

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS *CAMPUS* SOROCABA  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO  
AMBIENTAL

JÉSSICA OLIVEIRA FERNANDES MANTOANELLI

**DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS  
UTILIZANDO A ELETROFORESE CAPILAR**

Sorocaba  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS *CAMPUS* SOROCABA  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO  
AMBIENTAL

JÉSSICA OLIVEIRA FERNANDES MANTOANELLI

**DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS  
UTILIZANDO A ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Profa. Dra. Elisabete Alves Pereira

Sorocaba  
2019

**JÉSSICA OLIVEIRA FERNANDES MANTOANELLI**

**DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS  
UTILIZANDO A ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 26 de abril de 2019.

Orientador(a)

---

Dra. Elisabete Alves Pereira  
UFSCar campus Sorocaba

Examinador(a)

---

Dra. Luciana Camargo de Oliveira  
UFSCar campus Sorocaba

Examinador(a)

---

Dr. João Flávio da Silveira Petrucci  
UFU

*Dedico este trabalho ao meu filho, que esteve presente em minha mente e coração durante cada minuto dentro do laboratório.*

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me proteger e guiar.

Aos meus pais, a quem devo tudo o que conquistei e a pessoa que me tornei. Ao meu marido, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado. Ao meu filho, meu maior amor.

Aos meus familiares e amigos, em especial ao Tiago. Também aos outros grupos de pesquisa do laboratório Finep 1.

A todos os meus professores da UFSCar, principalmente a professora Elisabete, que me ensinou muito durante os últimos 6 anos.

Ao programa de pós graduação e à CAPES pela bolsa de mestrado.

## RESUMO

MANTOANELLI, Jéssica Oliveira Fernandes. Determinação de aminas biogênicas em amostras de alimentos utilizando a eletroforese capilar. 2019. 86 f. Defesa (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019.

Considerando questões de segurança alimentar, existem diversos indicadores da qualidade dos alimentos, como as aminas biogênicas (do inglês *biogenic amines*, BAs). As BAs são produzidas por todos os organismos vivos, possuem atividade biológica e podem estar presentes em diversos alimentos e bebidas. A legislação brasileira apenas estabelece limites máximos para a histamina no músculo de algumas espécies de peixes frescos. O desenvolvimento de metodologias de análise para a determinação das aminas biogênicas em alimentos é importante devido ao seu efeito toxicológico para os consumidores. O presente trabalho desenvolveu um novo método analítico para a separação e quantificação de BAs (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, triptamina e benzilamina como padrão interno) em alimentos utilizando a eletroforese capilar como técnica analítica. Cabe mencionar que a derivatização das aminas com cloreto de dansila (do inglês *dansyl chloride*, DNS-Cl) é amplamente empregada com outras técnicas de separação, entretanto, essa é a primeira vez que o DNS foi utilizado com eletroforese capilar. As principais vantagens foram a simplicidade do procedimento de derivatização (5 min em temperatura ambiente) e rapidez nas análises (menos de 11 min). Os adutos BA-DNS (com absorvância máxima em 214 nm) foram separados utilizando uma tensão de 18 kV e temperatura de 23 °C. Foi utilizado como eletrólito de corrida uma solução de ácido fosfórico 120 mmol L<sup>-1</sup> contendo 5 % v/v de acetonitrila pH 2,50 ajustado com trietilamina. As amostras foram injetadas utilizando o modo hidrodinâmico (25 mBar × 6 s). A curva analítica foi linear no intervalo de 1,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> para cada amina (R ≥ 0,997). A repetibilidade e a precisão intermediária variaram de 0,9 a 9,9 % e 5,5 e 14,9 %, respectivamente. O método apresentou valores satisfatórios de limite de detecção (42 - 417 µg L<sup>-1</sup>) e limite de quantificação (141 - 1.389 µg L<sup>-1</sup>) sem processo de pré-concentração; o limite de detecção variou de 7 a 45 µg L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação variou de 25 a 145 µg L<sup>-1</sup> com processo de pré-concentração. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso para uma avaliação qualitativa em um teste de degradação e para determinação quantitativa em amostras de iogurte e queijo fresco.

**Palavras-chave:** Aminas biogênicas. Alimentos. Eletroforese capilar.

## ABSTRACT

Food safety issues usually relate several quality indicators, such as biogenic amines (BAs). These BAs are produced by all living organisms, possess biological activity and may be present in a variety of foods and beverages. Brazilian legislation only established maximum levels for histamine in the muscle of some fresh fish species. The development of analytical methodologies for determination of biogenic amines in foods is relevant because of their toxicological effect for consumers. The present work developed a new analytical method for separation and quantification of BAs (putrescine, cadaverine, tyramine, histamine, tryptamine and benzylamine as internal standard) in foods, using capillary electrophoresis as analytical technique. Although derivatization of amines with dansyl chloride (DNS-Cl) has been widely used for other separation techniques, there are no reports in the literature on the use of DNS-Cl for capillary electrophoresis. The main advantages of the proposed method were the simplicity of the derivatization procedure (5 min at room temperature) and rapid analysis (less than 11 min). BA-DNS adducts (with maximum absorbance at 214 nm) were separated using a voltage of 18 kV and a temperature of 23 °C. A solution of phosphoric acid 120 mmol L<sup>-1</sup> containing 5% v/v of acetonitrile pH 2.50 adjusted with triethylamine was used as running electrolyte. Samples were injected using the hydrodynamic mode (25 mBar × 6 s). The analytical curve was linear over the range of 1.0 to 10.0 mg L<sup>-1</sup> for each amine ( $R \geq 0.997$ ). Repeatability and intermediate precision ranged from 0.9 to 9.9 % and 5.5 and 14.9 %, respectively. The method presented satisfactory values for limit of detection (42 - 417 µg L<sup>-1</sup>) and limit of quantification (141 - 1,389 µg L<sup>-1</sup>) without preconcentration process; limit of detection ranged for 7 to 45 µg L<sup>-1</sup> and limit of quantification ranged for 25 to 145 µg L<sup>-1</sup> with preconcentration process. The developed method was successfully applied for evaluating foods degradation and for quantitative determination in yoghurt and white cheese samples.

**Keywords:** Biogenic amines. Foods. Capillary electrophoresis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Caminhos metabólicos para a formação de algumas aminas biogênicas .....	17
<b>Figura 2.</b>	Número de artigos publicados nos últimos quarenta anos que abordam o tema aminas biogênicas em alimentos/bebidas .....	25
<b>Figura 3.</b>	Distribuição percentual do número de artigos publicados pelos 13 principais países nos últimos 5 e 40 anos que abordam o tema aminas biogênicas em alimentos/bebidas .....	26
<b>Figura 4.</b>	Número de artigos publicados nos últimos 20 anos utilizando diferentes técnicas de separação para a determinação de aminas biogênicas em alimentos/bebidas .....	28
<b>Figura 5.</b>	Representação simplificada do sistema de eletroforese capilar .....	29
<b>Figura 6.</b>	Princípio da separação: fluxo eletrosmótico .....	31
<b>Figura 7.</b>	Mecanismo de separação em MEKC .....	34
<b>Figura 8.</b>	Representação da reação entre aminas biogênicas e cloreto de dansila .....	48
<b>Figura 9.</b>	Efeito do procedimento de derivatização para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo MECK.....	49
<b>Figura 10.</b>	Sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo MEKC .....	51
<b>Figura 11.</b>	Efeito do pH do eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	52
<b>Figura 12.</b>	Sistemas de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	53
<b>Figura 13.</b>	Efeito da adição de modificadores no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	54
<b>Figura 14.</b>	Efeito da concentração de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> utilizada no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	55
<b>Figura 15.</b>	Sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	56
<b>Figura 16.</b>	Efeito dos tipos de injeção da amostra no sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	59
<b>Figura 17.</b>	Efeito da tensão aplicada no sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	61
<b>Figura 18.</b>	Efeito da concentração de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> utilizada no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	63
<b>Figura 19.</b>	Efeito da concentração de ACN utilizada no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	64

<b>Figura 20.</b> Efeito da temperatura no sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE .....	66
<b>Figura 21.</b> Sistema otimizado para a separação dos adutos BA–DNS utilizando o modo CZE .....	68
<b>Figura 22.</b> Teste de estabilidade: áreas dos picos dos adutos BA-DNS em função do tempo de reação de derivatização .....	68
<b>Figura 23.</b> Seletividade do método analítico .....	70
<b>Figura 24.</b> Avaliação qualitativa de amostras reais: teste de degradação em amostras de iogurte e queijo .....	75
<b>Figura 25.</b> Aplicação do método desenvolvido em amostras reais: iogurte e queijo .....	76

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Limites estabelecidos para a concentração de histamina em alimentos .....	22
<b>Quadro 2.</b>	Principais características e propriedades físico-químicas das aminas .....	24
<b>Quadro 3.</b>	Limites de detecção (LOD) para diferentes detectores utilizados em CE .....	35
<b>Quadro 4.</b>	Metodologias analíticas desenvolvidas para determinação de aminas biogênicas em alimentos/bebidas por eletroforese capilar .....	37
<b>Quadro 5.</b>	Padrões, reagentes e solventes utilizados .....	44
<b>Quadro 6.</b>	Eletrólitos avaliados para o desenvolvimento do método em MECK .....	50
<b>Quadro 7.</b>	Eletrólitos avaliados para o desenvolvimento do método em CZE .....	54
<b>Quadro 8.</b>	Soluções avaliadas para a reação de derivatização .....	57
<b>Quadro 9.</b>	Tensão e injeção avaliados para o desenvolvimento do método .....	58
<b>Quadro 10.</b>	Testes realizados para o desenvolvimento do método .....	62
<b>Quadro 11.</b>	Comparação de métodos de extração de aminas biogênicas .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Parâmetros estatísticos da curva analítica .....	71
<b>Tabela 2.</b>	Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método proposto .....	72
<b>Tabela 3.</b>	Limites de detecção e quantificação para métodos disponíveis na literatura .....	72
<b>Tabela 4.</b>	Precisão do método proposto expressa como coeficiente de variação.....	73
<b>Tabela 5.</b>	Recuperação do método proposto expressa em porcentagem .....	74
<b>Tabela 6.</b>	Aplicação do método proposto para amostras de produtos lácteos .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
°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> )
Ba(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de bário
BNZ	Benzilamina
C <sup>4</sup> D	Detecção condutométrica sem contato (do inglês <i>contactless conductivity detector</i> )
CAD	Cadaverina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAR	Carnosina
CE	Eletroforese capilar (do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i> )
cm	Centímetros
CV	Coefficiente de variação
CZE	Eletroforese Capilar em Zona (do inglês <i>Capillary Zone Electrophoresis</i> )
DA	Dopamina
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês <i>Diode Array Detection</i> )
DNS-Cl	Cloreto de dansila (do inglês <i>dansyl chloride</i> )
DP	Desvio padrão
E	Epinefrina
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (do inglês <i>European Food Safety Authority</i> )
EOF	Fluxo Eletrosmótico (do inglês <i>Electroosmotic Flow</i> )
ETL	Etilamina
ETN	Etanolamina
EtOH	Etanol
FBQCA	3-4-fluorbenzoil-2-quinolina carboxialdeído
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i> )

FSCE	Eletroforese capilar em solução livre (do inglês <i>free solution capillary electrophoresis</i> )
g	Gramas
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i> )
GIZ	Gizzerosina
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
H <sub>2</sub> O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HIS	Histamina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ICH	Conferência Internacional de Harmonização (do inglês <i>International Conference on Harmonisation</i> )
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ITP	Isotacoforese (do inglês <i>isotachophoresis</i> )
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
kg	Kilogramas
kV	Quilovolts
L	Litros
LIF	Fluorescência induzida por laser (do inglês <i>laser-induced fluorescence</i> )
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>limit of detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of quantification</i> )
m/v	Massa/volume
mAU	Miliunidade de absorbância
mBar	Milibar
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar (do inglês <i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i> )
MeOH	Metanol
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimols

MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
NaOH	Hidróxido de sódio
ND	Não detectado
NE	Norepinefrina
NH <sub>3</sub>	Amônia
nL	Nanolitros
nm	Nanômetros
NQS	1,2-naftoquinona-4-sulfonato
OA	Octopamina
OPA	O-ftalaldeído (do inglês <i>ortho-phthalaldehyde</i> )
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHE	Feniletilamina (do inglês <i>phenylethylamine</i> )
PI	Padrão interno
PUT	Putrescina
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
rpm	Rotações por minuto
RTIQ	Regulamento Técnico sobre a Identidade e Qualidade
s	Segundos
S/N	razão sinal-ruído (do inglês <i>signal-to-noise ratio</i> )
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
Si-O <sup>-</sup>	Grupos silanoatos
Si-OH	Grupos silanóis
SPD	Espermidina (do inglês <i>spermidine</i> )
SPM	Espermina (do inglês <i>spermine</i> )
TEA	Trietilamina
TBS	Tetraborato de Sódio
TRIS	$\alpha,\alpha,\alpha$ -tris(hidroximetil)aminometano
TRYP	Triptamina (do inglês <i>tryptamine</i> )
TYR	Tiramina (do inglês <i>tyramine</i> )
UV-vis	Ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 AMINAS BIOGÊNICAS .....	16
<b>1.1.1 Formação</b> .....	16
<b>1.1.2 Presença e controle em alimentos</b> .....	18
<b>1.1.3 Toxicidade</b> .....	20
<b>1.1.4 Legislação</b> .....	21
<b>1.1.5 Características das aminas utilizadas</b> .....	24
<b>1.1.6 Importância da determinação de aminas biogênicas em alimentos e bebidas</b> .	25
<b>1.1.7 Determinação de aminas biogênicas em alimentos e preparo de amostras</b> .....	26
1.2 ELETROFORESE CAPILAR .....	28
<b>1.2.1 Introdução da amostra</b> .....	30
<b>1.2.2 Princípio da Separação: Fluxo Eletrosmótico (EOF)</b> .....	30
<b>1.2.3 Principais modos de separação</b> .....	33
1.2.3.1 Eletroforese Capilar em Zona (CZE) .....	33
1.2.3.2 Cromatografia Eletrocínética Micelar (MECK) .....	33
<b>1.2.4 Detecção</b> .....	34
<b>1.2.5 Determinação de aminas biogênicas por eletroforese capilar</b> .....	35
1.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	39
<b>1.3.1 Seletividade</b> .....	39
<b>1.3.2 Linearidade e intervalo de análise</b> .....	39
<b>1.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação</b> .....	40
<b>1.3.4 Precisão</b> .....	40
<b>1.3.5 Exatidão</b> .....	41
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	42
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1 INSTRUMENTAÇÃO .....	43
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E SOLUÇÕES PADRÃO .....	43
<b>3.2.1 Procedimento de derivatização</b> .....	45
<b>3.2.2 Procedimento de pré-concentração</b> .....	45
3.3 CARACTERÍSTICAS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	45

3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	46
<b>3.4.1 Seletividade</b> .....	46
<b>3.4.2 Linearidade e intervalo de análise</b> .....	46
<b>3.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação</b> .....	46
<b>3.4.4 Precisão</b> .....	47
<b>3.4.5 Exatidão</b> .....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
4.1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS .....	47
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS E INSTRUMENTAIS .....	48
4.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS REAIS.....	69
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	70
<b>4.4.1 Seletividade</b> .....	70
<b>4.4.2 Linearidade e intervalo de análise</b> .....	71
<b>4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação</b> .....	71
<b>4.4.4 Precisão</b> .....	73
<b>4.4.5 Exatidão</b> .....	74
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO .....	75
<b>4.5.1 Teste de degradação em amostras reais</b> .....	75
<b>4.5.2 Determinação quantitativa em amostras reais</b> .....	76
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79

## 1 INTRODUÇÃO

A segurança alimentar tornou-se um tema de grande relevância nos mais diversos meios, por ser considerada uma questão de saúde pública. Além de possíveis perdas econômicas na indústria alimentícia, causadas pela deterioração e/ou contaminação de alimentos, há o risco da ocorrência de doenças e até mesmo de morte pelo seu consumo (GHASEMI-VARNAMKHAJASTI et al., 2018; SWINNEY; BORNHOP, 2000).

A deterioração de alimentos, causada pela ação microbiana, ocorre por condições favoráveis à atividade enzimática. Tal fato pode acarretar na geração de aminas biogênicas (do inglês *biogenic amines*, BAs), que são compostos nitrogenados de baixa massa molar que possuem atividade biológica (HALÁSZ et al., 1994; MOHAMMED et al., 2016). Elas auxiliam a regular diversos processos metabólicos quando presentes em baixas concentrações (RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014). Entretanto, quando a concentração das BAs presentes nos alimentos supera níveis críticos no organismo humano, podem se tornar tóxicas (GARCÍA-VILLAR; SAURINA; HERNÁNDEZ-CASSOU, 2006).

Considerando que as aminas biogênicas frequentemente estão presentes em diversos alimentos fermentados e com alto teor de proteína e que o excesso dessas substâncias pode ser um indicador da deterioração ou contaminação desses alimentos, o desenvolvimento de novos métodos analíticos e/ou a otimização de métodos já existentes é de grande importância, não só para avaliar os riscos toxicológicos para os consumidores, mas também para indicar a qualidade desses alimentos. (HALÁSZ et al., 1994; MOHAMMED et al., 2016; RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014; SANTOS, 1996)

As principais aminas biogênicas que podem estar presentes em produtos lácteos, peixes, carnes, produtos de soja e bebidas ou vegetais fermentados são a histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (MOHAMMED et al., 2016).

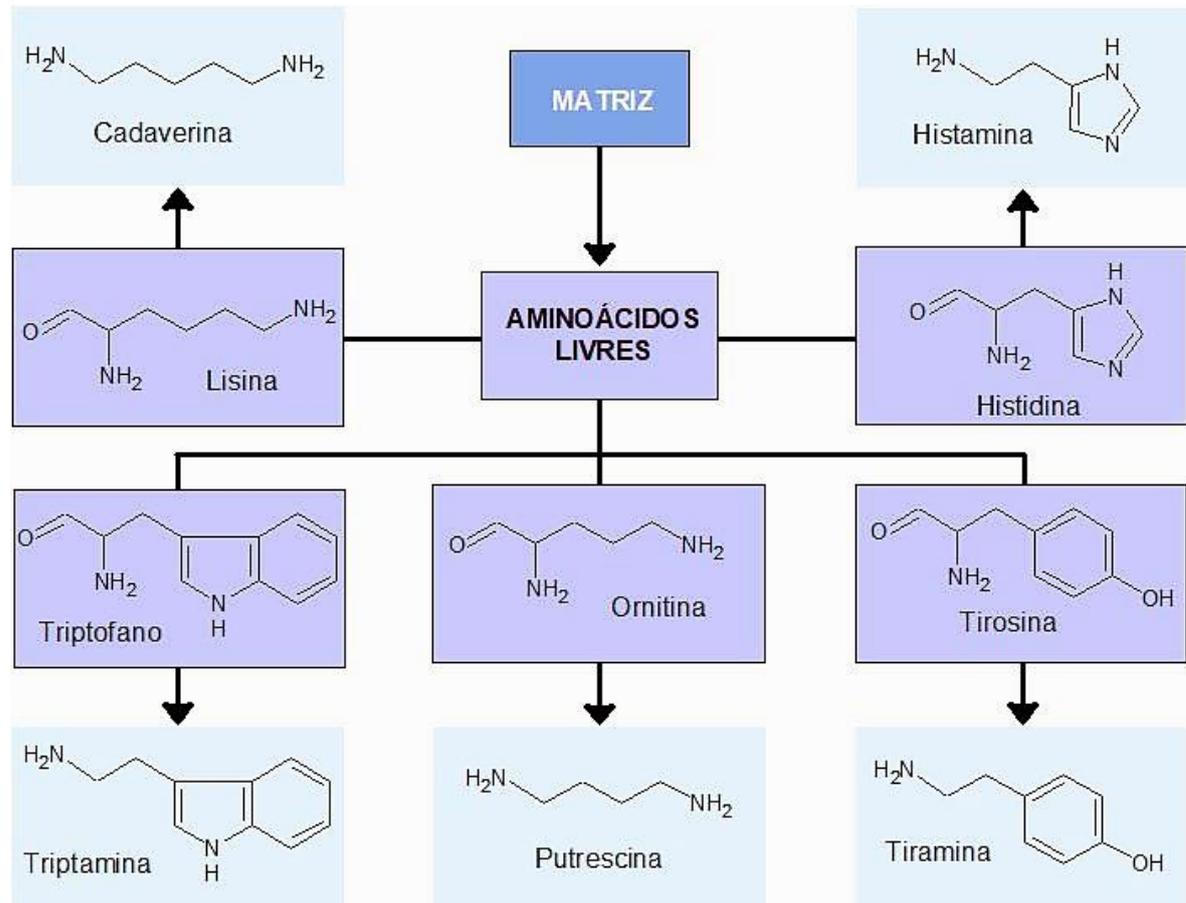
### 1.1 AMINAS BIOGÊNICAS

#### 1.1.1 Formação

As aminas biogênicas são bases orgânicas nitrogenadas de baixa massa molar, formadas por metabolismos animais, vegetais e microbianos, por meio da descarboxilação de seus respectivos aminoácidos livres (histidina é precursora da histamina, por exemplo, como mostra

a Figura 1) ou aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (DEL RIO et al., 2018; HALÁSZ et al., 1994; RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014; SANTOS, 1996).

