-se inviável devido à interferência na resolução e na intensidade do sinal analítico da tiramina e triptamina. Além disso, a baixa magnitude do sinal comprometeu o desempenho do método, uma vez que um padrão interno deve apresentar um pico bem definido e estável, garantindo a precisão e confiabilidade das análises.

A trietilamina, por sua vez, também não se mostrou adequada, pois interferiu significativamente na separação das BAs, coelindo com a espermina (Figura 32 B). Dentre os compostos avaliados, o 1,7-diaminoheptano apresentou os melhores resultados como padrão interno. Esse composto exibiu um sinal analítico de alta magnitude e não interferiu na separação dos analitos de interesse, sendo, portanto, selecionado para os experimentos subsequentes (Figura 32 C).

Para assegurar a viabilidade do uso do 1,7-diaminoheptano como padrão interno em amostras reais, avaliou-se sua compatibilidade com a matriz da amostra. Os resultados demonstraram que o composto não coeluiu com os íons da matriz, permitindo a separação eficiente de todas as BAs e do padrão interno (Figura 32 D). Dessa forma, o 1,7-diaminoheptano foi validado como um padrão interno adequado para a metodologia proposta, garantindo maior confiabilidade na quantificação das aminas biogênicas em matrizes complexas.

Figura 32 - Efeito de diferentes compostos utilizados como padrão interno no sistema de separação para identificação das aminas biogênicas.



Legenda: A. Padrão de aminas e Benzilamina; B. Padrão de Aminas e Trietilamina; C. Padrão de aminas e 1,7 Diaminoheptano; D. Condição otimizada; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α -cyclodextrina, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH = 4,0). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Além dos compostos previamente analisados, foram também avaliados como potenciais padrões internos a dopamina, betaína e alanina. No entanto, esses analitos não apresentaram sinal analítico detectável sob as condições experimentais utilizadas (figuras não mostradas). A ausência

de sinal analítico desses compostos pode ser explicada com base em suas propriedades ácido-base e no comportamento eletroforético em pH 4,0. A CE depende da mobilidade eletroforética dos analitos, a qual está diretamente relacionada ao seu estado de ionização no meio de separação (ALTRIA, 1996). O pH da solução eletrolítica utilizada no presente estudo foi 4,0, e os compostos avaliados possuem valores de pKa que influenciam sua ionização nessa condição, afetando a migração eletroforética e, conseqüentemente, sua detecção. A dopamina, embora possua um grupo amina com pKa superior (8,9) ao pH do eletrólito de corrida, encontra-se predominantemente protonada em pH 4,0, o que lhe confere carga positiva. Entretanto, sua baixa mobilidade eletroforética pode ser atribuída a possíveis interações hidrofóbicas e eletrostáticas com a parede capilar, dificultando sua detecção (Kaczmarczyk *et al.*, 2022). A betaína, por sua vez, é um composto zwitteriônico permanente, com carga líquida próxima de zero em amplo intervalo de pH, o que impede sua migração eletroforética significativa (Fan *et al.*, 2023). A alanina, também em sua forma zwitteriônica nessa condição, apresenta carga líquida baixa, resultando em mobilidade eletroforética reduzida e, conseqüentemente, ausência de sinal analítico detectável (Kvasnička e Voldřich, 2006). Portanto, a ausência de sinal analítico para esses compostos pode ser atribuída à combinação de carga líquida insignificante, baixa mobilidade eletroforética e possíveis interações com a parede capilar, inviabilizando sua detecção nas condições experimentais utilizadas (ALTRIA, 1996; Ali, Aboul-Enein e Gupta, 2006; Beckers e Bocek, 2003; Adamova, 2025).

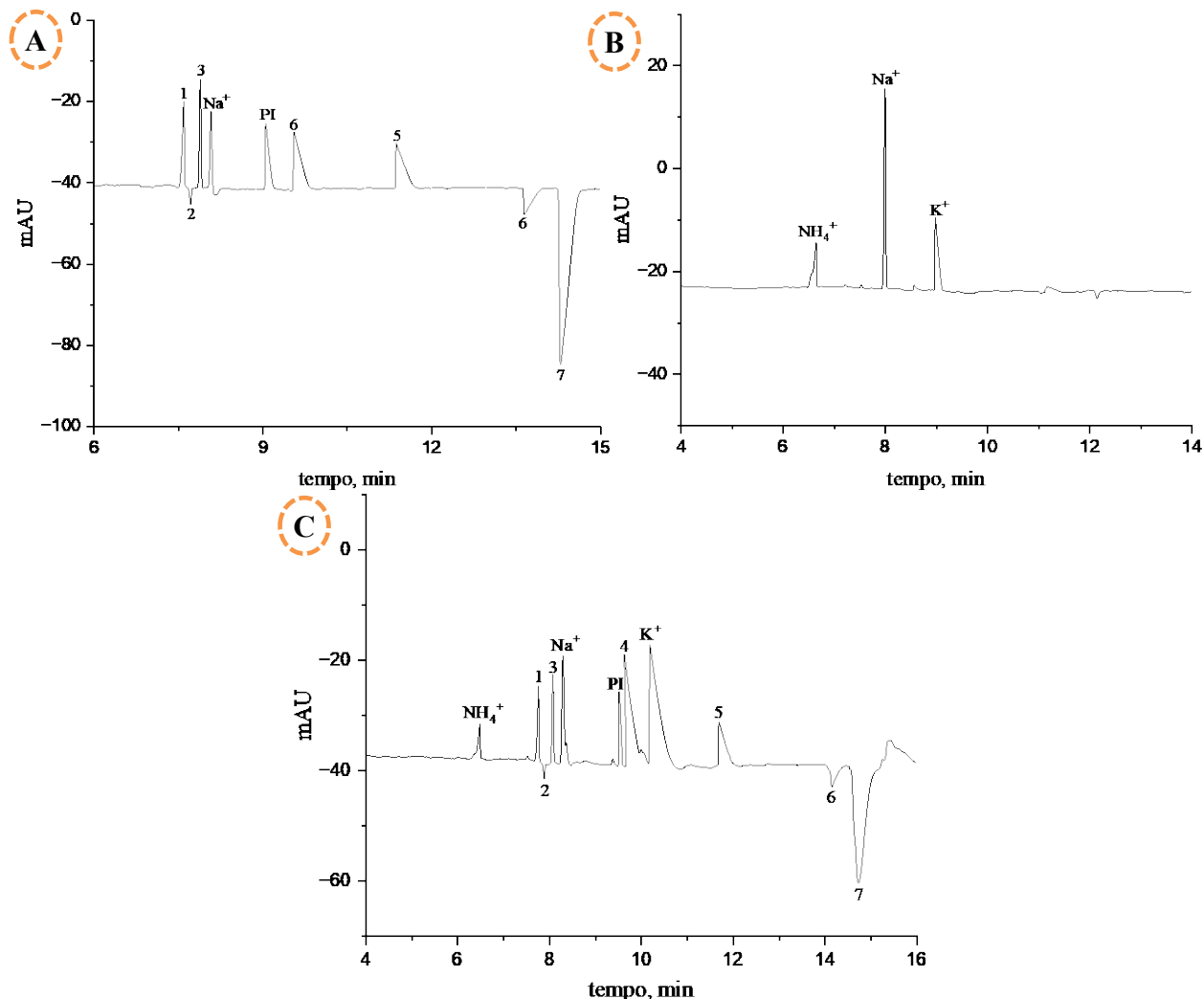
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método foi feita avaliando diferentes parâmetros que incluíram a seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e a exatidão.