**Figura 1.** Caminhos metabólicos para a formação de algumas amins biogênicas.



**Fonte:** elaborada pela autora, adaptado de (HALÁSZ et al., 1994).

A formação das amins biogênicas por descarboxilação enzimática pode ocorrer por dois processos, que incluem a ação térmica e, principalmente, a ação bacteriana, realizada por espécies de alguns gêneros muito conhecidos, como *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* (MOHAMMED et al., 2016; SANTOS, 1996). Cabe mencionar que, além da presença de aminoácidos livres, os microrganismos envolvidos no processo de formação das amins biogênicas necessitam de condições favoráveis ao seu crescimento e à atividade de descarboxilase (temperatura, pH, concentração de cloreto de sódio, entre outras) (SANTOS, 1996; UCAK et al., 2018).

As amins biogênicas possuem estruturas químicas que são divididas em: alifáticas (como a putrescina e a cadaverina, por exemplo), heterocíclicas (histamina, triptamina) ou aromáticas (tiramina, benzilamina) (RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014).

### **1.1.2 Presença e controle em alimentos**

A presença das amins biogênicas em alimentos têm a capacidade de alterar suas propriedades organolépticas. A putrescina confere aromas rançosos e de putrefação, enquanto que a cadaverina pode ser responsável por odores desagradáveis de carne e vinagre. Esses compostos podem estar presentes em todos os alimentos contendo aminoácidos livres, principalmente naqueles que possuem alto teor de proteína, de origem animal ou vegetal, uma vez que sejam expostos a condições que possibilitem sua formação (PAPAGEORGIU et al., 2018; SANTOS, 1996; SENTELLAS; NÚÑEZ; SAURINA, 2016; SILVA; GLÓRIA, 2002).

Considerando que o processo de fermentação ou deterioração dos alimentos, em função de ação microbiana, pode gerar as amins biogênicas, sua presença pode ser utilizada como indicador de qualidade e/ou contaminação (GALGANO et al., 2009; MOHAMMED et al., 2016; PAPAGEORGIU et al., 2018).

O perfil das amins formadas nos alimentos (tipos e quantidades presentes) está diretamente relacionado à tradição de consumo cada país, juntamente com o clima característico da região. Tal fato ocorre porque a formação de amins biogênicas depende da qualidade da matéria-prima, dos microrganismos que possam estar presentes na matriz, do processo de fabricação, das condições de armazenamento, parâmetros que são característicos de cada região (NAILA et al., 2010; PAPAGEORGIU et al., 2018).

Em alimentos como carnes, peixes e derivados, as principais amins biogênicas que podem estar presentes são histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (triptamina especificamente no caso de frutos do mar). É importante mencionar que carnes frescas e leite podem conter espermina e espermidina, que são poliaminas naturais (GALGANO et al., 2009; LINARES et al., 2012; MOHAMMED et al., 2016; PAPAGEORGIU et al., 2018).

Outra classe de alimento de destaque são os laticínios, que são constituintes da dieta amplamente consumidos e que podem acumular altos níveis de amins biogênicas, principalmente os queijos. Sua presença pode ser proveniente da produção ocasionada pelos microrganismos utilizados no processo de fermentação e/ou de contaminantes de origens diversas (LINARES et al., 2011; PAPAGEORGIU et al., 2018).

Produtos naturais como vegetais, frutas e seus derivados, também podem acumular aminas biogênicas devido ao processo de descarboxilação de aminoácidos associado às baixas quantidades de magnésio e cálcio e altas concentrações do íon amônio no solo (HALÁSZ et al., 1994; LINARES et al., 2011; PAPAGEORGIU et al., 2018).

Em bebidas como café e chás, a ocorrência de aminas biogênicas é proveniente das plantas que sintetizam essas substâncias por rotas bioquímicas (BRÜCKNER; FLASSIG; KIRSCHBAUM, 2012). Bebidas alcoólicas, como cerveja, vinho, entre outras, podem conter aminas devido ao processo de fermentação alcoólica. Em alimentos como chocolates e produtos derivados da soja também já foi reportada a presença de aminas biogênicas (PAPAGEORGIU et al., 2018; SANTOS, 1996).

Os processos utilizados no preparo dos alimentos também podem estar diretamente relacionados à formação das aminas biogênicas, como marinação, salga, amadurecimento, fermentação ou utilização de temperaturas inapropriadas (PAPAGEORGIU et al., 2018).

Embora as aminas biogênicas sejam estáveis e difíceis de degradar, a utilização de temperaturas adequadas costuma ser muito eficaz no controle de sua formação. A utilização de baixas temperaturas inibe o crescimento microbiano e reduz a atividade enzimática. O resfriamento já é capaz de estabilizar níveis elevados, que podem apenas aumentar ligeiramente em alguns casos, porém, o congelamento costuma ser ainda mais efetivo. Altas temperaturas também podem ser empregadas para destruir as bactérias, evitando assim a formação das aminas, ainda que não garantam a segurança do alimento, pois algumas aminas são estáveis ao calor e podem já estar presentes. Embora o alimento processado termicamente possa ter a vida útil prolongada, isso não impede que ele possa ser contaminado novamente, formando novas aminas, caso temperaturas inadequadas sejam empregadas no armazenamento (NAILA et al., 2010; PAPAGEORGIU et al., 2018).

Apesar de o tratamento térmico ser eficiente, ele não pode ser utilizado em laticínios, por exemplo, que além de possuírem processo de fabricação não estéril e muita facilidade de contaminação, não podem ser submetidos a medidas convencionais de eliminação das aminas biogênicas em função da sua microbiota natural (LINARES et al., 2012; PAPAGEORGIU et al., 2018).

Em algumas situações, medidas de refrigeração não são empregadas devido ao custo, como ocorre com pescadores artesãos. Há também bactérias capazes de formar aminas em temperaturas abaixo de 5 °C. Neste caso, é necessário o uso de técnicas alternativas, como por exemplo a aplicação de altas pressões hidrostáticas, que danificam as membranas celulares das bactérias. O uso de irradiação também pode ser utilizado para causar a radiólise das aminas ou

reduzir as bactérias que as produzem. Essa última técnica deve ser usada com cautela, pois pode alterar as características sensoriais do alimento e comprometer sua segurança. O empacotamento também é capaz de alterar a mistura gasosa que circunda o produto, reduzindo o nível de oxigênio presente. Tal medida já foi reportada como eficiente, já que aparentemente a maioria das bactérias produtoras das aminas biogênicas são aeróbicas, muito embora também existam bactérias anaeróbicas que possuem essa capacidade (NAILA et al., 2010).

Aditivos e conservantes são muito empregados para controlar o crescimento de bactérias nos alimentos e reduzir/inibir as atividades enzimáticas. Há inclusive especiarias, que são temperos aromáticos que possuem componentes muito específicos de ocorrência natural que podem se associar a determinadas enzimas. Mesmo com as vantagens desse método, há a necessidade de mais estudos, pois possíveis efeitos adversos não podem ser descartados (NAILA et al., 2010).

Uma técnica interessante é a modelagem matemática do crescimento microbiano, que pode prever as condições menos favoráveis à produção das aminas biogênicas e ao crescimento dos microrganismos responsáveis. Também há a possibilidade da adição de culturas de determinados microrganismos nos alimentos, normalmente utilizados para fermentação, que podem retardar a formação das aminas ou até mesmo as degradar, uma grande vantagem em relação às outras técnicas (NAILA et al., 2010).

### **1.1.3 Toxicidade**

É necessária a presença de baixas concentrações de aminas biogênicas no organismo dos seres humanos, uma vez que auxiliam a regular diversas funções fisiológicas, como temperatura corporal, pressão sanguínea, pH estomacal e atividade cerebral (MILHEIRO et al., 2019; RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014).

Quando pequenas quantidades das aminas biogênicas presentes nos alimentos são ingeridas, o trato intestinal humano tem a capacidade de metabolizar essas substâncias, por meio da atividade de algumas enzimas (as aminas oxidases), para estados fisiologicamente menos ativos (LINARES et al., 2011).

Apesar de o organismo ser capaz de metabolizar pequenas quantidades das aminas biogênicas, elas são classificadas como compostos tóxicos, pois são responsáveis por sintomas de intoxicação alimentar quando ingeridas em altas concentrações (LEE et al., 2018).

O grau de toxicidade das aminas biogênicas em um indivíduo varia em função da sensibilidade e da capacidade de desintoxicação do organismo, características que podem estar

relacionadas com as origens genéticas ou efeitos inibitórios das amino oxidases, resultantes do consumo de álcool ou medicamentos antidepressivos (LEE et al., 2018; LINARES et al., 2011; MILHEIRO et al., 2019). Caso as aminas estejam presentes em quantidades além da capacidade de desintoxicação do organismo, podem entrar na circulação sistêmica e promover a liberação de adrenalina e noradrenalina (hormônios neurotransmissores), provocando sintomas que incluem náusea, enxaqueca, taquicardia, sudorese, desconforto respiratório, aumento da pressão arterial e dos níveis de açúcar no sangue (LEE et al., 2018; LINARES et al., 2011).

De acordo com a literatura, a toxicidade da histamina pode ser potencializada pela presença de outras aminas no organismo. A histamina vem sendo a mais investigada e considerada mais problemática entre as aminas biogênicas. Doenças como a de Parkinson, esquizofrenia e depressão também foram apontadas como responsáveis por níveis mais elevados das aminas no organismo (LINARES et al., 2011; SENTELLAS; NÚÑEZ; SAURINA, 2016).

A toxicidade das aminas biogênicas não está relacionada somente à sua atuação direta no organismo. Uma característica importante dessas substâncias é que são precursoras para a formação de compostos denominados N-nitrosos, que estão relacionados à atividade mutagênica e carcinogênica. Os compostos N-nitrosos são formados pela interação entre aminas e óxidos de nitrogênio (NOx) ou nitritos. Cabe mencionar que o nitrito está muito presente na dieta, uma vez que é utilizado como conservante em diferentes tipos de alimentos, além de ser adicionado à carne crua para conferir a cor vermelha característica à carne curada e também em embutidos (COFFACCI et al., 2013; LEE et al., 2018; LINARES et al., 2011; PAPAGEORGIOU et al., 2018; SANTOS, 1996).

#### **1.1.4 Legislação**

Apesar de as aminas biogênicas auxiliarem no desempenho de várias funções no organismo humano, sua concentração em alimentos deve ser a menor possível. Porém, a falta de informação sobre as doses tóxicas dificulta para que a legislação estabeleça limites individuais ou de presença total. Como já mencionado anteriormente, essa limitação de informações está relacionada ao fato da toxicidade depender de vários parâmetros em relação ao próprio alimento (não somente da presença da amina, mas também da presença, tipo e quantidade de outros compostos existentes na matriz) e da forma como o organismo de cada indivíduo reage à presença das aminas (eficiência dos mecanismos de desintoxicação) (LINARES et al., 2011; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (do inglês *European Food Safety Authority*, EFSA), a histamina e a tiramina apresentam maior grau de toxicidade e, por essa razão, são consideradas mais relevantes. Para a presença de histamina, foram estabelecidos valores máximos de 100 mg kg<sup>-1</sup> em alimentos e 2 mg L<sup>-1</sup> em bebidas alcoólicas. Esses valores foram estabelecidos com base em dados obtidos em episódios de surtos de intoxicação alimentar (LINARES et al., 2011; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

O Quadro 1 apresenta os limites sugeridos com base em dados da literatura ou estabelecidos legalmente por órgãos governamentais ou agências regulamentadoras de alguns países. No Brasil, a instrução normativa estabelece um limite máximo, de 100 mg kg<sup>-1</sup>, apenas para histamina em tecido muscular de peixe fresco e salgado. Cabe mencionar que seria mais apropriado que o limite de amins biogênicas presentes em alimentos fosse estabelecido pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2019; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

**Quadro 1.** Limites estabelecidos para a concentração de histamina em alimentos.

Limite	Produto	Local
2 mg L <sup>-1</sup>	Vinho	Alemanha
3 mg L <sup>-1</sup>	Vinho	Holanda
6 mg L <sup>-1</sup>	Vinho	Bélgica
8 mg L <sup>-1</sup>	Vinho	França
10 mg L <sup>-1</sup>	Vinho	Suíça e Áustria
20 mg kg <sup>-1</sup>	Cerveja	Eslováquia
100 mg kg <sup>-1</sup>	Peixe salgado	Brasil
100 mg kg <sup>-1</sup>	Peixe fresco	América do Sul*
100 mg kg <sup>-1</sup>	Peixe fresco	Europa**
200 mg kg <sup>-1</sup>	Peixe salgado	Europa**
50 mg kg <sup>-1</sup>	Peixe fresco	Estados Unidos
100 mg kg <sup>-1</sup>	Peixe salgado	Estados Unidos
200 mg kg <sup>-1</sup>	Peixe e derivados	Eslováquia
100 a 200 mg kg <sup>-1</sup>	Carnes e derivados	Holanda e República Tcheca

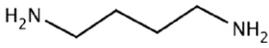
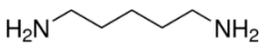
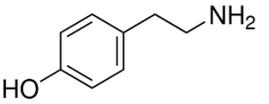
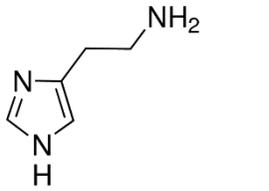
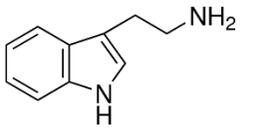
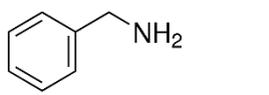
**Legenda:** \* países integrantes do MERCOSUL: Mercado Comum do Sul; \*\* diversos países integrantes da União Europeia. **Fonte:** elaborado pela autora, com dados de (MILHEIRO et al., 2019; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2019; PAPAGEORGIOU et al., 2018; RIVOIRA et al., 2017).

De forma geral, os limites estabelecidos para peixes referem-se a algumas espécies específicas, principalmente aquelas reconhecidamente suscetíveis à formação de histamina, como as espécies da família Scombridae (PAPAGEORGIOU et al., 2018).

Com relação à tiramina, existe uma recomendação geral de 100 a 800 mg kg<sup>-1</sup> de alimento. Alguns países utilizam uma legislação mais específica, como é o caso da Eslováquia, que estipulou 200 mg kg<sup>-1</sup> para amostras de queijo. Com relação às outras aminas biogênicas, não existem limites específicos estabelecidos na literatura (LINARES et al., 2011; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

### 1.1.5 Características das aminas utilizadas

**Quadro 2.** Principais características e propriedades físico-químicas das aminas.

Aminas	Abreviação	Sinônimo	Fórmula molecular	Estrutura química	Massa molar	PKa (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	Ponto de ebulição	Solubilidade em H <sub>2</sub> O
<b>Putrescina</b>	PUT	1,4-diaminobutano	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>		88,15	10,8	158 °C	Sim
<b>Cadaverina</b>	CAD	1,5-Diaminopentano	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>		102,18	10,25 9,13	179 °C	Sim
<b>Tiramina</b>	TYR	4-(2-etilamino)fenol	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO		137,18	10,52 9,74 (OH)	166 °C	Sim (parcialmente)
<b>Histamina</b>	HIS	2-(4-Imidazolil) etilamina	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>		111,15	9,68 5,88	209 °C	Sim
<b>Triptamina</b>	TRYP	2-(3-Indolil) etilamina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>		160,22	10,2	137 °C	Sim
<b>Benzilamina</b>	BNZ	Fenilmetilamina	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N		107,16	9,33	185 °C	Sim

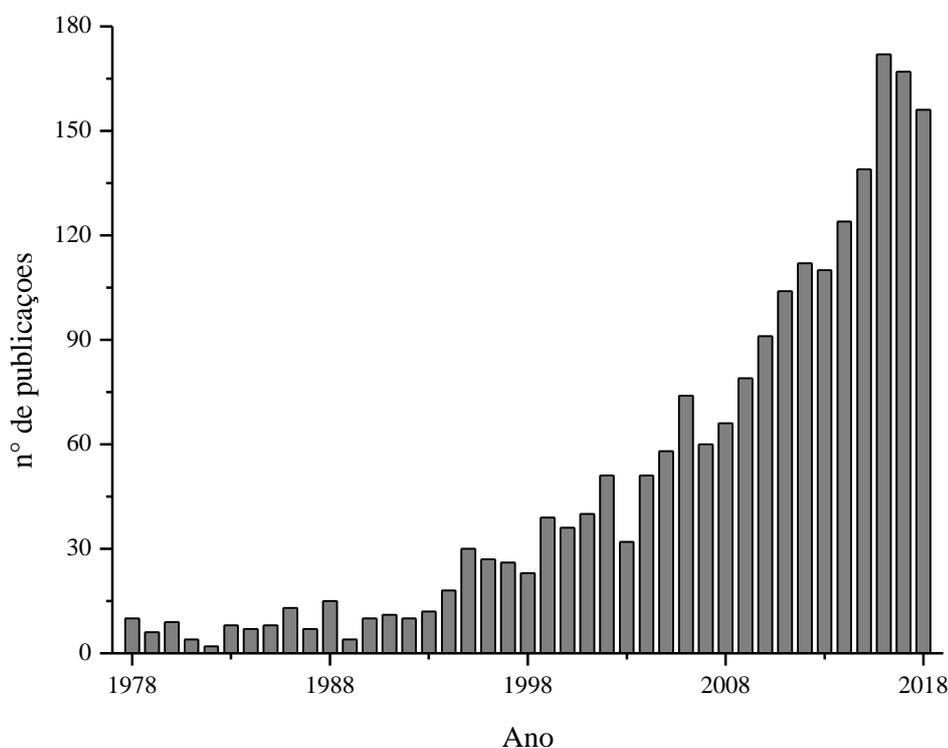
**Fonte:** elaborado pela autora, adaptado de (JAIN; VERMA, 2018; ÖNAL; TEKKELI; ÖNAL, 2013) contendo dados de (KIM et al., 2016).

### 1.1.6 Importância da determinação de amins biogênicas em alimentos e bebidas

A segurança alimentar é um tema que está sempre em evidência, uma vez que casos de doenças e até mesmo de morte relacionados a alimentos contaminados são relatados no mundo todo. Devido à grande disponibilidade e circulação de informações, as pessoas estão mais atentas aos eventos com consequências locais e, principalmente, internacionais. Esse fato faz com que a população exija qualidade e confiança nos alimentos, ainda mais considerando o aumento do consumo de alimentos prontos ou de preparo rápido, resultante do estilo de vida moderno. Nesse sentido, maior atenção vem sendo despertada por parte dos pesquisadores, contribuindo para o aumento de trabalhos científicos nessa área (ELLIS et al., 2012; GHASEMI-VARNAMKHASTI et al., 2018; PINU, 2016).

A Figura 2 mostra o número de trabalhos publicados nos últimos 40 anos, que apresentam como tema de estudo a presença de amins biogênicas em alimentos. Como pode ser observado na figura, as pesquisas apresentaram padrão crescente ao longo dos anos, evidenciando a relevância do tema desenvolvido no presente trabalho.

**Figura 2.** Número de artigos publicados nos últimos quarenta anos que abordam o tema amins biogênicas em alimentos/bebidas.

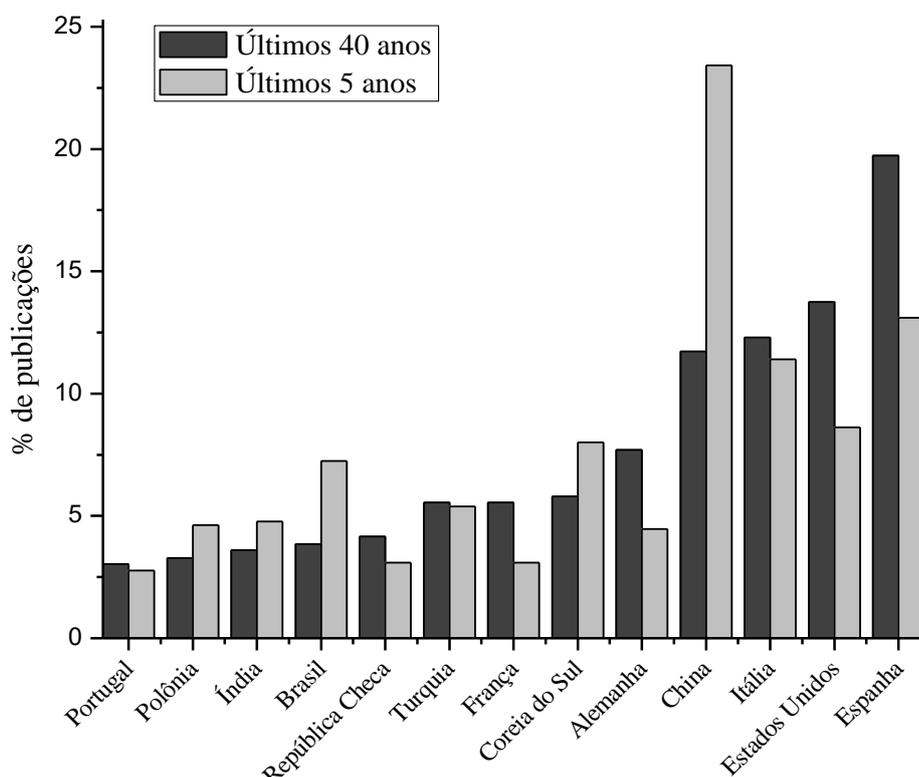


**Legenda:** acervo da base de dados *Scopus* utilizando "*biogenic amines*" AND "*foods*" como palavras-chave. **Fonte:** elaborada pela autora.

Com base na Figura 3, que mostra uma compilação dos países que publicaram trabalhos com o tema aminas biogênicas presentes em alimentos nos últimos 5 e 40 anos, foi possível observar um aumento significativo nos trabalhos publicados na China. O comportamento observado já era previsto, devido ao crescente investimento do país em ciência e tecnologia (TOLLEFSON, 2018).

Entre os países que mais publicaram artigos envolvendo o tema, é possível observar que o Brasil ocupava a décima posição, considerando o período de 40 anos, e passou a ocupar a sexta posição quando um período mais recente foi avaliado, mostrando que o tema tem se tornado importante nos últimos anos.

**Figura 3.** Distribuição percentual do número de artigos publicados pelos 13 principais países nos últimos 5 e 40 anos que abordam o tema aminas biogênicas em alimentos/bebidas.



**Legenda:** acervo da base de dados *Scopus* utilizando "*biogenic amines*" AND "*foods*" como palavras-chave. **Fonte:** elaborada pela autora.

### 1.1.7 Determinação de aminas biogênicas em alimentos e preparo de amostras

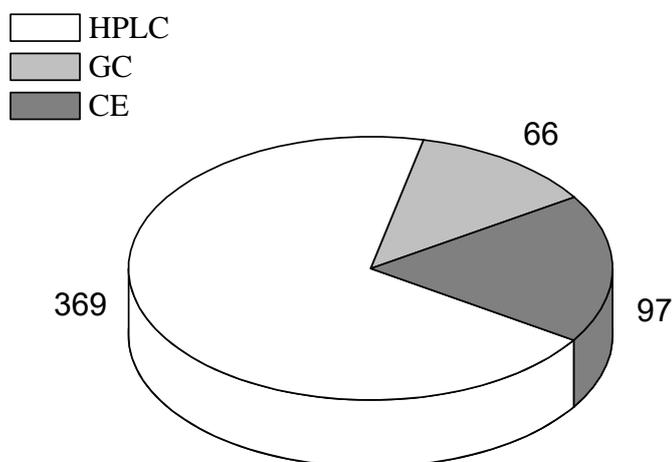
A análise de resíduos, contaminantes ou indicadores de qualidade em matrizes alimentares é desafiadora devido à complexidade da matriz. Também existem outros fatores que contribuem para aumentar o grau de dificuldade na determinação de aminas biogênicas em

bebidas e alimentos, que incluem: presença dos analitos em baixas concentrações na matriz, que faz com que a detecção seja extremamente sensível ao efeito de interferentes; as aminas biogênicas apresentam um forte caráter polar, o que faz com que sejam altamente solúveis em água, dificultando a utilização de solventes orgânicos frequentemente utilizados nas técnicas de separação; ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos nas estruturas das aminas alifáticas, dificultando a determinação desses compostos com equipamentos comerciais acoplados com detectores espectrofotométricos, que são os mais comuns disponíveis nos laboratórios de pesquisa (BEYER; BIZIUK, 2008; JAIN; VERMA, 2018; KAROVIČOVÁ; KOHAJDOVÁ, 2005; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

Devido à complexidade da matriz, um tratamento adequado das amostras é requerido para tornar a análise viável. Esse tratamento envolve diferentes etapas, que estão diretamente relacionadas com o desempenho do método, como procedimentos eficientes de extração e *clean up* da amostra e um sistema adequado de pré-concentração. A extração de aminas biogênicas em matrizes alimentares é geralmente feita utilizando uma solução ácida (os ácidos perclórico, tricloroacético e clorídrico são mais utilizados nessa etapa). Uma etapa de derivatização é necessária, pela ausência das características de absorção ou fluorescência da maioria das aminas biogênicas. Após a derivatização, utilizando um reagente apropriado, um sistema de pré-concentração pode ser necessário para posterior determinação das aminas de interesse (JAIN; VERMA, 2018; PAPAGEORGIOU et al., 2018).

A análise de uma amostra que contém um grupo de analitos de interesse requer uma técnica analítica de separação. A determinação de aminas biogênicas em alimentos e/ou bebidas pode ser feita por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), cromatografia gasosa (do inglês *Gas Chromatography*, GC), eletroforese capilar (do inglês *Capillary Electrophoresis*, CE). Como pode ser observado na Figura 4, que apresenta o número de publicações nos últimos 20 anos relacionando o tema aminas biogênicas presentes em alimentos e/ou bebidas com as técnicas analíticas, a técnica de HPLC tem se destacado para esse propósito, seguida pela CE e pela CG, que é mais frequentemente utilizada para análise de bebidas fermentadas (PAPAGEORGIOU et al., 2018).

**Figura 4.** Número de artigos publicados nos últimos 20 anos utilizando diferentes técnicas de separação para a determinação de aminas biogênicas em alimentos/bebidas.



**Legenda:** acervo da base de dados *Web of Science* utilizando "*biogenic amines*" AND "*foods*" AND a técnica analítica ("*HPLC*" ou "*Gas Chromatography*" ou "*Capillary Electrophoresis*") como palavras-chave. **Fonte:** elaborada pela autora.

Apesar de a CE apresentar menor sensibilidade quando comparada com a HPLC e a CG, apresenta outras vantagens, como simplicidade e rapidez, sendo uma técnica atrativa para a análise de um maior número de amostras em menor tempo. Além disso, a técnica é confiável, eficiente e utiliza volumes reduzidos de amostra, reagentes e solventes nas análises (KAROVIČOVÁ; KOHAJDOVÁ, 2005; PAPAGEORGIU et al., 2018).

## 1.2 ELETROFORESE CAPILAR

Eletroforese capilar é uma técnica instrumental de separação, baseada no fenômeno de transporte de espécies eletricamente carregadas, em meio líquido, sob influência de um campo elétrico. A separação ocorre no interior de tubos de dimensões capilares, com medidas variando entre 25 e 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 50 e 100 cm de comprimento, preenchidos com solução tampão (eletrólito de corrida) (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995; WEINBERGER, 2000).

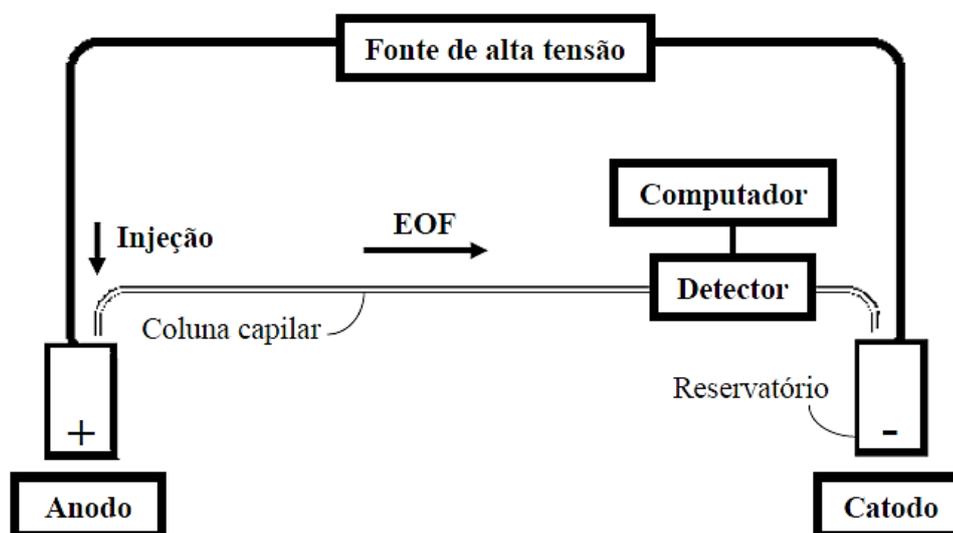
O pequeno diâmetro do capilar permite que altas tensões sejam utilizadas com dissipação eficiente do calor, que resulta em separações mais eficientes e tempo de análise reduzido (JORGENSEN; LUKACS, 1983).

O processo de separação e determinação pode ser feito utilizando aproximadamente 10 nL de amostra, com grande poder de resolução e eficiência analítica. Possui também alta capacidade de separação (número máximo de bandas separadas em determinado intervalo de tempo), o que a torna atrativa para separação de amostras complexas. A instrumentação é

bastante simples e não se faz necessário o uso de colunas específicas para cada tipo de amostra, resultando em vantagem econômica. Todas essas características demonstram grande versatilidade e aplicabilidade com relação a diferentes analitos e tipos de amostras (BAKER, 1995; JONES; JANDIK, 1991; WEINBERGER, 2000).

A Figura 5 apresenta um esquema simplificado do sistema de eletroforese capilar. A migração ocorre no interior da coluna capilar de sílica fundida, que mantém suas extremidades inseridas dentro de dois reservatórios (conhecidos como *vials*) contendo um eletrólito apropriado, normalmente uma solução tampão. A coluna é preenchida com a solução tampão contida em um dos reservatórios e os eletrodos de platina possibilitam o contato elétrico entre o capilar e a fonte de alta tensão. Após inserção da amostra, uma tensão elétrica é aplicada ao longo da coluna para possibilitar a separação. Há um sistema de detecção próximo ao reservatório de saída, que se comunica com um computador que possui *software* específico de aquisição e tratamento de dados. O controle térmico do sistema é realizado mantendo o capilar acondicionado num cartucho, por onde circula ar ou um líquido (TAVARES, 1996).

**Figura 5.** Representação simplificada do sistema de eletroforese capilar.



**Fonte:** elaborada pela autora, adaptado de (ALTRIA, 1996).

A baixa sensibilidade na detecção é uma desvantagem conhecida da técnica quando comparada a outras técnicas cromatográficas. A maneira mais empregada para superar essa limitação é utilizar um processo de derivatização, que converte os analitos em produtos com características mais favoráveis à detecção. Para isso, normalmente é realizada a incorporação de grupos cromóforos ou fluorescentes nos analitos. Esse processo pode oferecer uma relação massa/carga mais adequada, ajustar a reatividade e/ou volatilidade dos compostos e até mesmo

umentar a hidrofobicidade necessária no modo de análise utilizado para compostos neutros (BAÑOS; SILVA, 2011).

### 1.2.1 Introdução da amostra

Se as amostras não forem inseridas corretamente no capilar, os resultados podem ser interpretados inadequadamente. Isso porque a reprodutibilidade se relaciona diretamente com a precisão da técnica de injeção (TAVARES, 1996).

A extremidade do capilar do lado do eletrodo positivo (anodo) é inserida no *vial* de amostra, e uma força é exercida para injetar a solução para o interior do capilar. Os modos de injeção mais utilizados para esse fim são o hidrodinâmico e o eletrocinético (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995).

O modo de injeção hidrodinâmico pode ser realizado utilizando pressão, pressurizando o reservatório contendo a amostra ou aplicando vácuo no reservatório de destino; ou por sifonamento (também conhecida como injeção gravitacional), que levanta o reservatório imerso na solução contendo a amostra acima da altura do reservatório de destino, causando o sifonamento da amostra para o interior do capilar (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995).

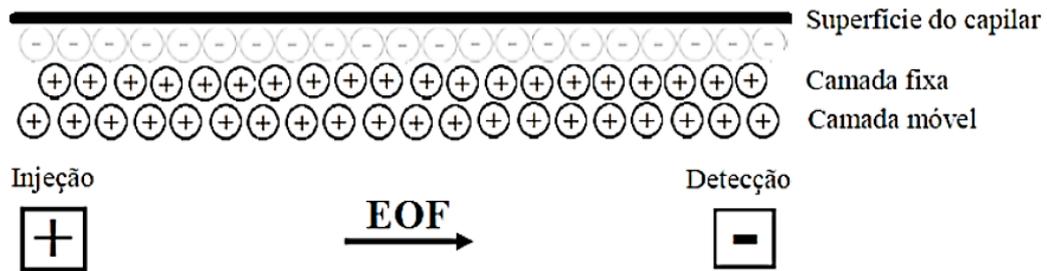
No modo de injeção eletrocinético, o reservatório contendo a amostra é submetido à ação de um campo elétrico por meio do eletrodo de alta tensão, que faz com que os componentes da amostra migrem para o interior do capilar (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995).

### 1.2.2 Princípio da Separação: Fluxo Eletrosmótico (EOF)

Um esquema simplificado do que ocorre no interior do capilar é apresentado na Figura 6. Os capilares de sílica possuem grupos silanóis em sua superfície (Si-OH). Em contato com soluções aquosas com pH superior a 2, sua superfície torna-se negativamente carregada devido à ionização desses grupos. Para isso, os capilares são inicialmente condicionados com solução de hidróxido de sódio (NaOH). Essas cargas negativas da superfície do capilar atraem as espécies carregadas positivamente contidas na solução tampão, dando origem a uma camada fixa de cátions. Esses cátions não são suficientes para neutralizar todas as cargas negativas da superfície do capilar, então forma-se uma segunda camada móvel de cátions, já que a distância dos grupos silanoatos (Si-O<sup>-</sup>) não permite que as espécies fiquem firmemente unidas, como ocorre na camada fixa. Essas duas camadas são chamadas de dupla camada difusa de cátions (BAKER, 1995).

Quando a tensão elétrica é aplicada, a camada móvel de cátions é deslocada em direção ao catodo (negativo). Esse processo faz com que a solução tampão acabe migrando como um todo, arrastando até mesmo os solutos neutros e moléculas de água presentes. Esse fenômeno é denominado fluxo eletrosmótico (do inglês *electroosmotic flow*, EOF) (BAKER, 1995).

**Figura 6.** Princípio da separação: fluxo eletrosmótico.



**Fonte:** elaborada pela autora, adaptado de (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995).

Entre as duas camadas de cátions formadas na superfície do capilar, há uma região conhecida como plano de cisalhamento, onde ocorre uma diferença de potencial causada por um desequilíbrio elétrico. Esse potencial é denominado *potencial zeta* e pode ser determinado de acordo com a Equação 1:

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \quad (1)$$

Sendo:

- $\zeta$  = potencial zeta;
- $\delta$  = espessura da dupla camada difusa;
- $e$  = carga por unidade de área de superfície;
- $\varepsilon$  = constante dielétrica do tampão.

A mobilidade do EOF (Equação 2) depende das características do tampão (viscosidade, constante dielétrica, concentração) enquanto a velocidade do EOF depende também do campo elétrico (Equação 3):

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad (2)$$

$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} E \quad (3)$$

Sendo:

- $\mu_{\text{EOF}}$  = mobilidade eletrosmótica;
- $v_{\text{EOF}}$  = velocidade eletrosmótica;
- $\varepsilon$  = constante dielétrica do tampão;
- $\zeta$  = potencial zeta;
- $\eta$  = viscosidade da solução;
- $E$  = campo elétrico em volts/cm.

O pH do eletrólito tem efeito significativo na magnitude do EOF. Em pH abaixo de 2, os grupos silanóis estão protonados em sua maioria e por isso não há fluxo. Quanto maior for o pH, maior será a magnitude do EOF e, em condições nas quais o valor do pH é superior a 7, a velocidade do EOF é frequentemente maior do que a velocidade de migração dos íons da amostra (BIO-RAD LABORATORIES, 2000).

O tempo de migração de um composto (mobilidade aparente, Equação 4) está relacionado à mobilidade do EOF e à mobilidade iônica ou eletroforética (que relaciona a razão carga/massa do soluto, Equação 5):

$$\mu_A = \mu_{\text{EOF}} + \mu_E \quad (4)$$

$$\mu_E = \frac{q\eta}{6\pi r} \quad (5)$$

Sendo:

- $\mu_A$  = mobilidade aparente;
- $\mu_{\text{EOF}}$  = mobilidade eletrosmótica;
- $\mu_E$  = mobilidade iônica ou eletroforética;
- $q$  = carga do íon;
- $\eta$  = viscosidade da solução;
- $r$  = raio do íon.

### 1.2.3 Principais modos de separação

#### 1.2.3.1 Eletroforese Capilar em Zona (CZE)

A eletroforese capilar em zona (do inglês *capillary zone electrophoresis*, CZE) também é conhecida como eletroforese capilar em solução livre (do inglês *free solution capillary electrophoresis*, FSCE). A possibilidade de separar quase todos os compostos ionizáveis (ânions e cátions) numa mesma corrida faz com que este seja o modo de separação mais utilizado. Também apresenta relativa facilidade para implementação e otimização das condições experimentais (BAKER, 1995; TAVARES, 1997).

Na CZE, o capilar é preenchido com o eletrólito de corrida, geralmente uma solução tamponada, e a amostra é introduzida utilizando o modo hidrodinâmico ou eletrocinético. Os solutos migram como zonas sob a ação do campo elétrico. A separação ocorre devido ao EOF em função da migração diferenciada de cada soluto (relação massa/carga) (Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System: User Manual, 2009; BAKER, 1995). As moléculas neutras são detectadas como se fossem um único composto, pois migram apenas sob influência do EOF. Os compostos com carga positiva migram em direção ao catodo (negativo), na mesma direção do EOF, o que faz com que apresentem menor tempo de migração. Os compostos carregados negativamente possuem velocidade eletroforética de menor magnitude que o EOF e, portanto, são carregados ao longo da coluna em direção ao detector. Mas, como migram na direção oposta, atraídos pelo anodo (positivo), possuem maiores tempos de migração. Dependendo da velocidade eletroforética, podem migrar para fora da coluna sem nunca passar pelo detector (BAKER, 1995; TAVARES, 1997).