4.3.1. Seletividade

A seletividade do método foi considerada satisfatória, não sendo observada interferentes do efeito matriz na separação dos analitos. As áreas obtidas para as aminas na amostra fortificada (Figura 33 C) apresentaram valores ligeiramente menores em comparação com o padrão de aminas (Figura 33 A), diferença essa que era esperada, uma vez que o branco da amostra (Figura 33 B) revelou a presença de alguns interferentes. Embora esses interferentes não tenham comprometido a migração e a separação das aminas, sugere-se que tenham causado alguma interferência no sinal analítico, contribuindo para a redução das áreas obtidas.

Figura 33 - Seletividade do método analítico.



Legenda: A. Padrão de aminas; B. Branco da amostra; C. Amostra fortificada; **Padrão de Aminas:** 10 mg L⁻¹. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α-CD e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH 4,0). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μm d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

4.3.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se uma curva analítica no intervalo de 2,0-10 mg L⁻¹ (n= 3 para cada concentração). O método analítico apresentou boa linearidade na faixa investigada para todas as aminas, apresentando valores de coeficiente de correlação (R), que variaram de 0,998 a 0,999 (Tabela 11). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA, 2017), a linearidade de um método pode ser considerada satisfatória quando o coeficiente de correlação obtido é igual ou superior a 0,990.

Tabela 11 – Dados estatísticos da curva analítica.

Aminas	Inclinação	Intercepto	Coefficiente De Correlação (R)
Putrescina	0,0699	0,0039	0,9998
Histamina	0,0126	0,0006	0,9991
Cadaverina	0,0691	0,0003	0,9997
Esperimidina	0,1637	0,0339	0,9995
Espermina	0,1393	0,0276	0,9988
Tiramina	0,0862	-0,0029	0,9988
Triptamina	0,6365	0,0431	0,9998

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que o método é adequado para quantificação das aminas no intervalo de concentração avaliada, atendendo aos critérios estabelecidos para validação de métodos analíticos.

4.3.3. Limite de detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) foram calculados com base na curva analítica. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para o método proposto.

Tabela 12 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método proposto.

Aminas	Método Proposto	
	LOD (mg L ⁻¹) ^a	LOQ (mg L ⁻¹) ^b
Putrescina	0,25	0,76
Histamina	0,51	1,56
Cadaverina	0,31	0,94
Esperimidina	0,38	1,15
Espermina	0,60	1,82
Tiramina	0,59	1,79
Triptamina	0,26	0,81

Legenda: ^a LOD = (3,3 * erro padrão)/inclinação da curva; ^b LOQ = (10 * erro padrão)/inclinação da curva; **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os resultados evidenciam que o método desenvolvido apresenta LOD e LOQ compatíveis aos métodos baseados em CE descritos na literatura com detecção indireta e condutométrica (CZE-CD) indireta, descritos por (Kaczmarczyk et al., 2022; Katarína et al., 2020; Kaczmarczyk et al., 2023; Wang et al., 2022). No entanto, os métodos que empregam derivatização prévia das aminas, como os reportados por Mantoanelli et al. (2020) e Feng et al. (2008), apresentam valores de LOD e LOQ menores para a maioria dos analitos, o que pode ser atribuído à melhora na sensibilidade analítica proporcionada pela introdução de grupos cromóforos ou fluoróforos nas moléculas-alvo. Apesar disso, o método proposto tem como vantagem a simplicidade e rapidez, eliminando etapas adicionais de derivatização, o que o torna atrativo para análises de rotina.

4.3.4. Precisão

A precisão foi expressa na forma de repetibilidade (n=3) e precisão intermediária (n= 9). Os resultados da precisão do método proposto estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 - Precisão do método proposto expressa como coeficiente de variação.

Aminas	Concentração (mg L ⁻¹)	TESTE DE PRECISÃO (%)	
		Repetibilidade ¹	Precisão Intermediária ²
Putrescina	2,0	1,3	2,1
	6,0	1,0	1,8
	10,0	0,6	1,9
Histamina	2,0	1,9	10
	6,0	1,9	9,5
	10,0	1,5	7,4
Cadaverina	2,0	1,4	1,5
	6,0	0,6	1,6
	10,0	0,8	2,0
Espermidina	2,0	1,2	14
	6,0	0,4	4,3
	10,0	0,9	0,9
Espermina	2,0	1,3	14
	6,0	1,1	5,9
	10,0	0,9	4,6
Tiramina	2,0	1,2	7,2
	6,0	1,2	5,9
	10,0	1,2	4,6
Triptamina	2,0	1,3	3,1
	6,0	0,7	3,0
	10,0	0,9	3,3

Legenda: ¹ medidas feitas em triplicata no mesmo dia; ² medidas feitas em triplicata em três dias consecutivos; Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo (HUBER, 2007), para que um método analítico seja considerado preciso, os valores de repetibilidade devem ser inferiores a 2% e os de precisão intermediária inferiores a 10%. Com base nos resultados apresentados, observa-se que para a repetibilidade, os coeficientes de variação (CV) de todas as BAs avaliadas estão abaixo de 2% em todas as concentrações analisadas. Esses resultados demonstram boa confiabilidade do método proposto.

Para a precisão intermediária, os resultados variaram de acordo com o analito e a concentração. As aminas putrescina, histamina, cadaverina, tiramina e triptamina apresentaram coeficientes de variação dentro do limite de 10% em todas as concentrações avaliadas (2, 6 e 10 mg L⁻¹). No entanto, para espermidina, espermina os valores de precisão intermediária

ultrapassaram o limite de 10% para a concentração de 2 mg L⁻¹. Em concentrações maiores (6 e 10 mg L⁻¹), os valores obtidos para a precisão intermediária estão dentro do limite de 10%.

4.3.5. Exatidão

A exatidão foi expressa na forma de recuperação. Os resultados obtidos para a exatidão do método estão sumarizados na Tabela 14.

Tabela 14 – Teste de recuperação utilizando diferentes concentrações de aminas biogênicas.

Aminas	Recuperação (%)		
	2,0 mg L ⁻¹	6,0 mg L ⁻¹	10,0 mg L ⁻¹
Putrescina	102,2 ± 1,3	98,3 ± 1,0	97,7 ± 0,7
Histamina	94,8 ± 1,9	95,6 ± 1,8	96,9 ± 1,6
Cadaverina	101,5 ± 1,5	99,5 ± 0,6	98,2 ± 0,9
Espermidina	110,2 ± 1,4	103,5 ± 0,5	97,6 ± 0,9
Espermina	97,0 ± 1,4	99,5 ± 1,1	97,5 ± 0,9
Tiramina	97,7 ± 1,3	105,3 ± 1,3	98,2 ± 1,2
Triptamina	94,7 ± 1,2	101,5 ± 0,8	96,7 ± 0,9

Legenda: Procedimento realizado em amostra de cogumelo; **Fonte:** elaborada pelo autor.

Os resultados demonstram que o método proposto é exato, pois a recuperação dos analitos está dentro do intervalo de 80 a 110 % conforme recomendado por (HUBER, 2007). Os resultados obtidos em relação a precisão evidenciam a capacidade do método de quantificar os analitos de interesse de maneira confiável, mesmo em uma matriz complexa como os cogumelos. A variação observada nos valores de recuperação entre as diferentes aminas e concentrações pode ser atribuída a fatores como a natureza química dos analitos, sua interação com a matriz, ou pequenas variações no preparo das amostras.