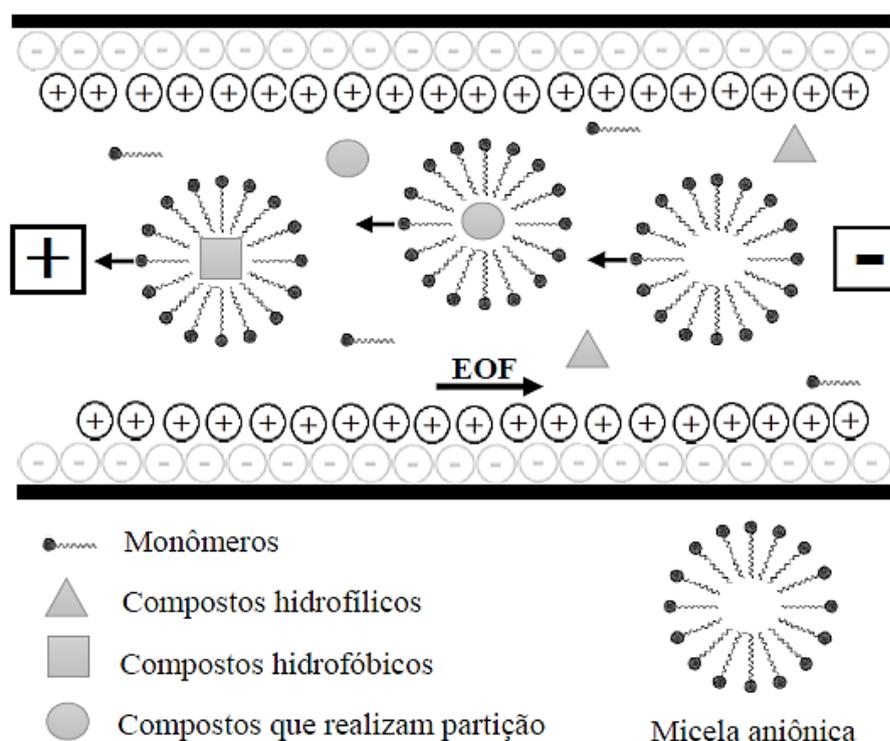
A redução, eliminação ou reversão do EOF é uma ferramenta muito importante nos diferentes modos da CE para obter uma boa eficiência de separação (BLANC; GUZMAN; SCHAUFELBERGER, 1997).

#### 1.2.3.2 Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

Como na CZE a separação ocorre somente para solutos iônicos ou ionizáveis, Terabe et al. desenvolveram a cromatografia eletrocinética micelar (do inglês *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC), que oferece uma alternativa para diferenciar compostos neutros presentes na amostra. Para isso, é realizada a adição de agentes tensoativos iônicos ou ionizáveis em condições apropriadas à formação de micelas no eletrólito de corrida (GORDON et al.,

1988; TERABE et al., 1984). As micelas são carregadas pelo EOF e migram sob a ação do campo elétrico. Os compostos hidrofílicos presentes na amostra e no eletrólito de corrida migram sob ação do EOF, sem interagir com as micelas, e por isso alcançam primeiro o detector. As moléculas muito hidrofóbicas permanecem retidas dentro das micelas e, portanto, possuem o mesmo tempo de migração das micelas. Já as moléculas parcialmente solúveis nas micelas particionam entre as duas fases: a aquosa (eletrólito de corrida) e a micelar (fase pseudo-estacionária). A partição diferenciada, que é proporcional ao tempo de retenção na micela, promove a separação desses solutos neutros (Figura 7) (BAKER, 1995; BLANC; GUZMAN; SCHAUFELBERGER, 1997; TAVARES, 1997).

**Figura 7.** Mecanismo de separação em MEKC.



**Fonte:** elaborada pela autora, adaptado de (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995).

#### 1.2.4 Detecção

Existem diversos detectores disponíveis para eletroforese capilar que, no geral, são os mesmos tipos utilizados em HPLC e que foram adaptados para a técnica, devido às dimensões reduzidas das colunas capilares. Esses detectores são divididos em duas classes: os universais, que avaliam as diferenças de propriedades entre o soluto e a solução (detector de condutividade, índice de refração, absorvância na região do UV-Vis pelo método indireto e laser induzido por

fluorescência pelo método indireto) e os específicos, que avaliam propriedades específicas do soluto (absorbância na região do UV-vis, fluorescência, espectrometria de massas, amperométrico e Raman). A escolha do detector é feita considerando o nível de sensibilidade necessário e as características do analito (Quadro 3). O detector mais utilizado é de absorção na região do UV-vis, pela sua relação custo/benefício, sendo que a maioria dos equipamentos comerciais de CE são equipados com esse detector (BAKER, 1995; SWINNEY; BORNHOP, 2000; TAVARES, 1996).

**Quadro 3.** Limites de detecção (LOD) para diferentes detectores utilizados em CE.

Detector		LOD (mol L <sup>-1</sup> )
Específico	UV-vis	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>
	Laser induzido por fluorescência (LIF)	< 10 <sup>-13</sup> *
	Amperiométrico	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup> **
	Raman	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-6</sup>
	Espectrometria de massa	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-9</sup>
Universal	Índice de refração	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>
	Condutividade	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>
	Laser induzido por fluorescência (LIF) pelo método indireto	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-7</sup>
	UV-vis pelo método indireto	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-5</sup>

**Legenda:** \* derivatização química é necessária; \*\* pré-concentração do analito é necessária.  
**Fonte:** elaborado pela autora, com dados de (SWINNEY; BORNHOP, 2000; TAVARES, 1996).

### 1.2.5 Determinação de aminas biogênicas por eletroforese capilar

Grande parte dos trabalhos descritos na literatura para determinação de aminas biogênicas não utilizam equipamentos com detecção de absorbância na região do UV-Vis. Esse fato ocorre porque, com exceção das aminas aromáticas, a maioria das aminas biogênicas não possui grupos cromóforos ou fluoróforos em suas estruturas (Quadro 2). Para a utilização de detectores de absorção na região do UV-Vis, é necessário que uma etapa de derivatização seja realizada antes da detecção. Diferentes agentes derivatizantes têm sido utilizados para a determinação das aminas biogênicas em alimentos: o-ftalaldeído (do inglês *ortho-phthalaldehyde*, OPA), cloreto de dansila (do inglês *dansyl chloride*, DNS-Cl), isotiocianato de fluoresceína (do inglês *fluorescein isothiocyanate*, FITC), 3-4-fluorbenzoil-2-quinolina carboxialdeído (FBQCA). As detecções indireta e eletroquímica também têm sido utilizadas (PAPAGEORGIU et al., 2018; RUIZ-JIMÉNEZ; LUQUE DE CASTRO, 2006). De acordo

com o levantamento bibliográfico feito, cabe mencionar que não foi encontrado nenhum trabalho que utiliza o reagente DNS com detecção na região do UV-Vis.

O quadro 4 apresenta informações sobre alguns métodos desenvolvidos nos últimos 10 anos para determinação das aminas biogênicas em alimentos utilizando a CE como técnica analítica:

**Quadro 4.** Metodologias analíticas desenvolvidas para determinação de aminas biogênicas em alimentos/bebidas por eletroforese capilar.

Modo	Detector	Derivatização	Aminas	Matriz	Eletrólito	Referência
Microchip - CE	Eletroquímico	Não	ETL, ETN, HIS, TRYP	Cerveja	Fosfato 20 mmol L <sup>-1</sup> pH 2,5	(DOSSI et al., 2011)
ITP e CZE	C <sup>4</sup> D e UV	Não	HIS, PHE, TYR	Vinho	Principal: potássio pH 6,0; Terminal: ácido ε-aminocaprónico pH 4,3; Ácido γ-aminobutírico pH 4,1	(GINTEROVÁ et al., 2012)
MECK	LIF	FITC	CAD, HIS, PHE, PUT, SPD, TRYP, TYR	Vinho, melão de romã	Brij 35 9 mmol L <sup>-1</sup> + borato 75 mmol L <sup>-1</sup> pH 9,6	(UZAŞCI; BAŞKAN; ERIM, 2012)
ITP	Conduutométrico	Não	CAD, HIS, PHE, PUT, SPD, SPM, TRYP, TYR	Cerveja, vinho	Principal: Ba(OH) <sub>2</sub> 5 mmol L <sup>-1</sup> + valina 15 mmol L <sup>-1</sup> + hidroxietilcelulose 1% pH 8,5; Terminal: TRIS 20 mol L <sup>-1</sup> + HCl 100 mmol L <sup>-1</sup> pH 8,3	(JASTRZEBSKA; PIASTA; SZŁYK, 2014)
CZE	MS/MS	Não	CAD, HIS, PHE, PUT, SPD, SPM, TRYP, TYR	Cerveja, vinho	Ácido acético 500 mmol L <sup>-1</sup> pH 2,5	(DANIEL et al., 2015)
Microchip - CE	LIF	FITC	CAD, HIS, PUT, TRYP	Peixe	Polistireno sulfonato de sódio 0,3% pH 11,5	(GUO et al., 2016)

	C <sup>4</sup> D	Não	CAD, HIS, PUT, SPD, TYR	Queijo, iogurte, Kefir	Ácido $\alpha$ -hidroxi-isobutírico 500 mmol L <sup>-1</sup> pH 2,05	(ADIMCILAR; ÖZTEKIN; ERIM, 2017)
CZE	UV	Não	5-HT, CAD, DA, E, HIS, NE, OA, PHE, PUT, SPD, TRYP, TYR	Cerveja	Imidazol 12 mmol L <sup>-1</sup> + $\alpha$ -ciclodextrina 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,5	(HE et al., 2017)
MEKC	UV	Não	HIS, PHE, TRYP, TYR	Vinho	Borato 20 mmol L <sup>-1</sup> pH 9,3 + dodecil sulfato de sódio 30 mmol L <sup>-1</sup> + metanol 5% (v/v)	(PŁOTKA- WASYLKAM; KŁODZIŃSKA; NAMIEŚNIK, 2017)
Microchip - CE	LIF	FITC	GIZ	Ração de peixe	Borato 50 mmol L <sup>-1</sup> pH 9,3	(XIAO et al., 2017)

**Legenda:** 5-HT: 5-hidroxitriptamina; C<sup>4</sup>D: detecção condutométrica sem contato (do inglês *contactless conductivity detector*); CAD: cadaverina; CAR: carnosina; CE: eletroforese capilar (do inglês *capillary electrophoresis*); CZE: eletroforese capilar em zona (do inglês *capillary zone electrophoresis*); DA: dopamina; E: epinefrina; ETL etilamina: ETN: etanolamina; FITC: isotiocianato de fluoresceína (do inglês *fluorescein isothiocyanate*); GIZ: gizzerosina; HIS: histamina; ITP: isotacoforese (do inglês *isotachophoresis*); LIF: fluorescência induzida por laser (do inglês *laser-induced fluorescence*); MECK: cromatografia eletrocínética micelar (do inglês *micellar electrokinetic chromatography*); MS/MS: espectrometria de massa em tandem; NE: norepinefrina; NQS: 1,2-naftoquinona-4-sulfonato; OA: octopamina; PHE: feniletilamina (do inglês *phenylethylamine*); PUT: putrescina; SPD: espermidina (do inglês *spermidine*); SPM: espermina (do inglês *spermine*); TRIS:  $\alpha,\alpha,\alpha$ -tris(hidroximetil)aminometano; TRYP: triptamina (do inglês *tryptamine*); TYR: tiramina (do inglês *tyramine*); UV: ultravioleta. **Fonte:** elaborado pela autora.

### 1.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para que um método analítico seja implementado, é imprescindível que os resultados sejam confiáveis e adequados. Deve haver garantia de que os valores obtidos representam os valores reais de uma amostra e que as características, limitações e fatores que influenciam as medidas sejam determinados. Para isso, são empregados protocolos de avaliação do método que assegurem a conformidade com regulamentações nacionais e internacionais em determinada área. Como os termos utilizados e a execução de cada item variam muito de acordo com cada diretriz, é necessário indicar qual convenção foi escolhida (CARDA-BROCH GUEST EDITOR; HADDAD EDITOR, 2014; RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2011). Os principais parâmetros de validação disponíveis no guia da Conferência Internacional de Harmonização (do inglês *International Conference on Harmonisation*, ICH) e nas guias das agências credenciadoras no Brasil, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (RIBANI et al., 2004), são:

#### 1.3.1 Seletividade

Os termos especificidade e seletividade têm sido utilizados por diferentes órgãos porém, por definição, seletividade é mais adequado e sugerido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2011; RIBANI et al., 2004).

O termo se refere à capacidade do método quantificar precisamente um analito na presença de interferentes, como impurezas, outros componentes da própria matriz, produtos de degradação. O método de adição padrão nas amostras selecionadas pode ser utilizado para esse fim quando comparado aos mesmos analitos adicionados à água (ICH, 2005; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

#### 1.3.2 Linearidade e intervalo de análise

O intervalo de análise depende da aplicação do método e deve conter os valores mínimo e máximo possíveis do analito de interesse obrigatoriamente com linearidade, precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005; RIBANI et al., 2004). Podem ser estabelecidos de acordo com informações da literatura.

Para quantificar uma substância desconhecida, deve ser estabelecida uma relação matemática entre os sinais (absorbância, área do pico etc.) e as concentrações correspondentes, que pode ser representada como uma equação de reta conhecida como curva analítica e descrita por  $y = ax + b$ . Para isso, são utilizados cinco níveis de concentração injetados três vezes cada em ordem crescente (RIBANI et al., 2004).

Deve haver uma relação linear no intervalo de análise, ou seja, uma capacidade de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações correspondentes. Inicialmente, deve-se avaliar visualmente a linearidade do gráfico e, com essa verificação, se aplica uma regressão linear para que parâmetros importantes sejam obtidos, como o coeficiente de correlação  $r$ , que indica a qualidade da curva (ICH, 2005; RIBANI et al., 2004).

### 1.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (do inglês *limit of detection*, LOD) expressa a menor quantidade de um analito presente em uma amostra passível de ser detectada, ou seja, distinguida do zero, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (do inglês *limit of quantification*, LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada por meio do procedimento experimental com valores adequados de precisão e exatidão. É um parâmetro utilizado para análises de substâncias presentes em baixas concentrações na matriz, como contaminantes em nível traço. O LOD e o LOQ podem ser calculados a partir da razão sinal-ruído (do inglês *signal-to-noise ratio*, S/N), um método visual que compara o branco da solução com os sinais dos analitos presentes em concentrações mínimas para apresentar uma relação de 3:1 e 10:1, respectivamente (ICH, 2005; RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### 1.3.4 Precisão

Expressa a proximidade do resultado obtido por uma série de análises realizadas, sempre sob condições estipuladas, ou seja, o grau de dispersão do procedimento. Pode ser analisada em relação à repetibilidade (ou repetitividade) e precisão intermediária. A repetibilidade representa a precisão de procedimentos realizados da mesma maneira em um curto intervalo de tempo, normalmente um dia. São utilizados três níveis de concentração (baixo, intermediário e alto), cada um deles analisados em triplicata. A precisão intermediária se relaciona com a precisão das análises realizadas sob diferentes condições, como dias, analista, equipamento utilizado.

Demonstra as variações que ocorrem nas condições da aplicação do método. O procedimento pode ser realizado em três dias consecutivos, no mesmo equipamento com o mesmo analista, utilizando três níveis de concentração analisados em triplicata ( $n = 9$ ). Os resultados da precisão devem ser expressos na forma de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) e foram calculados de acordo com as seguintes equações (ICH, 2005; RIBANI et al., 2004):

$$DP = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (6)$$

$$CV (\%) = \frac{DP}{x} \times 100 \quad (7)$$

Sendo:

- $x_i$  = valor individual das medições;
- $\bar{x}$  = média aritmética das medições;
- $n$  = número de medições.

### 1.3.5 Exatidão

Essa característica demonstra a conformidade entre o resultado obtido por meio da análise e o valor de referência assumido como real. Pode ser avaliada por meio de ensaios de recuperação, que fornecem uma porcentagem da quantidade de analito que é quantificado após adição na amostra. Normalmente são realizadas nove determinações, sendo triplicatas de três diferentes níveis de concentração (ICH, 2005; RIBANI et al., 2004). A recuperação é calculada com base na Equação 8:

$$Recuperação (\%) = \frac{A_{a+p} - A_a}{A_p} \times 100 \quad (8)$$

Sendo:

- $A_{a+p}$  = área do pico do analito na amostra contendo o padrão;
- $A_a$  = área do pico do analito na amostra;
- $A_p$  = área do pico do analito na solução padrão.

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista que não foram encontrados trabalhos na literatura que descrevam a separação e quantificação de amins biogênicas por eletroforese capilar utilizando o agente derivatizante cloreto de dansila (DNS), o objetivo geral desse trabalho foi desenvolver um novo método analítico para a determinação das amins biogênicas com processo de derivatização simples e curto tempo de análise, visando a aplicação em amostras reais de alimentos, utilizando a eletroforese capilar com detecção na região do UV-Vis.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o DNS como agente derivatizante para possibilitar a detecção das amins biogênicas na região do UV-Vis;
- Testar os diferentes modos de CE (CZE, MECK);
- Otimizar os parâmetros analíticos (composição e concentração do eletrólito de corrida, concentração do reagente, pH, temperatura e tempo de reação);
- Otimizar os parâmetros instrumentais (tensão aplicada, temperatura do sistema, tipo e tempo de injeção da amostra);
- Testar diferentes metodologias de extração para amostras reais;
- Avaliar o procedimento de pré-concentração (evaporação/redissolução e *salting-out*);
- Validar o método proposto segundo as recomendações do guia da Conferência Internacional de Harmonização, avaliando os parâmetros seletividade, linearidade e intervalo de análise, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação;
- Aplicar o método desenvolvido para avaliação qualitativa em testes de degradação e determinações quantitativas em produtos lácteos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram feitos utilizando o equipamento de eletroforese capilar modelo G7100A da *Agilent Technologies*, equipado com detector de arranjo de diodos (do inglês *Diode Array Detection*, DAD), que opera no intervalo de 190 – 600 nm, sistema de controle de temperatura do tipo *Peltier* e programa específico para aquisição e tratamento de dados.

Os capilares de sílica fundida são da *Polymicro Technologies, USA*, com dimensões de 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total, com janela de detecção de aproximadamente 0,3 cm, aberta a 40 cm do detector pela remoção do revestimento de poliimida do capilar por meio de aquecimento. As injeções foram feitas pelo modo hidrodinâmico.

No início de cada dia, os capilares foram condicionados pela lavagem com solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L<sup>-1</sup>, seguida pela lavagem com água ultrapura e, por último, com eletrólito de corrida, de 30 min cada uma delas. Entre cada corrida, o condicionamento era feito com eletrólito de corrida por 3 min.

#### 3.2 REAGENTES, SOLVENTES E SOLUÇÕES PADRÃO

Todos os padrões, reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico (Quadro 5). A água ultrapura foi obtida pelo sistema *Millipore Milli-Uni-Direct Q® 3UV* (18,2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>).

**Quadro 5.** Padrões, reagentes e solventes utilizados.

Reagentes e eletrólito	Fórmula molecular	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,07	-
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	84,01	Vetec
Carbonato de sódio	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99	Alphatec
Tetraborato de sódio	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	381,37	Dinâmica
Imidazol	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	68,08	Sigma-Aldrich
β-ciclodextrina (β-CD)	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	1134,98	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	137,99	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	268,07	Sigma-Aldrich
Cloreto de dansila	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>2</sub> S	269,75	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sódio	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	288,38	Sigma-Aldrich
<b>Aminas</b>			
Trietilamina (TEA)	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	101,1	-
Benzilamina (BNZ)	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N	107,15	Sigma-Aldrich
1,7 diaminoheptano	C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	130,23	Sigma-Aldrich
Putrescina* (PUT)	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ·2HCl	161,07	ChemCruz
Cadaverina* (CAD)	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> ·2HCl	175,10	Sigma-Aldrich
Tiramina** (TYR)	HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ·HCl	173,64	Alfa Aesar
Histamina* (HIS)	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> ·2HCl	184,07	Sigma-Aldrich
Triptamina** (TRYP)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> ·HCl	196,68	Sigma-Aldrich
<b>Ácidos e bases</b>			
Ácido clorídrico	HCl	36,46	Merck
Ácido fosfórico	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	97,99	Merck
Ácido tricloroacético	C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	163,39	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	Êxodo científica
<b>Solventes</b>			
Acetonitrila (ACN)	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	41,05	J. T Baker
Etanol (EtOH)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	Merck
Metanol (MeOH)	CH <sub>4</sub> O	32,04	Merck

**Legenda:** \* dicloridrato; \*\* cloridrato. **Fonte:** elaborado pela autora.

O eletrólito de corrida foi preparado diariamente pela diluição apropriada das soluções estoque. Para isso, foram preparadas soluções de tetraborato de sódio (TBS) e dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*, SDS) nas concentrações de 100 e 150 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, e de fosfato de sódio monobásico e ácido fosfórico com concentração de 200 mmol L<sup>-1</sup> cada uma delas. Todas essas soluções foram armazenadas por até três meses.