4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

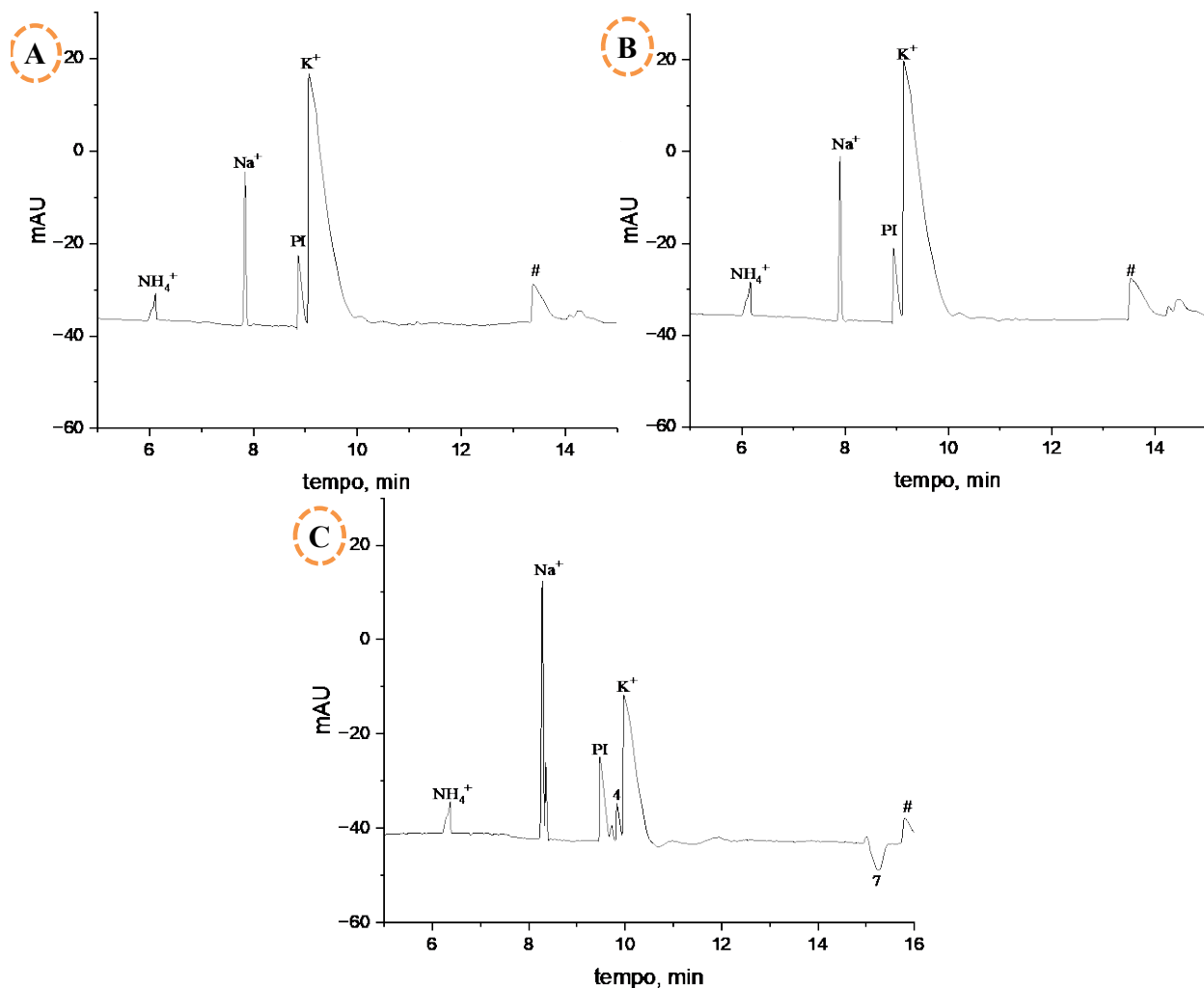
O método desenvolvido foi aplicado para avaliar a qualidade e a degradação de cogumelos ao longo do tempo, considerando diferentes condições de conservação. Foram analisadas três variedades de cogumelos: Hiratake, Champignon de Paris e Porto Belo. As amostras foram avaliadas em três momentos distintos: no dia da compra (Dia 0), no terceiro dia após a compra (Dia 3) e no quinto dia após a compra (Dia 5), que corresponde ao último dia de segurança para o consumo, de acordo com o rótulo do produto. No primeiro dia, cada amostra foi analisada e o excedente foi dividido em duas porções: uma armazenada em congelamento (freezer) e outra em

refrigeração simples (geladeira). As análises subsequentes foram realizadas para ambas as porções nos dias 3 e 5.

4.4.1. Testes de Degradação nos Dias 1, 3 e 5.

Os resultados obtidos no primeiro dia de análise indicaram a ausência de BAs nos cogumelos das variedades Hiratake e Champignon de Paris. Contudo, na variedade Porto Belo, foi detectada a presença de espermidina e triptamina, indicando que, mesmo em condições iniciais de conservação, essa variedade apresentava maior potencial de degradação ou maior conteúdo inicial dessas BAs (Figura 34).

Figura 34 – Análise de degradação no primeiro dia.