As soluções estoque de cada amina (benzilamina, putrescina, cadaverina, tiramina, histamina e triptamina) foram preparadas em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> e mantidas sob refrigeração em frascos âmbar por até 1 mês. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O reagente cloreto de dansila (DNS) foi preparado diariamente em ACN na concentração de 0,75 g L<sup>-1</sup>.

### 3.2.1 Procedimento de derivatização

As reações de derivatização das aminas foram feitas misturando 2 mL do padrão das aminas, 2 mL da solução de DNS e 0,8 mL de NaOH na concentração 6 mol L<sup>-1</sup>. As misturas foram mantidas sob abrigo da luz durante 5 min e a fase superior (fase orgânica) injetada no equipamento. As condições analíticas para a reação de derivatização foram otimizadas, como a concentração do reagente e o tempo de reação.

### 3.2.2 Procedimento de pré-concentração

As soluções padrão das aminas ou amostras reais foram derivatizadas e a fase orgânica foi tratada por evaporação (fluxo de nitrogênio e/ou banho-maria a 40 °C). O resíduo foi dissolvido em 250 µL de ACN para posteriormente ser analisado por CE. Esse procedimento (evaporação/redissolução) promoveu a pré-concentração da amostra em 8 vezes e foi desenvolvido para melhorar a sensibilidade do método.

## 3.3 CARACTERÍSTICAS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras avaliadas foram: queijo fresco, iogurte integral e bebidas lácteas com polpas de morango e coco.

A preparação foi realizada de acordo com a literatura (ADIMCILAR; ÖZTEKIN; ERIM, 2017). Uma massa de 2,5 g da amostra foi homogeneizada com 8 mL de solução aquosa

de ácido clorídrico  $1 \text{ mol L}^{-1}$  para extração das BAs e precipitação das proteínas presentes na matriz. A mistura foi mantida sob agitação utilizando agitador magnético durante 30 min e, após o período de agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 3000 rpm. O volume do sobrenadante foi completado para 10 mL com água. As amostras foram filtradas (*Minisart® RC25 Syringe Filter*  $0,45 \mu\text{m}$ ) e uma alíquota de 2 mL foi então utilizada para o processo de derivatização (descrito na seção 3.2.1) e posterior análise em CE.

### 3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

No presente trabalho, a validação segue as recomendações do guia da Conferência Internacional de Harmonização (RIBANI et al., 2004). Os parâmetros de validação avaliados foram:

#### 3.4.1 Seletividade

Para avaliação desse parâmetro, foram comparados os eletroferogramas do controle da amostra selecionada, da bebida láctea com polpa de morango fortificada com as aminas de interesse e da solução padrão contendo  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de cada amina, preparada em água.

#### 3.4.2 Linearidade e intervalo de análise

Para verificar a linearidade do método, foi feita uma curva analítica com cinco pontos, no intervalo de  $1,0$  a  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  para cada amina, com injeções em triplicata para cada nível de concentração. As áreas obtidas para cada análise realizada foram corrigidas utilizando o padrão interno (razão entre as áreas dos analitos pelas áreas do padrão interno).

#### 3.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os cálculos para os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram feitos com base na razão sinal-ruído (S/N) de 3 e 10, respectivamente. O parâmetro foi avaliado para o sistema de separação com e sem procedimento de pré-concentração.

### 3.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada para três níveis de concentração (2,5; 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>) para cada amina, com injeções em triplicata para cada nível de concentração. O procedimento foi realizado durante três dias consecutivos, utilizando o mesmo equipamento e as mesmas condições. Os dados obtidos em um dos dias representou o resultado da repetibilidade, enquanto o conjunto de dados obtidos nos três dias de análise foram apresentados como resultado da precisão intermediária. As áreas obtidas foram corrigidas utilizando o padrão interno. Os coeficientes de variação apresentados foram calculados utilizando as equações 6 e 7, apresentadas na Seção 1.3.4.

### 3.4.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada com ensaios de recuperação, utilizando três níveis de concentração (2,5; 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>) para cada amina, com injeções em triplicata para cada nível de concentração. As áreas foram corrigidas utilizando o padrão interno. O resultado foi calculado utilizando a equação 8, apresentada na Seção 1.3.5.

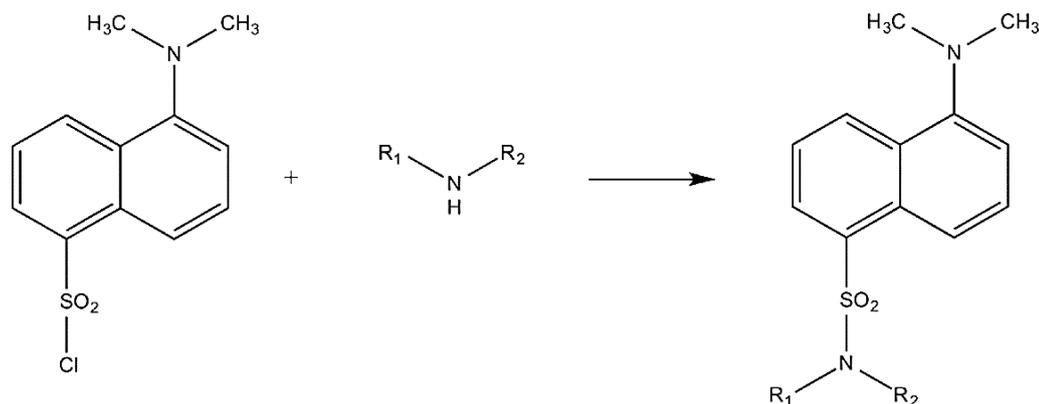
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

Como o equipamento de CE utilizado nesse trabalho possui um detector de absorção na região UV-Vis do espectro, foi necessário que um processo de derivatização fosse realizado, já que as BAs não absorvem nessa região (com exceção de algumas aminas aromáticas). O cloreto de dansila (DNS-Cl) é um dos agentes derivatizantes mais utilizados para esse fim (combinado a outras técnicas analíticas), uma vez que reage com aminas primárias e secundárias, formando derivados estáveis, fluorescentes e detectáveis na região UV (PAPAGEORGIU et al., 2018; RUIZ-JIMÉNEZ; LUQUE DE CASTRO, 2006).

A reação que ocorre entre as BAs e o reagente derivatizante melhora a seletividade e a sensibilidade do método analítico. A reação ocorre de acordo com a Figura 8 (RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014):

**Figura 8.** Representação da reação entre aminas biogênicas e cloreto de dansila.



**Fonte:** (RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014).

Para que a reação ocorra, as BAs devem estar desprotonadas, o que é possível quando o pH do meio se encontra básico (acima dos pKas das BAs, que são próximos de 10, na sua maioria). Por isso, a solução de NaOH é utilizada no procedimento de derivatização (LEAREY et al., 2018).

O DNS apresenta diversas vantagens, como já mencionado. Porém, as maiores desvantagens da utilização desse reagente são o tempo de reação, que geralmente demanda longos períodos (20 a 60 min) e o controle da temperatura (40 a 70 °C) (PAPAGEORGIU et al., 2018; SENTELLAS; NÚÑEZ; SAURINA, 2016). Cabe mencionar que a metodologia utilizada nesse estudo para o procedimento de derivatização foi baseada em trabalhos desenvolvidos em colaboração com o grupo de pesquisa da Universidade do Porto, Portugal (QuaQua), que utiliza uma metodologia de derivatização simples e rápida entre aminas e DNS aliada a outra técnica analítica (HPLC).

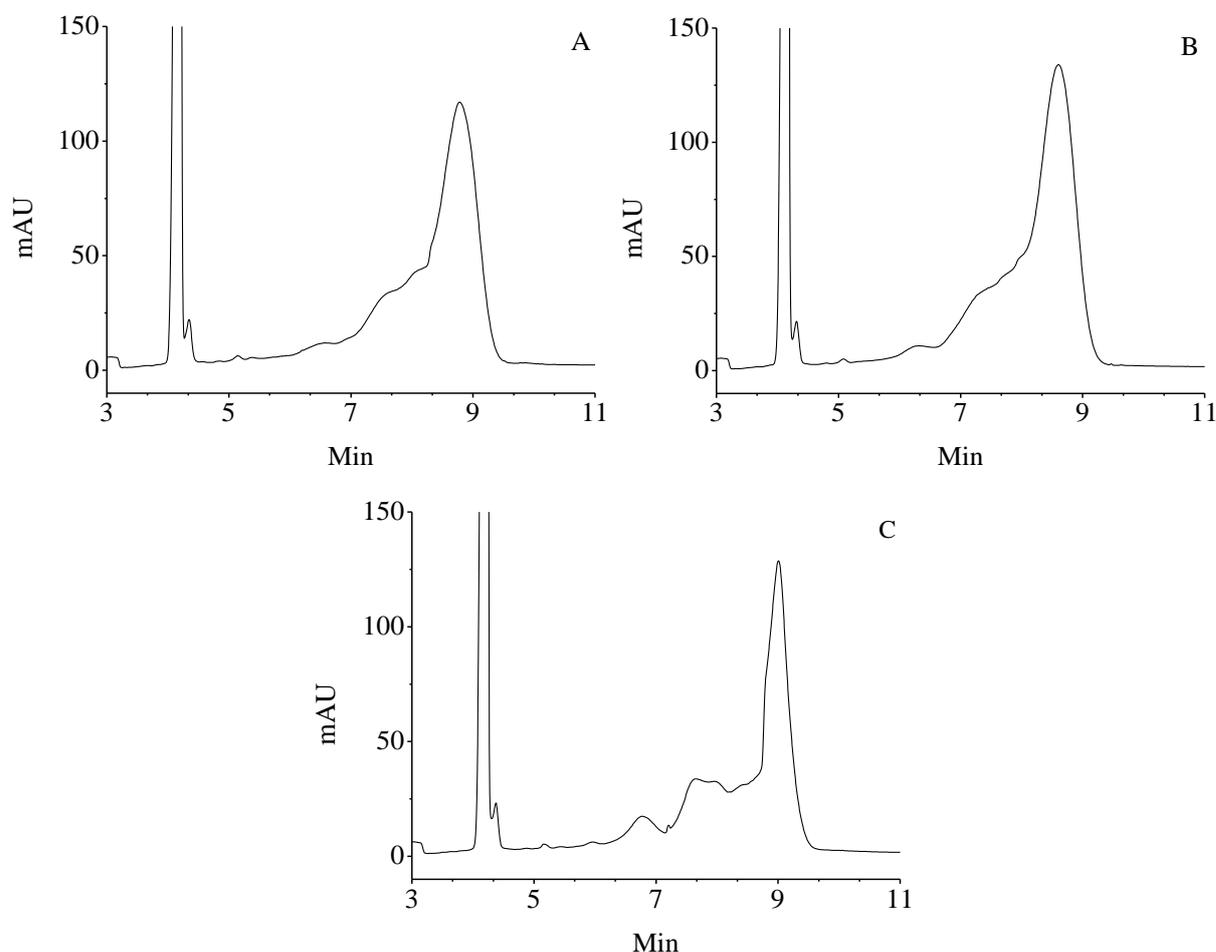
#### 4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS E INSTRUMENTAIS

O modo cromatografia eletrocínica micelar (MECK) foi selecionado para os testes iniciais e a reação de derivatização foi realizada com adaptações da literatura (RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014).

O primeiro teste teve como objetivo avaliar o comportamento do sistema em relação à reação de derivatização em três situações distintas (Figura 9): (A) em temperatura ambiente durante 5 min, (B) em banho de ultrassom durante 20 min e (C) em banho-maria a 60 °C durante 40 min. Nos experimentos (B) e (C) foi feita a adição de NaCl para que ocorresse o efeito de *salting-out*, que é utilizado para melhorar a separação entre as fases aquosa e orgânica e

umentar a recuperação no processo de extração (VALENTE et al., 2013). O eletrólito de corrida contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS foi inicialmente selecionado por ser uma composição padrão estabelecida na literatura como ponto inicial do processo de otimização da separação em MEKC (Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System: User Manual, 2009).

**Figura 9.** Efeito do procedimento de derivatização para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo MECK.



**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS ( $50 \text{ mg L}^{-1}$  de cada amina). A. reação durante 5 min a temperatura ambiente sem *salting-out*; B. reação durante 20 min a temperatura ambiente em ultrassom com *salting-out*; C. reação durante 40 min em banho-maria a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  com *salting-out*. Eletrólito de corrida:  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS contendo  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS; capilar:  $48,5 \text{ cm}$  total ( $40 \text{ cm}$  até o detector)  $\times 75 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno; tensão:  $20 \text{ kV}$ ; temperatura:  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; injeção:  $50 \text{ mBar} \times 3 \text{ s}$ ;  $\lambda = 214 \text{ nm}$ . **Fonte:** elaborada pela autora.

Os eletroferogramas permitem inferir que a derivatização ocorreu nos três diferentes procedimentos avaliados, entretanto, apresentaram o mesmo perfil de separação (coeluição

entre os picos). Por esse motivo, o procedimento mais simples, que ocorre em apenas 5 min a temperatura ambiente e sem adição de sal, foi selecionado para as próximas etapas.

Para o desenvolvimento de um método analítico, os principais parâmetros que influenciam a separação devem ser avaliados. Foram feitas algumas alterações no eletrólito de corrida, a fim de otimizar a separação, como mostra o Quadro 6:

**Quadro 6.** Eletrólitos avaliados para o desenvolvimento do método em MECK.

[SDS] (mmol L <sup>-1</sup> )	[TBS] (mmol L <sup>-1</sup> )	Aditivo
50, 60, 70, 80	30	-
80	40	-
50	30	ACN, MeOH, EtOH 10 %
50	30	β-CD 15 mmol L <sup>-1</sup>
50	30	β-CD 15 mmol L <sup>-1</sup> + MeOH 10 %

**Fonte:** elaborado pela autora.

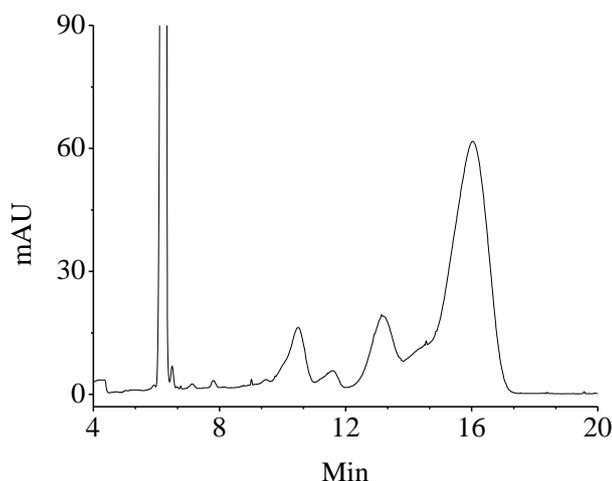
O aumento na concentração de SDS não proporcionou melhora na resolução entre os picos e dificultou as análises, pois contribuiu para a formação de bolhas no interior do capilar (o SDS é um tensoativo), que causam interrupção da corrente elétrica. Já o aumento na concentração de TBS proporcionou o início da separação dos picos coeluídos, porém, foi responsável por um aumento considerável da corrente elétrica, que produz o efeito Joule (aquecimento que ocorre no interior do capilar devido à passagem de corrente elétrica). Tal efeito é indesejável, uma vez que causa alargamento das bandas (devido aos gradientes de temperaturas que geram correntes de convecção no capilar), formação de bolhas no interior da coluna (devido ao aquecimento do eletrólito de corrida) e decomposição dos analitos, além de redução do tempo de vida da coluna capilar (BAKER, 1995). Desde que resultados satisfatórios não foram obtidos, as figuras não foram apresentadas.

A adição de solventes orgânicos frequentemente melhora a resolução entre os picos, pois reduz o fluxo eletrosmótico (EOF) e altera os fatores de retenção e seletividade. As concentrações não podem ser superiores a 20 %, pois acima desse valor, são responsáveis pela quebra da estrutura micelar (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995). O MeOH apresentou melhor desempenho entre os solventes utilizados (Figura 10). A ACN não proporcionou melhora na resolução dos picos, além de aumentar o tempo de análise, de 8 para 19 min, enquanto o EtOH causou um alargamento da banda dos picos e aumentou de forma expressiva o tempo de análise (total de 32 min), tornando a análise inviável (figuras não apresentadas).

Um fato importante a ser considerado é que solutos que apresentam alta hidrofobicidade não são devidamente separados, pois permanecem nas micelas (não realizam partição entre a fase aquosa e a micelar) e, portanto, eluem com o mesmo tempo de migração das micelas. As  $\beta$ -ciclodextrinas possuem estrutura com uma 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). Sua adição no eletrólito de corrida não proporcionou melhora expressiva no sistema de separação, além de causar aumento no tempo de migração dos analitos, aumentando o tempo total de análise (figura não apresentada).

O melhor sistema de separação obtido utilizando o modo MECK está apresentado na Figura 10.

**Figura 10.** Sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo MEKC.



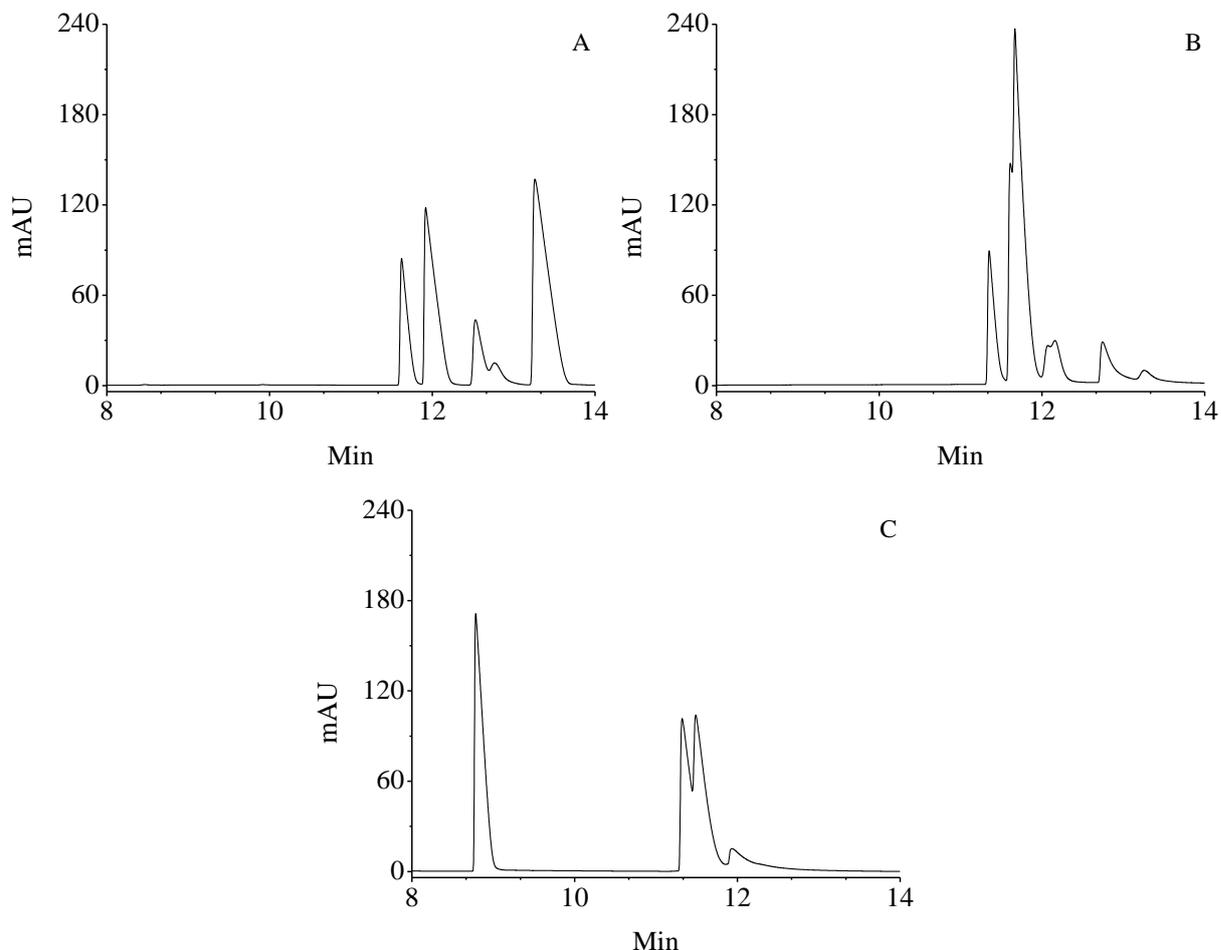
**Legenda:** Eletroferograma da mistura padrão dos adutos BA-DNS (50 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). Eletrólito de corrida: 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de TBS e 10 % v/v de MeOH; capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75  $\mu$ m de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura: 25 °C; injeção: 50 mBar × 3 s;  $\lambda$  = 214 nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

Como foi possível observar, o método não se mostrou satisfatório para a separação e determinação das BAs. Por esse motivo, o modo CZE foi testado, inicialmente, utilizando uma solução de fosfato de sódio 40 mmol L<sup>-1</sup> como eletrólito de corrida, que é estabelecido na literatura como ponto de partida para os testes iniciais de separação (ALTRIA, 1996).