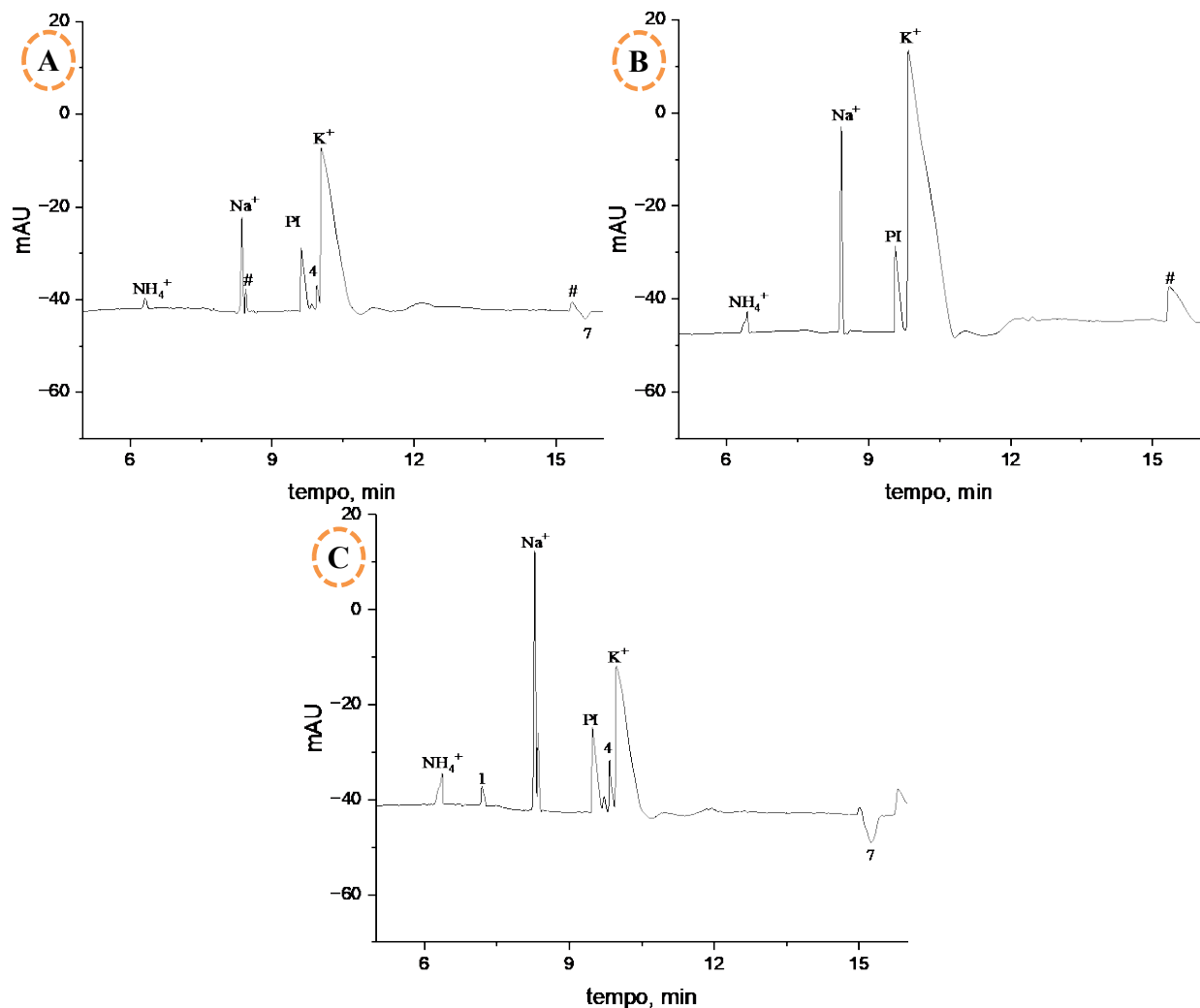


Legenda: A. Hiratake; B. Champignon de Paris; C. Porto Belo. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α -CD, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH 4,0). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μ m d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH₄⁺. íon amônio; Na⁺. íon Sódio; K⁺. íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

No terceiro dia de análise, as amostras conservadas por congelamento não mostraram alterações em relação aos resultados do primeiro dia para todas as variedades de cogumelos, indicando que até esse dia, o congelamento foi eficaz na preservação da qualidade dos cogumelos, evitando o acúmulo de BAs. Por outro lado, nas amostras armazenadas sob refrigeração, foram detectadas diferenças significativas. No Champignon de Paris, não foi observada a presença de BAs (Figura 35B). No Hiratake, foi observada a presença de espermidina e espermina (Figura

35A). Na variedade Porto Belo, houve um aumento nos picos de espermidina e triptamina, além da detecção de um novo pico correspondente à putrescina (Figura 35C).

Figura 35 - Análise de degradação de cogumelos no terceiro dia.

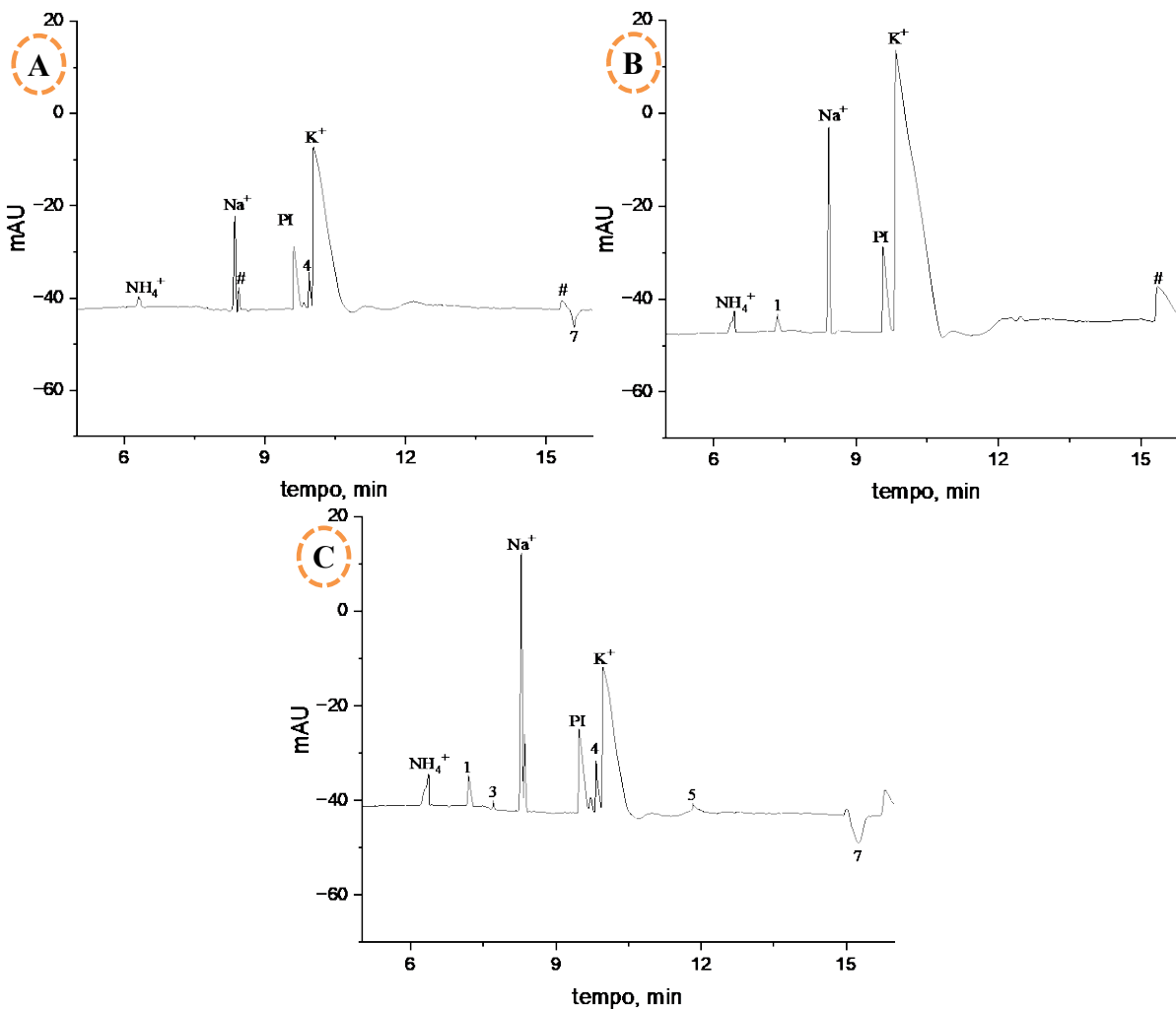


Legenda: A. Hiratake; B. Champignon de Paris; C. Porto Belo. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α -cyclodextrina, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH 4,0). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μm d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH_4^+ . íon amônio; Na^+ . íon Sódio; K^+ . íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

No quinto dia, os cogumelos mantidos sob congelamento continuaram apresentando resultados semelhantes aos observados nos dias anteriores, sem alterações significativas nos níveis

de BAs. Entretanto, nas amostras mantidas sob refrigeração, houve um aumento expressivo de BAs, especialmente na variedade Porto Belo, que apresentou picos de putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e triptamina (Figura 36C). No Champignon de Paris, foi detectado um sinal analítico de baixa magnitude referente à putrescina (Figura 36B), enquanto no Hiratake houve um aumento ligeiro nos picos de espermidina e triptamina (Figura 36A).

Figura 36 - Análise de degradação de cogumelos no quinto dia.



Legenda: A. Hiratake; B. Champignon de Paris; C. Porto Belo. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ imidazol, 30 mmol L⁻¹ éter coroa, 7 mmol L⁻¹ α -cyclodextrina, e 3,5 mmol L⁻¹ EDTA (pH 4,0). **Instrumentação:** 29°C; 5s x 30 mBar; 15 kV; capilar 75 μm d.i x 63,5 cm de comprimento total (55 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400: 214 nm. **Picos:** #. Desconhecido; NH_4^+ . íon amônio; Na^+ . íon Sódio; K^+ . íon potássio; 1. Putrescina; 2. Histamina; 3. Cadaverina; 4. Espermidina; 5. Espermina; 6. Tiramina e; 7. Triptamina.