Foram avaliados diferentes valores de pH para o eletrólito de corrida: 2,72; 3,83 e 5,15 (Figura 11). O pH do eletrólito de corrida influencia a seletividade, pois altera a ionização e, conseqüentemente, a mobilidade eletroforética dos solutos e o tempo de migração, pois altera o EOF. Quanto menor o valor do pH, mais grupos silanoatos estão protonados, o que pode

diminuir ou até mesmo eliminar o EOF. Os resultados mais promissores foram obtidos utilizando o eletrólito de corrida com valor de pH 2,72 (Figura 11 A).

**Figura 11.** Efeito do pH do eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.

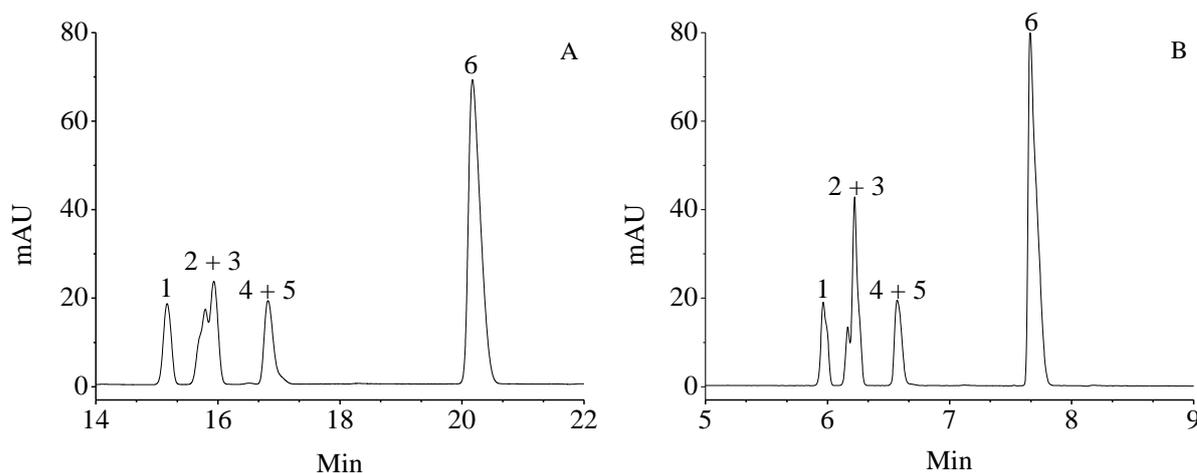


**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (100 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). Eletrólito de corrida: A. 40 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH 2,72; B. 40 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH 3,83 e C. 40 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH 5,15. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75 μm de diâmetro interno; tensão: 10 kV; temperatura: 25 °C; injeção: 50 mBar × 3 s; λ = 214 nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

Na Figura 11 A foi possível observar um alargamento dos picos com caudas (*tailing*), comportamento que pode estar relacionado à diferença de mobilidade entre o eletrólito de corrida e os analitos de interesse. De acordo com a literatura, quando a mobilidade do eletrólito de corrida aproxima-se da mobilidade do analito, o pico é simétrico e, se forem diferentes, causam picos distorcidos com cauda (*tailing*) ou cauda frontal (*fronting*) (TAVARES, 1997). Por esse motivo, um novo eletrólito de corrida, contendo uma mistura de ácido fosfórico e trietilamina (TEA), foi avaliado. Inicialmente, utilizou-se o eletrólito de ácido fosfórico

40 mmol L<sup>-1</sup> pH 2,50, ajustado com TEA mantendo a tensão de 10 kV e a temperatura de 25 °C (Figura 12 A). Em um segundo teste, a composição do eletrólito foi mantida, aumentando a tensão para 20 kV e a temperatura para 29 °C (Figura 12 B); os parâmetros instrumentais foram selecionados com base na literatura (PETRUCI; PEREIRA; CARDOSO, 2013).

**Figura 12.** Sistemas de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (25 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). A. tensão: 10 kV; temperatura: 25 °C; B. tensão: 20 kV; temperatura: 29 °C. Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina; #. picos não identificados. Eletrólito de corrida: 40 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,50 ajustado com TEA. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75 μm de diâmetro interno; injeção: 50 mBar × 3 s; λ = 214 nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

A utilização do eletrólito contendo H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e TEA proporcionou picos mais simétricos e melhor eficiência de separação com a tensão de 20 kV e temperatura do capilar mantida em 29 °C. Além disso, o tempo de análise foi menor quando comparado ao eletrólito contendo apenas o tampão fosfato. Com o objetivo de melhorar a resolução entre os picos, diferentes parâmetros analíticos e instrumentais foram avaliados.

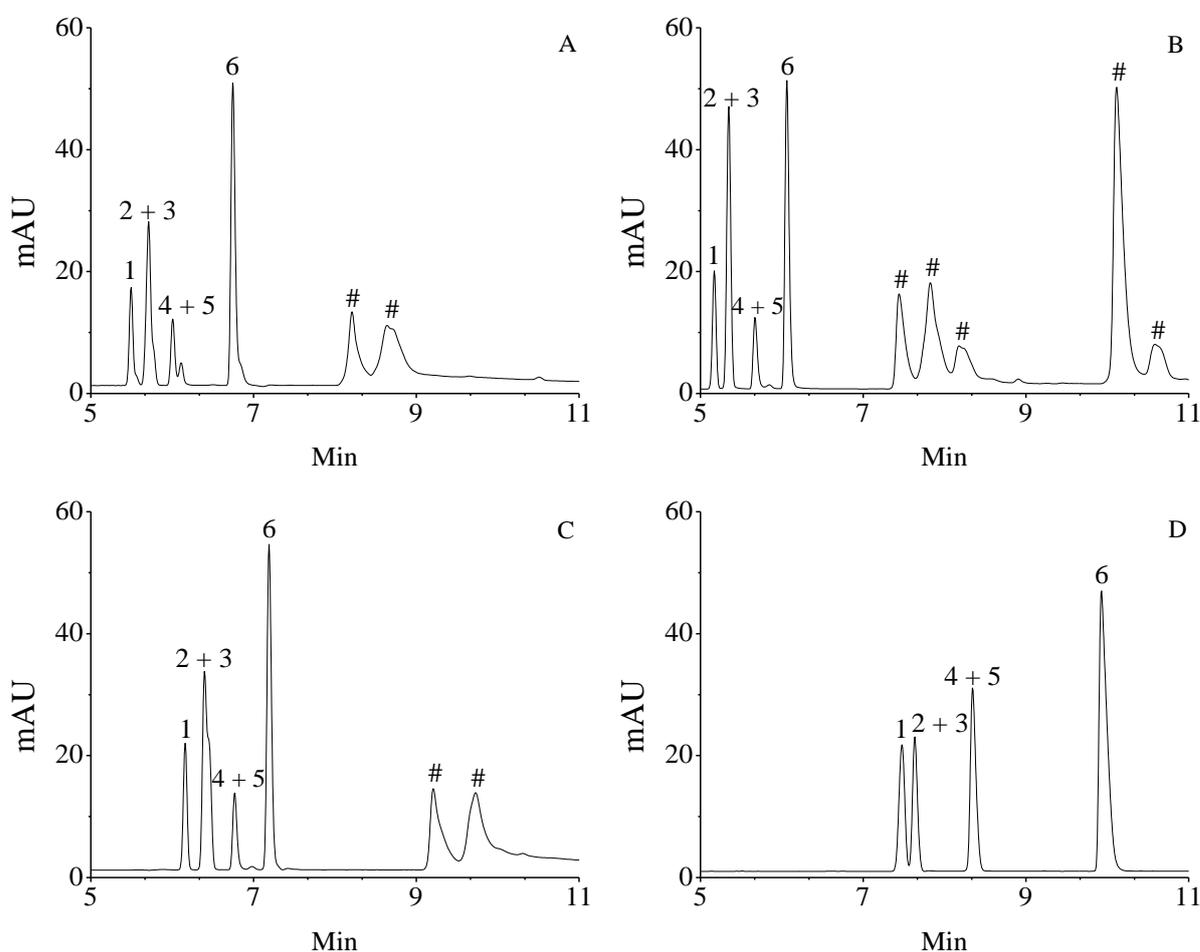
O pH do eletrólito de corrida foi avaliado com os valores de 2,00; 2,50; 3,50 e 4,50. Os testes iniciais já tinham evidenciado que valores de pH acima de 3,00 não apresentam resultados satisfatórios com relação ao sistema de separação e magnitude do sinal analítico, o que foi novamente confirmado com essa sequência de testes (figuras não apresentadas). O eletrólito de corrida com valor de pH 2,00 proporcionou coeluição entre os picos, provavelmente devido à redução drástica/eliminação do EOF e, por isso, o pH 2,50 foi mantido para as próximas etapas. As outras modificações realizadas no eletrólito de corrida estão apresentadas no Quadro 7:

**Quadro 7.** Eletrólitos avaliados para o desenvolvimento do método em CZE.

[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (mmol L <sup>-1</sup> )	Aditivo
40	MeOH e ACN 10 %
40	β-CD 15 mmol L <sup>-1</sup>
20 – 80*	-
60	ACN 5 – 15 %**

**Legenda:** \* intervalos de 10 mmol L<sup>-1</sup>; \*\* intervalos de 5 %. **Fonte:** elaborado pela autora.

A Figura 13 apresenta o efeito da adição dos modificadores no eletrólito de corrida:

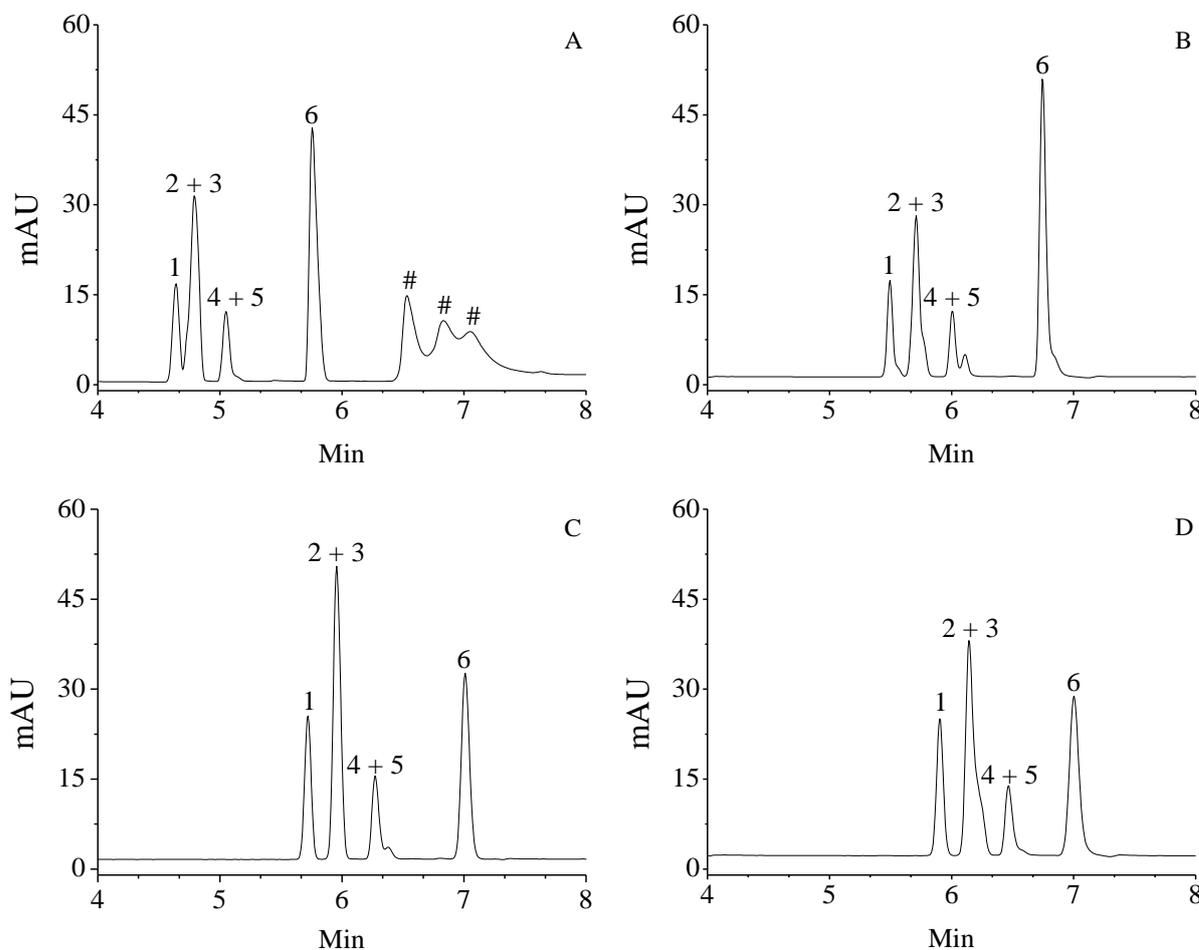
**Figura 13.** Efeito da adição de modificadores no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.

**Legenda:** Electroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (25 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). Eletrólito de corrida: A. 40 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,50 ajustado com TEA; B. 40 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 10 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA; C. 40 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 10 % v/v MeOH pH 2,50 ajustado com TEA; D. 40 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 15 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD pH 2,50 ajustado com TEA. Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina; #. picos não identificados. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75 μm de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura: 29 °C; injeção: 50 mBar × 3 s; λ = 214 nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

Cabe mencionar que os picos não identificados, que foram observados após o procedimento de derivatização das aminas, não estavam presentes no eletroferograma do branco da solução (eletroferograma não apresentado), o que sugere que esses picos podem ser contaminantes ou espécies secundárias formadas durante a reação de derivatização.

Com base na Figura 13, foi possível observar que a ACN e o MeOH apresentaram melhor desempenho (Figura 13 B e C), pois melhoraram a separação e a magnitude do sinal analítico. Porém, com o uso da ACN, o tempo de análise foi reduzido e os picos ficaram com formatos mais simétricos. Em paralelo à avaliação do desempenho dos aditivos, foi estudado o efeito da concentração de  $H_3PO_4$  utilizada no eletrólito de corrida (Figura 14):

**Figura 14.** Efeito da concentração de  $H_3PO_4$  utilizada no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.

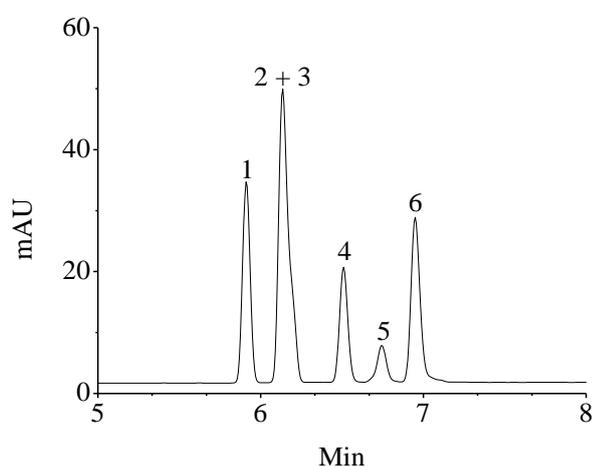


**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (25 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). Eletrólito de corrida: A. 20 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_3PO_4$  pH 2,50 ajustado com TEA; B. 40 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_3PO_4$  pH 2,50 ajustado com TEA; C. 60 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_3PO_4$  pH 2,50 ajustado com TEA; D. 80 mmol L<sup>-1</sup> de  $H_3PO_4$  pH 2,50 ajustado com TEA. Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina; #. picos não identificados. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector)  $\times$  75  $\mu$ m de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura: 29 °C; injeção: 50 mBar  $\times$  3 s;  $\lambda$  = 214 nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

Foi observada uma melhora no perfil de separação e na magnitude do sinal analítico em função do aumento da concentração do  $\text{H}_3\text{PO}_4$  até a concentração de  $60 \text{ mmol L}^{-1}$ , sendo que acima desse valor de concentração ocorreu uma diminuição do sinal analítico e distorção no formato do segundo pico do eletroferograma (Figura 14 D). Por esse motivo, a concentração de  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  foi selecionada para as próximas etapas.

Como a adição de ACN ao eletrólito de corrida proporcionou resultados promissores, a próxima etapa teve como objetivo avaliar o efeito da concentração de ACN no sistema de separação. A concentração intermediária, de 10 % v/v, proporcionou o melhor perfil de separação. A Figura 15 apresenta as melhores condições analíticas e instrumentais de separação.

**Figura 15.** Sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



**Legenda:** Eletroferograma da mistura padrão dos adutos BA-DNS ( $25 \text{ mg L}^{-1}$  de cada amina). Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina. Eletrólito de corrida:  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 10 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA; capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura:  $29 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção: 50 mBar  $\times$  3 s;  $\lambda = 214 \text{ nm}$ . **Fonte:** elaborada pela autora.

Com as condições preliminares de separação pré-determinadas, a próxima etapa consistiu em testar algumas reações de derivatização adaptadas da literatura. Esse estudo foi feito uma vez que a literatura enfatiza que a reação de derivatização entre as aminas e o DNS só ocorre em longos tempos de reação e com aquecimento. O objetivo foi avaliar se outros procedimentos de derivatização poderiam proporcionar melhora no sinal analítico e, conseqüentemente, um método mais sensível. O Quadro 8 apresenta as diferentes soluções que foram adicionadas à mistura contendo DNS/BAs no procedimento de derivatização.

**Quadro 8.** Soluções avaliadas para a reação de derivatização.

Solução	pH	Concentração final (mmol L <sup>-1</sup> )	Referência adaptada
Tetraborato de sódio*	9,3	6	(JASTRZEBSKA; PIASTA; SZŁYK, 2014)
Tetraborato de sódio	12,0	6	(JASTRZEBSKA; PIASTA; SZŁYK, 2014)
Tampão carbonato	10,0	150	(DADÁKOVÁ; KRÍŽEK; PELIKÁNOVÁ, 2009)
Tampão fosfato**	12,0	41,7	(RAMOS; VALENTE; RODRIGUES, 2014)

**Legenda:** \* reação em ultrassom durante 20 min e em banho-maria a 60 °C durante 40 min; \*\* metodologia com *salting-out*. **Fonte:** elaborado pela autora.