Ao longo do tempo, as amostras mantidas sob congelamento não apresentaram alterações significativas nos níveis de BAs, indicando que essa condição de armazenamento é eficaz para inibir reações enzimáticas e microbiológicas responsáveis pela formação dessas substâncias. Em contraste, as amostras mantidas sob refrigeração apresentaram um aumento progressivo das BAs, especialmente no Porto Belo, que apresentou maior diversidade de compostos, incluindo putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e triptamina. Esses resultados sugerem que as condições de refrigeração, embora adequadas para retardar o crescimento microbiano, não são suficientes para impedir a formação de BAs em variedades mais susceptíveis.

A presença de putrescina e cadaverina em amostras no quinto dia é preocupante, pois essas aminas estão frequentemente associadas à degradação protéica e ao crescimento de microrganismos deteriorantes (Elias, Fraqueza e Laranjo, 2018). Além disso, a formação de espermidina e triptamina reflete a atividade enzimática de descarboxilases específicas, que pode ser influenciada pelas condições de armazenamento e pela composição química dos cogumelos (Doeun, Davaatseren e Chung, 2017; Yu *et al.*, 2021). Os resultados obtidos para o Champignon de Paris, que apresentou apenas baixos níveis de putrescina no quinto dia, indicam que esta variedade é mais estável em termos de formação de BAs em comparação às outras variedades analisadas.

De maneira geral, os dados sugerem que o congelamento é a melhor estratégia para preservar a qualidade dos cogumelos, evitando a formação de BAs durante o armazenamento. Por outro lado, o armazenamento sob refrigeração simples pode ser utilizado por períodos curtos, mas apresenta riscos de formação de compostos indesejáveis, especialmente em variedades mais susceptíveis, como o Porto Belo.

4.4.2. Determinação Quantitativa das Aminas Biogênicas em Cogumelos

O método desenvolvido também foi utilizado para quantificar as BAs presentes nos cogumelos, avaliados nos três períodos descritos anteriormente (Tabela 15).

Tabela 15 - Quantificação de amins biogênicas em amostras de cogumelos pelo método proposto.

Concentração Das Amostras (mg Kg)									
Aminas	Hiratake			Champignon de Paris			Porto Belo		
	Dia 1	Dia 3	Dia5	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 1	Dia 3	Dia 5
Putrescina	ND	ND	ND	ND	ND	1,5±0,02	ND	1,7±0,02	7,6±0,1
Histamina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cadaverina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,6±0,5
Espermidina	ND	4,8±0,08	9,7±0,09	ND	ND	ND	3,7±0,06	7,3±0,05	14±0,2
Espermina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,6±0,05
Tiramina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Triptamina	ND	1,6±0,03	4,0±0,05	ND	ND	ND	1,9±0,03	2,5±0,03	4,6±0,05

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise quantitativa das BAs nos cogumelos revelou variações consideráveis entre as variedades e ao longo do tempo de armazenamento. É crucial destacar há ausência de limites específicos para BAs em cogumelos. Os limites utilizados nesta discussão referem-se a outros alimentos e foram considerados para fins de comparação. Adicionalmente, a sensibilidade do método analítico pode influenciar a detecção das amins, e fatores como condições de cultivo e processamento podem impactar a formação desses compostos (Vasconcelos *et al.*, 2021).

O cogumelo Hiratake apresentou aumento progressivo na concentração de espermidina, atingindo 9,7 mg kg⁻¹ no quinto dia. A legislação estipula limites para queijos e produtos cárneos na faixa de 50-100 mg kg⁻¹ (Bulula *et al.*, 2017; Coelho, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2021), A triptamina também aumentou no Hiratake, atingindo 4,0 mg kg no quinto dia, estando abaixo do limite de 100 mg kg estabelecido para queijos maturados (Chang & Miles, 2004; RYS *et al.*, 2022; Jakabová *et al.*, 2024).

No Champignon de Paris, apenas a putrescina foi detectada no quinto dia (1,5 mg kg), valor inferior ao limite de 900 mg kg para produtos cárneos fermentados (Shalaby, 1996; Doeun *et al.*, 2017).

O Porto Belo apresentou a maior diversidade e concentração de aminas. A putrescina atingiu 7,6 mg kg no quinto dia. A cadaverina foi detectada apenas no quinto dia ($6,6 \pm 0,5$ mg kg), também abaixo do limite para produtos cárneos (Shalaby, 1996; Gomes et al., 2014). A espermidina (14 mg kg) e a espermina (2,6 mg kg) no quinto dia não excederam os limites estabelecidos para queijos, produtos cárneos (Bulula et al., 2017; Coelho, 2012; Vasconcelos et al., 2021) e produtos cárneos fermentados (30 mg kg) (Chang & Miles, 2004; Suzzi & Gardini, 2003), respectivamente. A triptamina também não ultrapassou o limite para queijos maturados, atingindo 4,6 mg kg no quinto dia.

Esses resultados indicam que o acúmulo de BAs em cogumelos varia significativamente entre as variedades e aumenta com o tempo de armazenamento. O Porto Belo demonstrou maior suscetibilidade ao acúmulo de aminas biogênicas. Assim, esses resultados reforçam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre os níveis seguros de aminas biogênicas em cogumelos, visando garantir a segurança alimentar e a saúde pública, especialmente para indivíduos sensíveis a essas substâncias (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011).

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho propõe um novo método de análise, para a determinação de aminas biogênicas em amostras de cogumelos e potencialmente aplicável a diversos alimentos sólidos e líquidos, utilizando a eletroforese capilar com detecção indireta. As principais vantagens do método incluem o curto tempo de análise, dispensável as etapas de derivatização e o custo-benefício em relação a outras técnicas de separação.

O desenvolvimento inicial do método de detecção direta com derivatização de aminas foi dificultado pela separação entre espermidina e espermina, e entre tiramina e triptamina. Diversos aditivos orgânicos, ciclodextrinas e surfactantes foram testados em diferentes combinações instrumentais, sem sucesso, impedindo a continuidade do método.

O método de detecção indireta otimizado apresenta os seguintes parâmetros analíticos e instrumentais: eletrólito constituído por 15 mmol L⁻¹ de imidazol, 30 mmol L⁻¹ de éter coroa, 7 mmol L⁻¹ de α -ciclodextrina e 3,5 mmol L⁻¹ de EDTA (pH 4,0). Os parâmetros instrumentais selecionados foram: 15 kV, 29°C, 30 mbar por 5 segundos, 214 nm de comprimento de onda e 58,5 cm de capilar. A validação do método apresentou boa seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação adequados, além de valores de precisão e exatidão adequados, garantindo sua aplicabilidade para a análise de aminas biogênicas em amostras de cogumelos

A avaliação da qualidade e degradação dos cogumelos ao longo do tempo, revelou que o congelamento é a estratégia mais eficaz para preservar a qualidade dos cogumelos, evitando a formação de aminas biogênicas durante o armazenamento. Por outro lado, a refrigeração simples pode ser utilizada por curtos períodos, mas apresenta riscos de formação de compostos indesejáveis, especialmente na variedade Porto Belo. A ausência de limites regulatórios específicos para BAs em cogumelos destaca a necessidade de estudos adicionais para estabelecer padrões de segurança alimentar. Os resultados deste estudo contribuem para o avanço na compreensão da dinâmica de formação dessas substâncias e reforçam a importância do monitoramento dessas substâncias para garantir a segurança do consumidor.

Recomenda-se que estudos futuros avaliem a eficácia do método proposto em outros alimentos, abrangendo tanto produtos sólidos quanto líquidos, de modo a consolidar sua robustez

e versatilidade. Ademais, é pertinente investigar a dinâmica de formação de amins biogênicas em cogumelos submetidos a diferentes condições de conservação, tais como desidratação, conserva em óleo ou em salmoura, a fim de compreender seu impacto na segurança e na qualidade do produto final.

Outro aspecto relevante para futuras investigações é a compreensão dos mecanismos que levaram a maiores concentrações de amins biogênicas na variedade Porto Belo em relação às demais. Tal análise poderia envolver a caracterização da microbiota associada a cada variedade, bem como a investigação de fatores genéticos e metabólicos intrínsecos aos cogumelos.

Além disso, propõe-se a realização de estudos toxicológicos que avaliem os potenciais riscos à saúde decorrentes do consumo de cogumelos com altos níveis de amins biogênicas, contribuindo para a definição de limites seguros e a adoção de políticas regulatórias. Finalmente, a investigação do impacto de diferentes práticas de cultivo e colheita na formação dessas substâncias pode fornecer subsídios valiosos para a produção de cogumelos mais seguros e com maior qualidade.

6. REFERÊNCIAS

ADAMOVA, A. A. . O. M. S. . R. N. S. E. A. New Comb-Like Polyelectrolytes in Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, 2025. 33-43.

ADIMCILAR, V.; ÖZTEKIN, N.; BEDIA ERIM, F. Direct and Sensitive Analysis Method for Biogenic Amines in Dairy Products by Capillary Electrophoresis Coupled with Contactless Conductivity Detection. **Food Analytical Methods**, Istanbul, v. 11, p. 1374–1379, 07 December 2017.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; GUPTA, V. K. Precision in Capillary Electrophoresis. **Analytical Letters**, v. 39, n. 11, p. 2345-2357, 20 Mar 2006.

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. 1. ed. [S.l.]: Humana Totowa, NJ, v. 52, 1996. IX, 349 p. ISBN 1064-3745.

ANPC. **Cogumelos**. Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. [S.l.]. 2021.

ANVISA. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de, p. 48. 2001.

BECKERS, J. L.; BOCEK, P. The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: golden rules and pitfalls. **Electrophoresis**, v. 24, n. 3, p. 518-535, Jan 2003.

BÖHM, D. **The combination of amperometry and mass spectrometry as a novel dual detection concept for capillary electrophoresis**. University of Regensburg. [S.l.], p. 127. 2024.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **Int J Food Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 33-41, 1 December 1999.

BULULA, N.; MUGOYELA, V.; KAALE, E. Investigation of Contributing Factors to Scombroid Fish Poisoning among Dar es Salaam City Residents in Tanzania. **Open Access Library Journal**, v. 4, n. 11, 8 Nov 2017.

CAO, L. et al. Analysis of neurotransmitter catecholamines and related amines in human urine and serum by chromatography and capillary electrophoresis with 1, 3, 5, 7-tetramethyl-8-(N-

hydroxysuccinimidyl propionic ester)-difluoro-boradiaza-s-indacene. **Acta Chromatographica**, v. 34, n. 3, p. 276-286, 02 Jun 2022.

CARDOZO, M. et al. Aminas Biogênicas: Um Problema de Saúde Pública. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 149-168, Abril 2013. ISSN 1984-6835.

CHANG, S.-T.; MILES, P. G. **Mushrooms-Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact**. 2. ed. [S.l.]: [s.n.], 2004. 480 p. ISBN 9780429208874.

CHARD, E. et al. Gender and cross-country differences in the determinants of sustainable diet intentions: a multigroup analysis of the UK, China, Sweden, and Brazil. **Frontiers in Psychology**, 15, 28 Feb 2024.

COELHO, S. A. S. **Determinação expedita de aminas biogênicas em cogumelos por TLC**. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. Bragança, p. 72. 2012.

COMAS-BASTÉ, O. et al. Histamine Intolerance: The Current State of the Art. **Biomolecules**, v. 10, n. 8, p. 1181, 14 Aug 2020.

COTON, M. et al. Prevalence and biodiversity of biogenic amine forming lactic acid bacteria in wine and cider. **Food Microbiol**, v. 27, n. 8, p. 1078–1085, Dec 2010.

DA ROSA, J. et al. Eletroforese Capilar para Iniciantes. **Embrapa**, Rio de Janeiro, RJ, v. 26, n. 1, p. 133, Dez 2018. ISSN 1516-8247.

DADÁKOVÁ, E.; KŘÍŽEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 365-370, 2009. ISSN 0308-370.

DADÁKOVÁ, E.; PELIKÁNOVÁ, T.; KALÁČ, P. Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. **European Food Research and Technology**, n. 1, p. 163-171, 2009.

DANIEL, D. et al. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1416, p. 121-128, 16 Oct 2015.

DE FREITAS, M. D. C. S.; PENA, P. G. L. Feeding and nutritional security: the construction of knowledge with emphasis on cultural aspects. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 69-81, Fev 2007.

DE QUEIROZ, S. C. D. N.; JARDIM, I. C. S. F. Electroforese Capilar. **Chemkeys**, Campinas, SP, v. 8, p. 1-9, 2018.

DE YIXUAN, V. et al. Development of a capillary electrophoresis method based on magnetic solid-phase extraction for simultaneous and sensitive detection of eight biogenic amines in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 104, n. 6, p. 3256-3264, Dec 2023.

DOEUN, D.; DAVAATSEREN, M.; CHUNG, M.-S. Biogenic amines in foods. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, p. 1463–1474, 13 December 2017.

DONEGATTI, T. A. **UTILIZAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR COMO TÉCNICA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM SISTEMAS DE**. Sorocaba. 2020.

DOS REIS, G. C. L.; CUSTÓDIO, F. B.; GLÓRIA, B. D. A. Aminas Biogenicas em cogumelos do genero Pleurotus. **Caderno de Ciencias Agrarias**, Belo Horizonte/MG, 7, 27 Novembro 2015. 11-16. Disponível em: <<https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/issue/view/130>>. Acesso em: 21 jan. 2025.

DOSSI, N. et al. A modified electrode for the electrochemical detection of biogenic amines and their amino acid precursors separated by microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 32, n. 8, p. 906-912, April 2011.

DUPRAT, L.; SOUZA, J. **Análise da Comercialização e do Consumo de Cogumelos Comestíveis no Mercado do Distrito Federal e Entorno**. Embrapa. [S.l.], p. 34. 2003.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in. **EFSA Journal**, Parma, v. 9, n. 10, p. 93, 2011. Disponível em: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>. Acesso em: 21 jan. 2025.

ELIAS, M.; FRAQUEZA, M. J.; LARANJO, M. Biogenic amines in food: presence and control measures. In: STADNIK, J. **BIOGENIC AMINES (BA): Origins, Biological Importance and**

Human Health Implications. New York: Nova, Science Publishers, 2018. Cap. 4, p. 129-176. ISBN 978-1-53612-712-6. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10174/24309>>. Acesso em: 5 jan. 2025.

FAN, Y. et al. Development of a capillary electrophoresis method based on magnetic solid-phase extraction for simultaneous and sensitive detection of eight biogenic amines in foods. **Society of Chemical Industry**, v. 104, p. 3256-3264, 23 Dec 2023.

FANG, H.; VICKREY, T. L.; VENTON, B. J. Analysis of Biogenic Amines in a Single Drosophila Larva Brain by Capillary Electrophoresis with Fast-Scan Cyclic Voltammetry Detection. **Analytical chemistry**, v. 83, p. 2258-2264, 15 Feb 2011.

FAO. **How to Feed the World in 2050**. Food and Agriculture Organization of the United Nation. [S.l.]. 2024.

FENG, X. et al. Separation and determination of biogenic amines in fish using MEKC with novel multiphoton excitation fluorescence detection. **jss-journal**, v. 31, p. 824-828, Sep 2008.

FERNÁNDEZ-NOVOA, L.; CACABELOS, R. Histamine function in brain disorders. **Behavioural brain research**, v. 124, n. 2, p. 213-233, 15 Out 2001.