Nenhum dos procedimentos avaliados proporcionou resultados semelhantes ou melhores do que aqueles observados para a reação de derivatização de 5 min em temperatura ambiente e, por isso, as imagens não foram apresentadas. Cabe mencionar que esse procedimento de derivatização já vinha sendo utilizado em trabalhos de colaboração (UFSCAR – Universidade do Porto), nos quais as aminas biogênicas são determinadas por HPLC.

A próxima etapa consistiu em avaliar o sistema de derivatização em função da concentração do reagente derivatizante (DNS). As concentrações de DNS avaliadas foram 0,75; 1,0; 1,35; 2,5 e 3,5 g L<sup>-1</sup>. No geral, o perfil de separação foi semelhante em todos os casos, porém, a menor concentração do DNS proporcionou um aumento na magnitude do sinal analítico quando comparada às soluções mais concentradas (figuras não apresentadas). Desde que não foram observadas condições que justificassem o uso do reagente em maiores concentrações, a concentração de 0,75 g L<sup>-1</sup> foi selecionada para as próximas etapas.

A próxima etapa teve como objetivo avaliar alguns parâmetros instrumentais: tempo e tipo de injeção da amostra e tensão aplicada. Os testes realizados estão apresentados no Quadro 9:

**Quadro 9.** Tensão e injeção avaliados para o desenvolvimento do método.

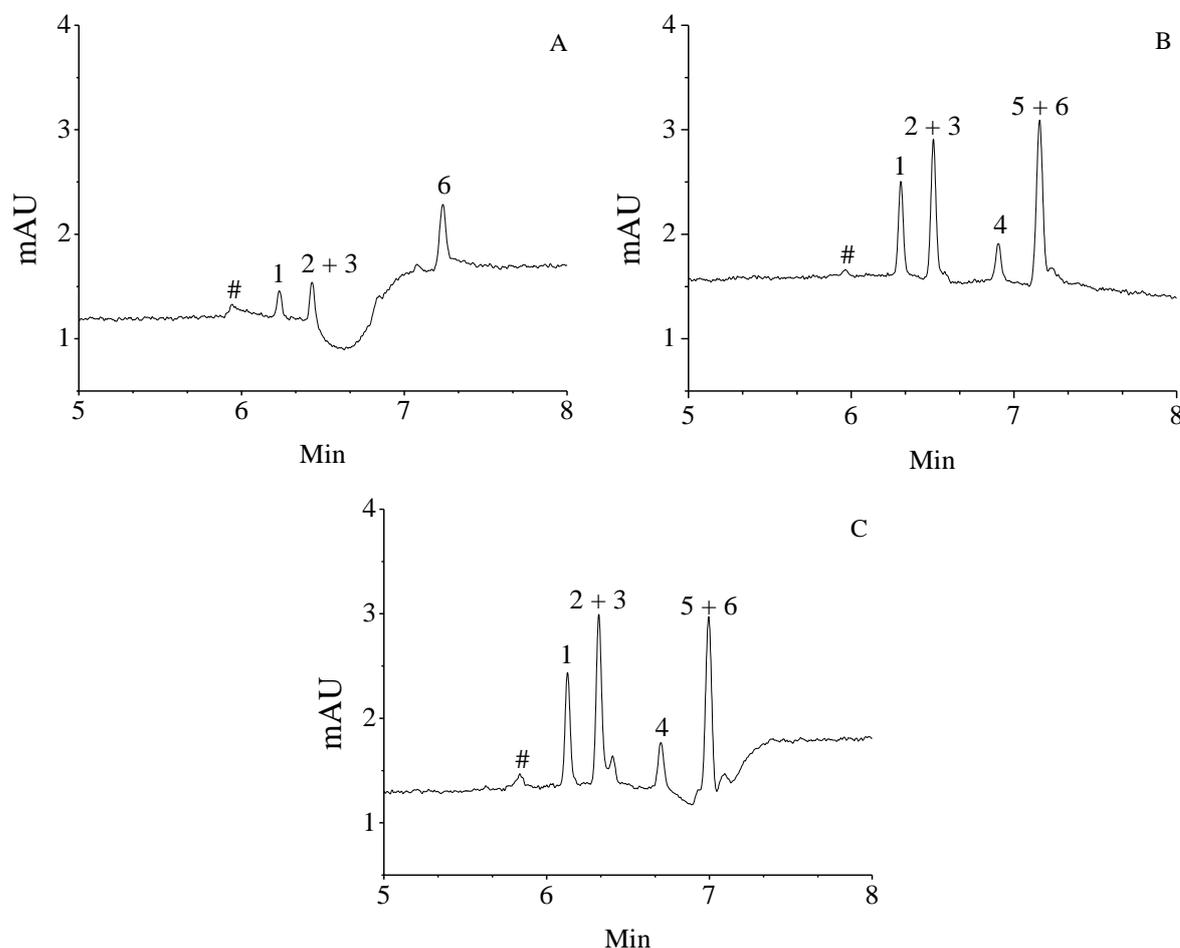
Teste	Condição utilizada
Tensão	16, 18, 20* e 22 kV
Injeção: modo hidrodinâmico	50 mBar × 3 s
	25 mBar × 6 s*
	25 mBar × 8 s
	25 mBar × 10 s
Injeção: modo eletrocinético	5 kV × 5 s
	6 kV × 10 s
Pré-concentração <i>on line</i>	H <sub>2</sub> O: 25 mBar × 5 s e amostra: 25 mBar × 10 s
	H <sub>2</sub> O: 25 mBar × 10 s e amostra: 25 mBar × 10 s

**Legenda:** \* condição selecionada. **Fonte:** elaborado pela autora.

Inicialmente, foi utilizado o modo de injeção hidrodinâmica (50 mBar x 3 s). Um dos problemas que podem ocorrer quando se utilizam tempos reduzidos de injeção é a variação da quantidade de amostra que é transferida para o interior da coluna capilar. Uma maneira de minimizar esse problema é utilizar tempos de injeção maiores com pressões menores e, por essa razão, a pressão aplicada foi reduzida para 25 mBar para a próxima etapa (avaliar o efeito do aumento do tempo de injeção na magnitude do sinal analítico). Mantendo a pressão constante (25 mBar) e variando o tempo de injeção (6, 8 e 10 s), foi possível observar um aumento na magnitude do sinal analítico em função do aumento do tempo de injeção, comportamento já esperado, uma vez que a quantidade de amostra inserida na coluna também aumenta. Entretanto, esse aumento no tempo de injeção proporcionou perda de resolução entre os picos. A melhor relação entre resolução e magnitude do sinal analítico foi obtida utilizando 25 mBar por 6s (figuras não apresentadas).

A injeção hidrodinâmica é o modo mais utilizado em CE, entretanto, a injeção eletrocinética pode ser selecionada devido ao tipo de matriz da amostra ou por razões de sensibilidade. A Figura 16 apresenta o comportamento do sistema de separação em função de diferentes tipos de injeção.

**Figura 16.** Efeito dos tipos de injeção da amostra no sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cada amina). A. injeção no modo eletrocínético de  $5 \text{ kV} \times 5 \text{ s}$ ; B. injeção no modo hidrodinâmico de  $25 \text{ mBar} \times 6 \text{ s}$ ; C. pré-concentração *on line* com injeção no modo hidrodinâmico de  $\text{H}_2\text{O}$ :  $25 \text{ mBar} \times 5 \text{ s}$  e amostra:  $25 \text{ mBar} \times 10 \text{ s}$ . Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina; #. picos não identificados. Eletrólito de corrida:  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 10 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector)  $\times$   $75 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura:  $29 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\lambda = 214 \text{ nm}$ . **Fonte:** elaborada pela autora.

Na injeção eletrocínética, a quantidade de analito transferida para o interior da coluna capilar é resultado da mobilidade eletroforética do analito, da condutividade da amostra e do eletrólito de corrida e da magnitude do EOF. Portanto, nesse tipo de injeção ocorre uma discriminação entre os analitos com diferentes mobilidades. Analitos com maior mobilidade entram em maior quantidade dentro do capilar, podendo ser pré-concentrados, quando comparados aos analitos de menor mobilidade (ALTRIA, 1996). A utilização do modo de injeção eletrocínético não apresentou resultados satisfatórios (Figura 16 A), pois a magnitude do sinal analítico dos picos dos analitos diminuiu muito em relação à injeção hidrodinâmica (Figura 16 B), além de que uma queda na linha de base no tempo de migração dos analitos foi

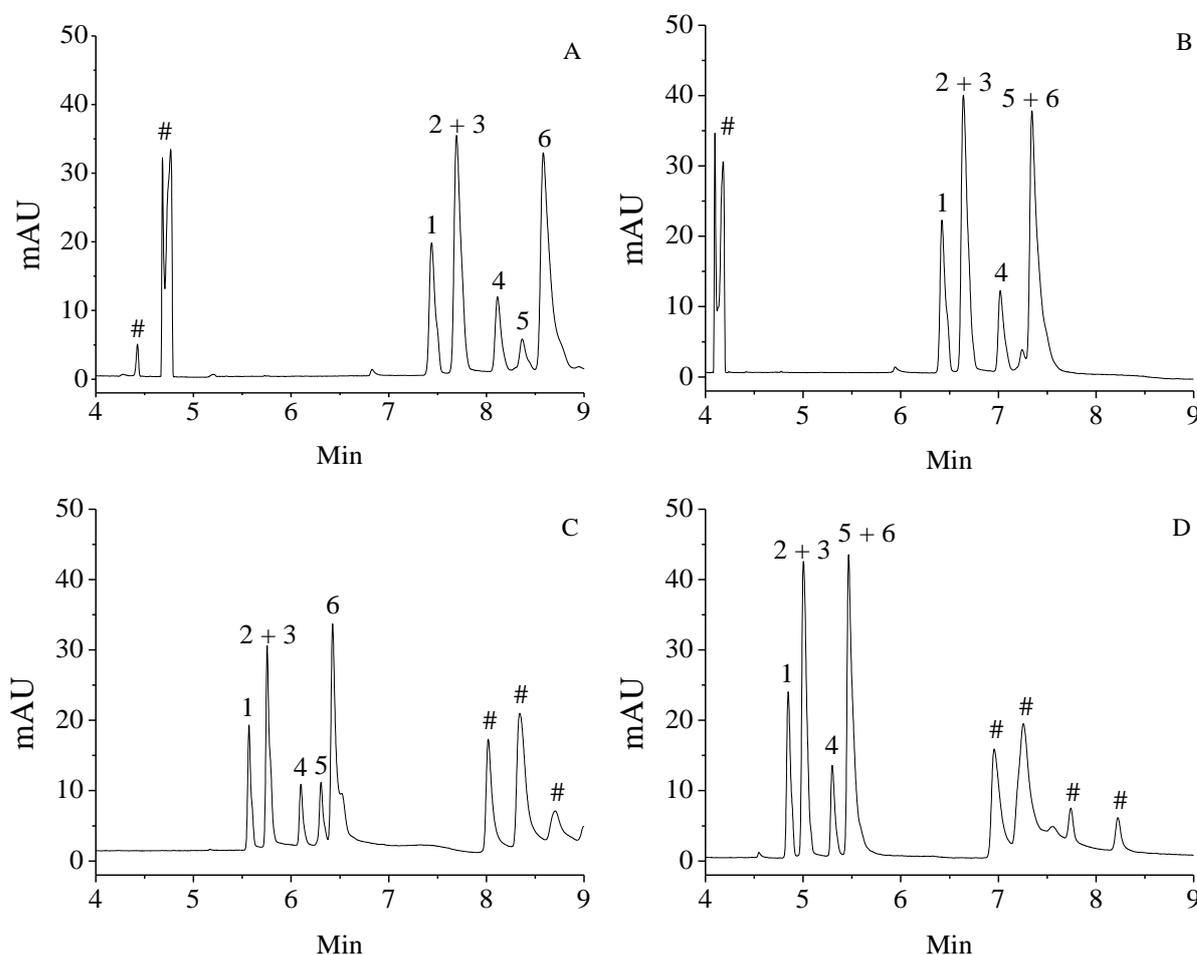
observada, comportamento que dificulta a identificação e quantificação, principalmente quando concentrações muito baixas são utilizadas.

Além de aumentar o tempo de injeção para melhorar a sensibilidade do método, existem alternativas que incluem técnicas de pré-concentração *on line*, sendo que o *stacking* é uma das estratégias mais utilizadas em CE. Uma banda de água é introduzida no interior do capilar antes da introdução da amostra, que deve ser preparada em um meio de baixa condutividade elétrica (água ou solvente orgânico). Quando a tensão é aplicada, forma-se uma região de alto campo elétrico na banda de água, maior que no restante da solução. Os analitos migrando na banda da amostra são acelerados e migram mais rapidamente quando encontram a banda de água, são desacelerados quando deixam essa banda de água e encontram novamente a banda do eletrólito e concentram-se assim em uma fina banda entre essas duas regiões (pré-concentração). Quando os campos elétricos são igualados, os analitos são separados dentro da coluna (MORAES et al., 2009). A utilização dessa estratégia proporcionou o aumento da magnitude do sinal analítico, porém, não houve estabilidade na linha de base no tempo de migração dos analitos, o que pode dificultar a análise (Figura 16 C).

Após avaliação dos tipos e tempos de injeção, o modo hidrodinâmico de 25 mBar durante 6 s foi selecionado para as análises posteriores.

Já o objetivo de avaliar o efeito da tensão é melhorar a eficiência e a resolução entre os picos, além de reduzir o tempo de análise. Os testes realizados estão apresentados na Figura 17:

**Figura 17.** Efeito da tensão aplicada no sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada amina). A. tensão: 16 kV; B. tensão: 18 kV; C. tensão: 20 kV; D. tensão: 22 kV. Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina; #. picos não identificados. Eletrólito de corrida:  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 10 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno; temperatura: 29 °C; injeção: 25 mBar  $\times$  6 s;  $\lambda = 214 \text{ nm}$ . **Fonte:** elaborada pela autora.

O melhor resultado foi obtido quando a tensão de 20 kV foi aplicada no sistema, pois proporcionou melhor relação entre resolução dos picos e tempo de análise.

Os picos não identificados observados na Figura 17 A e B, detectados antes do tempo de migração das BAs, são possíveis contaminantes, visto que foram observados algumas vezes após a utilização do equipamento de CE com imidazol (utilizado como eletrólito de corrida para detecção indireta). Cabe mencionar que é realizada a troca e lavagem dos eletrodos utilizados no equipamento, porém, o sistema pode ter ficado contaminado mesmo após o procedimento de limpeza, já que esses picos tinham a magnitude de sinal reduzida até desaparecerem completamente ao longo de várias corridas.

Apesar de o método desenvolvido ter apresentado resultados satisfatórios com relação à separação dos analitos de interesse, frequentemente eram observadas variações no sistema de separação, relacionadas principalmente com o tempo de migração, que ocasionavam coeluição entre os picos em algumas corridas. Com o objetivo de minimizar essas variações, os parâmetros analíticos (concentração do eletrólito de corrida e adição de ACN) e instrumentais (tensão e temperatura) foram novamente avaliados. Esse estudo foi feito para melhorar a resolução entre os picos, garantindo assim que pequenas variações em parâmetros como temperatura das soluções ou pH do eletrólito de corrida não interferissem de maneira significativa na separação. Os parâmetros investigados estão sumarizados Quadro 10:

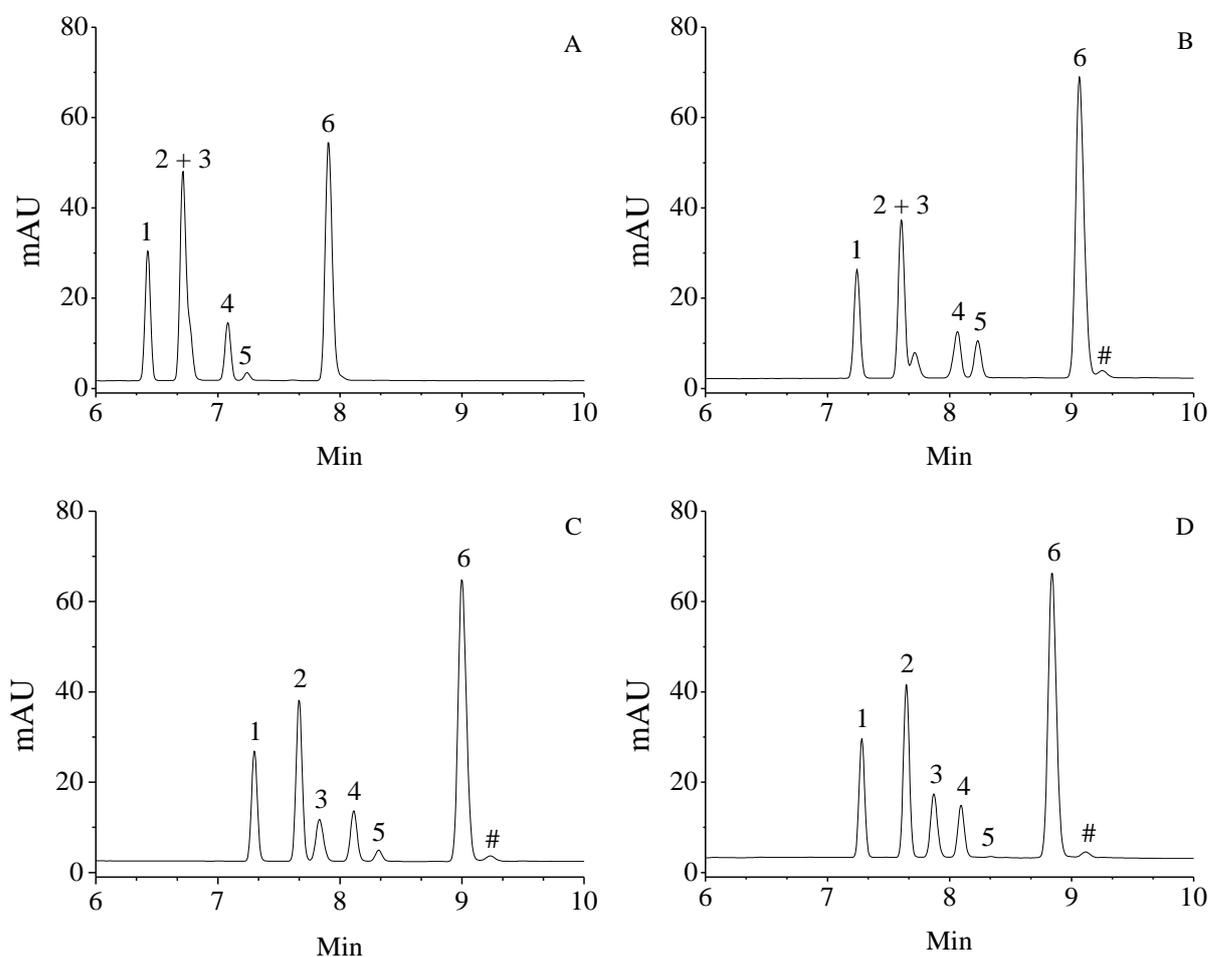
**Quadro 10.** Testes realizados para o desenvolvimento do método.

Teste	Condição utilizada
Concentração de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	20 – 150 mmol L <sup>-1</sup> *
Concentração de ACN	5 – 15 %**
Temperatura	21 – 29 °C***
Tensão	17, 18 e 20 kV

**Legenda:** \* intervalos de 10 mmol L<sup>-1</sup>; \*\* intervalos de 5 %; \*\*\* intervalos de 2 °C. **Fonte:** elaborado pela autora.