FRANTIŠEK, K.; MICHAL, V. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 145-149, 2006. ISSN 0021-9673.

FURLANI, R. Z.; GODOY, H. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Food Sci Technol**, v. 27, n. 1, p. 154-174, Jan 2007.

GHASEMI-VARNAMKHAJASTI, M. et al. Potential use of electronic noses, electronic tongues and biosensors as multisensor systems for spoilage examination in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 71-92, 2018. ISSN 0924-2244.

GINTEROVÁ, P. et al. Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 9, n. 4, p. 135-139, 1 Sept 2012.

GOMES, M. B. et al. The risk of biogenic amines in food. **Cien Saude Colet**, v. 19, p. 1123-34, April 2014. ISSN PMID:24820595.

GUBARTALLAH, E. A. et al. Determination of Biogenic Amines in Seawater Using Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Molecules**, v. 23, n. 1112, p. 1-9, 8 May 2018.

GUO, C.; GUO, Z.; CHEN, Y. A bi-end injection capillary electrophoresis method for simultaneous determination of 37 cations and anions in beers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 4113-4121, 2019.

GUO, J. et al. A strategy to modulate the electrophoretic behavior in plastic microchips using sodium polystyrene sulfonate. **J Chromatogr A**, p. 132-140, 16 Dec 2016.

GUPTA, G. D.; KURMI, B. D.; PATEL, P. Capillary electrophoresis: Recent advancements and applications of micellar electrokinetic capillary chromatography. **Pharmaspire**, v. 15, p. 16-21, March 2023.

HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, n. 2, p. 42-49, Feb 1994.

HE, H.; NIE, R.; DONG, N. Cucurbit[7]uril-mediated matrix solid phase dispersion extraction strategy combined capillary electrophoresis for detection of biogenic amines in foods. **Microchemical Journal**, v. 200, May 2024. ISSN 0026-265X.

HE, L. et al. Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in beer analysis. **J Chromatogr A**, p. 109-114, 27 Jan 2017. ISSN 1482.

HUBER, L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. **CRC Press**, New York, 2007.

ICH, H. T. G. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. 4. ed. [S.l.]: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005.

JABŁOŃSKA-RYŚ, E. et al. Determination of biogenic amines in processed and unprocessed mushrooms from the Polish market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, p. 103492, Sept 2020. ISSN 0889-1575.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CÁTIOS POR ELETROFORESE CAPILAR: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES. **Quimica Nova**, São Paulo - SP, v. 24, n. 1, p. 363–373, Maio 2001.

JAGUEY, H. Y. et al. Biogenic amines levels in food processing: Efforts for their control in foodstuffs. **Food Research International**, v. 144, June 2021. ISSN 0963-9969.

JAKABOVÁ, S. et al. DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN CULTIVATED AND PROCESSED MUSHROOMS INTENDED FOR THE SLOVAK MARKET. **JMicrobiol Biotech Food Science**, v. 13, n. 6, p. 1-6, Jun 2024.

JASTRZĘBSKA, A.; A, P.; SZYK, E. Simultaneous determination of selected biogenic amines in alcoholic beverage samples by isotachophoretic and chromatographic methods. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 31, n. 1, p. 83-92, 2014.

JOVER, T. H. et al. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2710-2715, 18 September 1996. ISSN 0021-8561.

KACZMARCZYK, N. et al. The critical evaluation of the effects of imidazolium-based ionic liquids on the separation efficiency of selected biogenic amines and their metabolites during MEKC analysis. **Journal of pure and applied analytical chemistry**, v. 238, p. 416, 1 Feb 2022. ISSN 122997.

KACZMARCZYK, N. et al. Investigation of Imidazolium-Based Ionic Liquids as Additives for the Separation of Urinary Biogenic Amines via Capillary Electrophoresis. **Separations**, 10, n. 2, 2023. 116.

KALAČ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 9-16, 1 March 2009. ISSN 0308-8146.

KALAYCIOGLU, Z. The affinity of histamine to serum albumin: Capillary electrophoresis-frontal analysis and in-silico molecular docking approaches. **Journal of separation science**, v. 46, n. 22, p. 1-9, 30 Aug 2023. ISSN 1615-9314.

KAO, Y. Y. et al. Analysis of amino acids and biogenic amines in breast cancer cells by capillary electrophoresis using polymer solutions containing sodium dodecyl sulfate. **J Chromatogr A**, v. 1217, n. 4, p. 582-587, 22 Jan 2010.

KATARÍNA, M. et al. Simultaneous determination of twelve biogenic amines in humanurine as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases bycapillary electrophoresis – tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 186, n. 1, 15 Julho 2020. ISSN 1.

KOSTAL, V.; KATZENMEYER, J.; ARRIAGA, E. A. Capillary electrophoresis in bioanalysis. *Anal Chem.* **Anal Chem**, v. 80, n. 12, p. 4533-4550, 15 Jun 2008.

KUBÁŇ, P.; KUBÁŇ, P. Novel developments in capillary electrophoresis miniaturization, sampling, detection and portability: an overview of the last decade. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 159, Febr 2023. ISSN 116941.

KVASNIČKA, F.; VOLDŘICH, M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 145-149, 2006. ISSN 0021-9673.

LADERO, V.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Isolation and identification of tyramine-producing enterococci from human fecal samples. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 215–218, Fev 2009.

LEITÃO, A. E. et al. Protein and amino acid adequacy and food consumption by processing level in vegans in Brazil. **AMA Network Open**, 7, n. 6, 2024. e2418226.

LI, Y. et al. Capillary Electrophoresis: A three-year literature review. **Analytical Chemistry**, v. 96, n. 20, p. 7799-7816, 10 April 2024.

LILI, H. et al. Separation of Key Biogenic Amines by Capillary Electrophoresis and Determination of Possible Indicators of Sport Fatigue in Athlete's Urine. **Journal of Chromatographic Science**, 54, 16 August 2016. 1428-1434. DOI. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw065>.

LINARES, D. R. A. et al. Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 413–422, 27 Oct 2010.

LIU, X.; YANG, L.-X.; LU, Y.-T. Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Wuhan, v. 998, p. 213–219, 18 March 2003.

MAHDINIA, E. et al. Microbial growth models. **Food safety engineering**, p. 357-398, 29 May 2020. ISSN 978-3-030-42660-6.

MANTOANELLI, J. O. F. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS UTILIZANDO A ELETROFORESE CAPILAR. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental). **Repositorio UFSCar**, Sorocaba, 21 Novembro 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/12039>>. Acesso em: 13 Set. 2024.

MANTOANELLI, J. O. F.; GONÇALVES, L. M.; PEREIRA, E. A. Dansyl Chloride as a Derivatizing Agent for the Analysis of Biogenic Amines by CZE-UV. **Chromatographia**, v. 83, p. 767-778, 22 April 2020.

MARÁKOVÁ, K. et al. Simultaneous determination of twelve biogenic amines in human urine as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases by capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, v. 186, 5 April 2020. ISSN 0731-7085.

MASSON, F.; TALON, R.; MONTEL, M. C. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, n. 1-2, p. 199-207, 4 September 1996.

MATUSKOVA, M. et al. Influence of Organic Solvents and β -cyclodextrins on Capillary Zone Electrophoresis Separation of Five Biogenic Amines and Two B Vitamins. **European Pharmaceutical Journal**, 06 Agosto 2022. 43 - 53.

MAYETT Y., M.-C. D. et al. Tendências de consumo de cogumelos comestíveis em países em desenvolvimento. **Journal of International Food & Agribusiness Marketing**, v. 18, n. 1-2, p. 151-176, 2006.

MENDONÇA DA COSTA BIRCHAL, R. A.; CUNHA MOURA, L. R.; VASCONCELOS, F. C. W. Perceived value by consumers in vegetarian food and its consequences: A study in Brazil. **Journal of Foodservice Business Research**, 28, n. 1, 2025. 114-144.

MIĘKUS, N. et al. Extraction and preconcentration of compounds from the l-tyrosine metabolic pathway prior to their micellar electrokinetic chromatography separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1620, p. 461032, 07 Jun 2020. ISSN 0021-9673.

MOHAMMED, G. I. et al. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 84-94, April 2016. ISSN 0165-9936.

MORENO-ARRIBAS, M. V. et al. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. International journal of food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 117-23, August 2003.

NAILA, A. et al. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. **J Food Sci**, v. 75, n. 7, p. 139-50, Sept 2010.

OMER, A. K. et al. Presence of Biogenic Amines in Food and Their Public Health Implications: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 4, p. 1539-1548, Sep 2021. ISSN 0362-028X.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007. ISSN 0308-8146.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606006972>>. Acesso em: 16 jan. 2025.

PAPAGEORGIU, M. et al. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 128-142, Jan 2018. ISSN 0165-9936.

PAWEL, M. N.; WOZNIAKIEWICZ, M.; KOSCIELNIAK, P. Flow variation as a factor determining repeatability of the internal standard-based qualitative and quantitative analyses by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1548, p. 92-99, 4 May 2018. ISSN 0021-9673.

PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. Determination of volatile corrosion inhibitors by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Sao Paulo, v. 1051, n. 1, p. 303-308, 8 Outubro 2004. ISSN 1-2.

QI, F. et al. MEKC-LIF for Sensitive Discrimination of Six Potential Risk Predictors for Auxiliary Diagnosis of Anesthesia Complications in Clinical Urine Fluids. **Chromatographia**, 21 Setembro 2016. 1665-1670.

REIS, G. C. L. **Aminas bioativas e atividade antioxidante em cogumelos**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 102. 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, G. D. M.; OKURA, M. H. Cogumelos comestíveis no Brasil: uma revisão bibliográfica. **Research Society and Developmen**, v. 11, n. 8, p. e24711830830, 2022. ISSN 2525-3409.

RONG, W.; ZHONGQI, X.; XUE, Y. Study the key biogenic amines in luncheon meat by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE**, Shangai, v. 45, p. 4107–4115, Novembro 2022. ISSN 22.

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A. M. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. **Foods**, v. 8, n. 2, p. 62, 8 Feb 2019.

RYŚ, E. J. et al. Content of Biogenic Amines and Physical Properties of Lacto-Fermented Button Mushrooms. **Appl. Sci**, v. 12, p. 8957, 3 Sept 2022.

SANTOS, M. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 213-231, 1996.

SEBESTYÉN, Z.; BUVÁRI-BARCZA, Á.; ROHONCZY, J. pH-dependent complex formation of amino acids with β -cyclodextrin and quaternary ammonium β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 73, 05 Agosto 2012. 199–210. DOI. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0043-2>.

SEYFINEJAD, B. et al. Ion-pair hollow fiber liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for the determination of biogenic amines in rat tissues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 219, n. 114909, 20 Sept 2022. ISSN 0731-7085.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research Internation**, v. 28, n. 7, p. 675-690, Out 1996.

SHIN, M. et al. Measurement of natural variation of neurotransmitter tissue content in red harvester ant brains among different colonies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p. 6167-6175, 2020.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, p. 21-25, 2011. ISSN 120949369.

SHULPEKOVA, Y. O. et al. Food intolerance: the role of histamine. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3207, 15 Sept 2021.

SILLA, S. M. Biogenic amines: their importance in foods. **Int J Food Microbiol**, v. 29, p. 213-231, April 1996.

SILVA, A. et al. Mercado consumidor de cogumelos na região sul do RS. **III CONGRESSO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**, Pelotas, 2017.

SILVA, C. M. G.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. **Food Chemistry**, 78, 12 Maio 2002. 241–248.

SILVA, V. L. D. M. et al. AMINAS BIOGÊNICAS COMO INDICADORES DE QUALIDADE DE SALAMES E PRODUTOS CÁRNEOS FERMENTADOS. **Enciclopédia Biosfera**, Goiania, v. 9, n. 16, p. 69-84, 2013. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/266395501>>. Acesso em: 5 jan. 2025.

SPANO, G. et al. Biogenic amines in fermented. **Eur J Clin Nutr**, v. 64, n. 3, p. 95-100, Nov 2010.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012. ISSN 1984-4433.

STEINER., M.-S. et al. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis using a chameleon type of fluorescent stain. **Microchimica Acta**, 167, 10 Novembro 2009. 259–266. DOI: <https://doi.org/10.1007/s006004-009-0247-y>.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **Int J Food Microbiol**, v. 88, n. 1, p. 41-54, 15 Nov 2003. ISSN 14527784.

SWINNEY, K.; BORNHOP, D. J. Detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, n. 7, p. 1239-1250, 20 April 2000.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, São Paulo - SP, v. 20, n. 5, p. 493–511, Out 1997.

TELEKEN, J. T.; ROBAZZA, W. D. S.; GOMES, G. D. A. Mathematical modeling of microbial growth in milk. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 891–896, Dec 2011.

TSENG, H.-M.; BARRETT, D. A. Micellar electrokinetic biofluid analysis of biogenic amines using on-line sample concentration and UV laser-induced native fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 15, p. 3387-3391, 10 April 2009. ISSN 0021-9673.

VASCONCELOS, H. et al. Detection of biogenic amines in several foods with different sample treatments: An overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 86-96, July 2021.

VIDAL-CAROU, C. M.; LATORRE-MORATALLA, L. M.; BOVER-CID, S. Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis. **Routledge**, v. 81, n. 1, p. 760, 12 November 2008. ISSN 9781420045314.

VOLPI, N. **Capillary Electrophoresis of Carbohydrates: From Monosaccharides to Complex Polysaccharides**. 1. ed. Totowa: Springer Science, v. 8, 2011. 1 - 277 p.

WANG, R.; XU, Z.; YANG, X. Study the key biogenic amines in luncheon meat by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **Journal of Separation Science**, v. 45, n. 22, p. 4107-4115, 09 Sept 2022. Disponível em: <<https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jssc.202200474>>. Acesso em: 5 jan. 2025.

WEINBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2. ed. [S.l.]: Journal of the American Chemical Society, 2000. ISBN 9780080539348.

WÓJCIK, W.; LUKASIEWICZ, M.; BONECA, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. **Journal of food and agriculture**, v. 101, n. 7, p. 2634-2640, May 2021.

WOŹNIAKIEWICZ, M. et al. CE-MS and GC-MS as BGreen[^] and Complementary Methods for the Analysis of Biogenic Amines in Wine. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2614-2627, 9 April 2018.

XIAO, M. W. et al. Rapid determination of gizzerosine in fish meals using microchip capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Anal Chem A**, v. 34, n. 5, p. 760-765, May 2017.

XUAN, X.; LI, D. Analytical study of Joule heating effects on electrokinetic transportation in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, n. 2, p. 227-237, Fev 2005. ISSN 0021-9673.

YU, Z. et al. The biogenic amine-producing bacteria from craft beer and their kinetic analysis between growth characteristics and biogenic amine formation in beer. **Journal of food science**, v. 86, n. 11, p. 4991-5003, 26 Out 2021.

ZHANG, H. et al. Application of reversed electroosmotic flow capillary electrophoresis in determination of chlorogenic acid in *Eucommia ulmoides* olive leaf and its cortex cell culture. **Analytical letters**, v. 30, n. 7, p. 1293-1304, 1997. ISSN 0003-2719.