A Figura 18 apresenta somente os resultados mais relevantes obtidos para a avaliação do efeito da concentração do eletrólito de corrida no sistema de separação (concentração de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> variando de 80 a 140 mmol L<sup>-1</sup>):

**Figura 18.** Efeito da concentração de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  utilizada no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



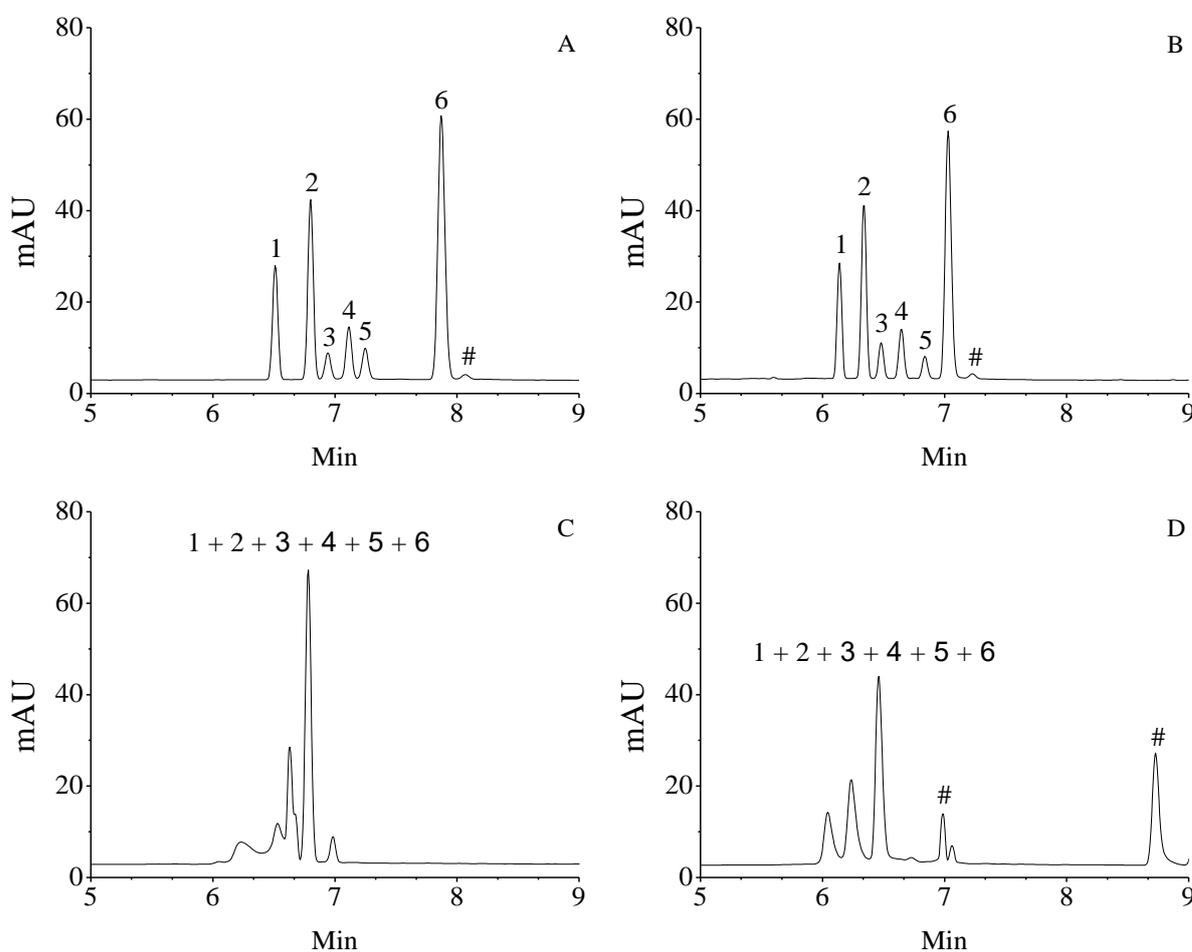
**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (25 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). Eletrólito de corrida: A. 80 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 2,50 ajustado com TEA; B. 100 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 2,50 ajustado com TEA; C. 120 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 2,50 ajustado com TEA; D. 140 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 2,50 ajustado com TEA. Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina; #. picos não identificados. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura: 29 °C; injeção: 25 mBar  $\times$  6 s;  $\lambda = 214$  nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

A última concentração de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  avaliada (150 mmol L<sup>-1</sup>) não proporcionou melhora em relação à concentração de 140 mmol L<sup>-1</sup> e, por isso, não foi apresentada na figura. Com base nos eletroferogramas da Figura 18, foi possível observar que o aumento da concentração de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  melhorou a resolução entre os picos 2 e 3, considerados mais críticos no sistema de separação. Na Figura 18 A, é possível observar que os tempos de migração variam cerca de 1 min em relação à Figura 18 B, C e D. Tal fato ocorreu porque o teste da concentração do  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , de 20 a 150 mmol L<sup>-1</sup>, foi realizado em dois dias consecutivos de trabalho (20 – 80 mmol L<sup>-1</sup> no primeiro dia; 100 – 150 mmol L<sup>-1</sup> no segundo dia). Essa diferença no tempo de migração ilustra as variações que motivaram essa nova etapa de otimização do sistema de separação.

Outro fato a ser observado é que na Figura 18 A, o sinal analítico referente ao pico 5 (histamina 2) se encontrava bastante reduzido (análise realizada no final do primeiro dia de trabalho) e que na Figura 18 B, C e D, foi observada a diminuição da magnitude do sinal do mesmo analito ao longo do dia. Esse comportamento se deve, provavelmente, à estabilidade do composto em função do tempo de reação (último teste apresentado nessa mesma seção).

Desde que qualquer alteração na composição ou concentração do eletrólito de corrida pode afetar a seletividade (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995), o efeito da concentração de ACN adicionada ao eletrólito de corrida foi novamente avaliada, como apresenta a Figura 19:

**Figura 19.** Efeito da concentração de ACN utilizada no eletrólito de corrida para o sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



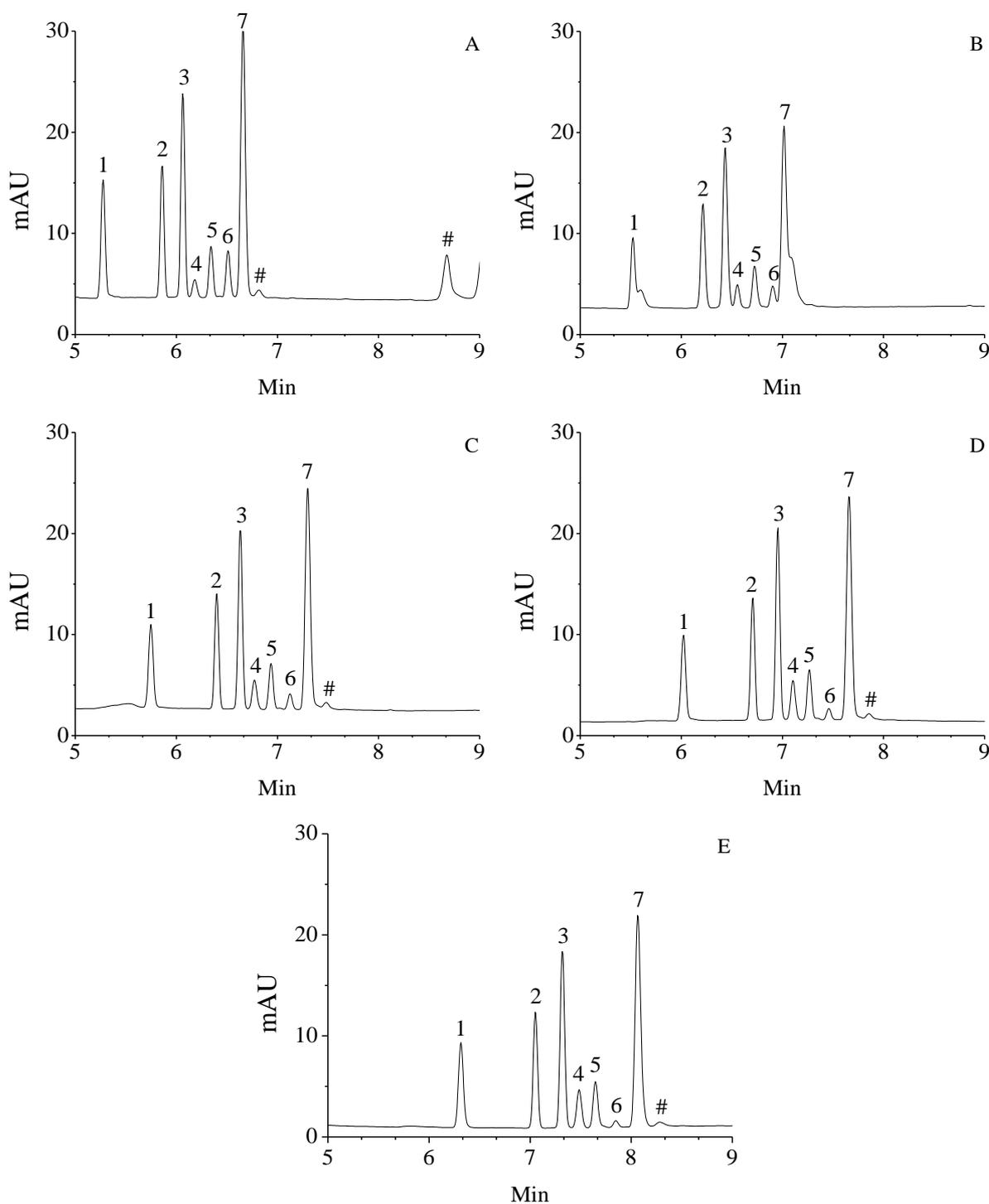
**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (25 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). Eletrólito de corrida: A. 140 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,50 ajustado com TEA; B. 140 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 5 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA; C. 140 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 10 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA; D. 140 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 15 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA. Identificação dos picos: 1. putrescina; 2. cadaverina; 3. histamina 1; 4. tiramina; 5. histamina 2; 6. triptamina; #. picos não identificados. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75 μm de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura: 29 °C; injeção: 25 mBar × 6 s; λ = 214 nm.  
**Fonte:** elaborada pela autora.

Os resultados obtidos nos eletroferogramas C e D, da Figura 19, não possibilitaram que fosse feita a discriminação e identificação dos picos.

A adição de 5 % de ACN no eletrólito de corrida proporcionou boa resolução entre todos os picos, além de diminuir o tempo total de análise. O comportamento observado em relação à redução do tempo de análise pode estar relacionado ao fato de que o EOF ocorre pela contribuição de todas as espécies iônicas presentes na solução e a mobilidade desses íons é inversamente proporcional à viscosidade (que está relacionada diretamente à força de atrito) (TAVARES, 1996). Como a ACN diminui a viscosidade de soluções aquosas (BAKER, 1995), houve um aumento na mobilidade dos íons em solução. As concentrações de 10 e 15 % de ACN não proporcionaram resultados satisfatórios em relação à separação.

Apesar da concentração de  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ter proporcionado o melhor sistema de separação, a coluna passou a apresentar menor tempo de vida útil. Para minimizar o problema, a concentração do eletrólito foi reduzida para  $120 \text{ mmol L}^{-1}$  com 5 % de ACN. Como a utilização de altas concentrações do eletrólito de corrida pode ocasionar um aumento na temperatura da coluna capilar, a temperatura e a tensão aplicadas no sistema foram ajustadas. A Figura 20 apresenta o efeito da temperatura no sistema de separação:

**Figura 20.** Efeito da temperatura no sistema de separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



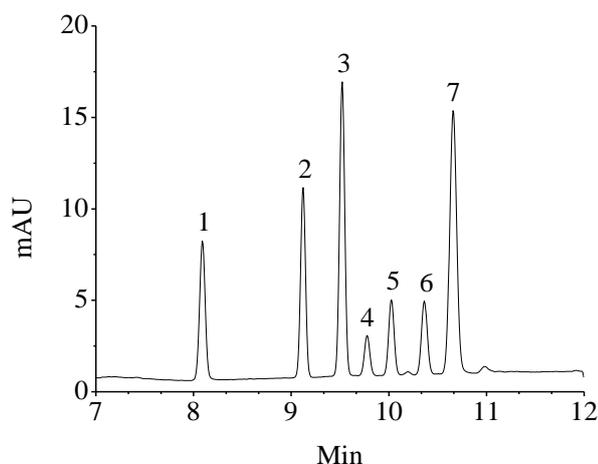
**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (10 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). A. temperatura: 29 °C; B. temperatura: 27 °C; C. temperatura: 25 °C; D. temperatura: 23 °C; E. temperatura: 21 °C. Identificação dos picos: 1. benzilamina; 2. putrescina; 3. cadaverina; 4. histamina 1; 5. tiramina; 6. histamina 2; 7. triptamina; #. picos não identificados. Eletrólito de corrida: 120 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 5 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75 μm de diâmetro interno; tensão: 20 kV; injeção: 25 mBar × 6 s; λ = 214 nm.  
**Fonte:** elaborada pela autora.

A redução da temperatura promove uma diminuição nos valores de corrente e um aumento na viscosidade do eletrólito de corrida. Essas características podem resultar em uma redução do EOF e, conseqüentemente, melhorar a resolução entre picos, em contrapartida que um aumento no tempo de análise pode ser observado. A temperatura de 23 °C foi selecionada porque apresentou resolução e tempo de análise satisfatórios. A tensão foi reduzida para 18 kV para aumentar ainda mais a resolução entre os picos e assim evitar a coeluição em função de pequenas variações no sistema, além do fato de ter apresentado bom compromisso com o tempo de análise.

Com as condições analíticas e instrumentais otimizadas, diferentes substâncias foram avaliadas para selecionar um padrão interno (PI) para o método, que é utilizado para aumentar a precisão e a confiabilidade na eletroforese capilar, já que flutuações no EOF, temperatura e campo elétrico podem causar variações nos tempos de migração. Utilizar a razão entre a área do pico do analito e a área do padrão interno corrige os possíveis erros relacionados à evaporação da amostra, variação no tempo de migração, alteração de parâmetros ópticos do capilar, entre diversos outros efeitos. Além disso, a utilização de um PI pode auxiliar na identificação de alguma amina presente 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 a viscosidade, por exemplo (NOWAK; WÓ ZNIAKIEWICZ; KOŚCIELNIAK, 2018).

As substâncias testadas foram: imidazol, glicina, 1,7 diaminoheptano e benzilamina. O imidazol apresentou um pico detectado após a migração de todas as aminas investigadas nesse trabalho (tempo de migração em torno de 17 min). Além de aumentar o tempo de análise, o pico apresentou sinal analítico muito elevado e com forma assimétrica, mesmo quando foi utilizado um baixo valor de concentração. A glicina apresentou um pico de baixa magnitude de sinal analítico, mesmo com altas concentrações, além de que foi observada coeluição com o pico da putrescina. O 1,7 diaminoheptano apresentou um pico simétrico e com magnitude de sinal analítico apropriada, porém possui mesmo tempo de migração da tiramina. A benzilamina foi detectada antes das aminas de interesse, se mostrando bastante adequada para ser utilizada como PI, e por isso foi selecionada. A Figura 21 apresenta o sistema de separação otimizado.

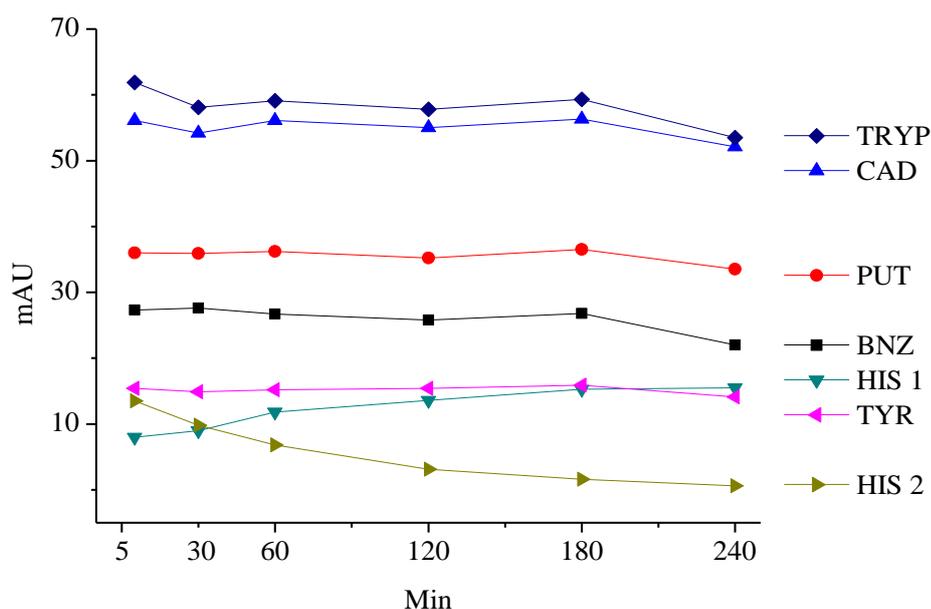
**Figura 21.** Sistema otimizado para a separação dos adutos BA-DNS utilizando o modo CZE.



**Legenda:** Eletroferograma da mistura padrão dos adutos BA-DNS (8 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). Identificação dos picos: 1. benzilamina; 2. putrescina; 3. cadaverina; 4. histamina 1; 5. tiramina; 6. histamina 2; 7. triptamina. Eletrólito de corrida: 120 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 5 % v/v ACN pH 2,50 ajustado com TEA; capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75 μm de diâmetro interno; tensão: 18 kV; temperatura: 23 °C; injeção: 25 mBar × 6 s; λ = 214 nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

O último parâmetro avaliado foi a estabilidade dos adutos formados. Após o processo de derivatização, a mistura padrão contendo os adutos DNS-BAs foram analisadas após diferentes tempos de reação: 5, 30, 60, 120, 180 e 240 min. Foi construído um gráfico das áreas de cada pico em função do tempo de reação (Figura 22).

**Figura 22.** Teste de estabilidade: áreas dos picos dos adutos BA-DNS em função do tempo de reação de derivatização.



**Legenda:** BNZ: benzilamina; CAD: cadaverina; HIS: histamina; PUT: putrescina; TRYP: triptamina (do inglês tryptamine); TYR: tiramina (do inglês tyramine). **Fonte:** elaborado pela autora.

A triptamina e a cadaverina apresentaram um máximo de área do pico em 5 min, com comportamento relativamente estável até 180 min de reação. A putrescina, a tiramina e a benzilamina (PI) apresentaram estabilidade até 180 min. A histamina apresentou a maior variação, sendo que a área do pico da histamina 1 aumentava a medida que a área do pico da histamina 2 decrescia de maneira quase proporcional, apresentando certa estabilidade a partir de 180 min. Tal comportamento pode evidenciar que uma espécie de histamina é convertida na outra. Esse fato já vinha sido observado no decorrer do trabalho e pôde ser evidenciado mais claramente por meio desse estudo de estabilidade.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS REAIS

Para selecionar o melhor processo de extração para as amostras reais, foram adaptadas duas metodologias: utilizando ácido tricloroacético (método utilizado no teste de degradação, seção 4.5.1) (ADIMCILAR; ÖZTEKIN; ERIM, 2017) e ácido clorídrico (RESTUCCIA et al., 2011). Para avaliar quais parâmetros influenciavam mais no processo de extração (ácido utilizado ou procedimento de agitação/ tempo de extração), dois procedimentos foram testados para cada um dos ácidos: agitação durante 1 min, com auxílio de vortex, ou durante 30 min, com auxílio de agitador magnético. O teste foi feito utilizando uma amostra de iogurte, com a adição das aminas na concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados referentes às áreas de cada pico estão apresentados no Quadro 11.

**Quadro 11.** Comparação de métodos de extração de aminas biogênicas.

Amina	Área dos picos dos analitos			
	TCA 6 % (1)	TCA 6 % (2)	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (1)	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (2)
Putrescina	4,8	3,0	5,0	2,5
Cadaverina	8,8	5,7	10,0	4,7
Histamina 1	0,78	0,50	0,88	0,59
Tiramina	1,4	1,6	2,5	1,5
Histamina 2	1,0	0,50	1,5	0,86
Triptamina	20,0	29,8	18,0	12,9

**Legenda:** (1) agitação de 30 min com auxílio de agitador magnético; (2) agitação de 1 min com auxílio de vortex. **Fonte:** elaborada pela autora.

É possível observar que o processo de extração utilizando o HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com agitação durante 30 min após a adição do ácido na amostra, proporcionou melhores resultados,

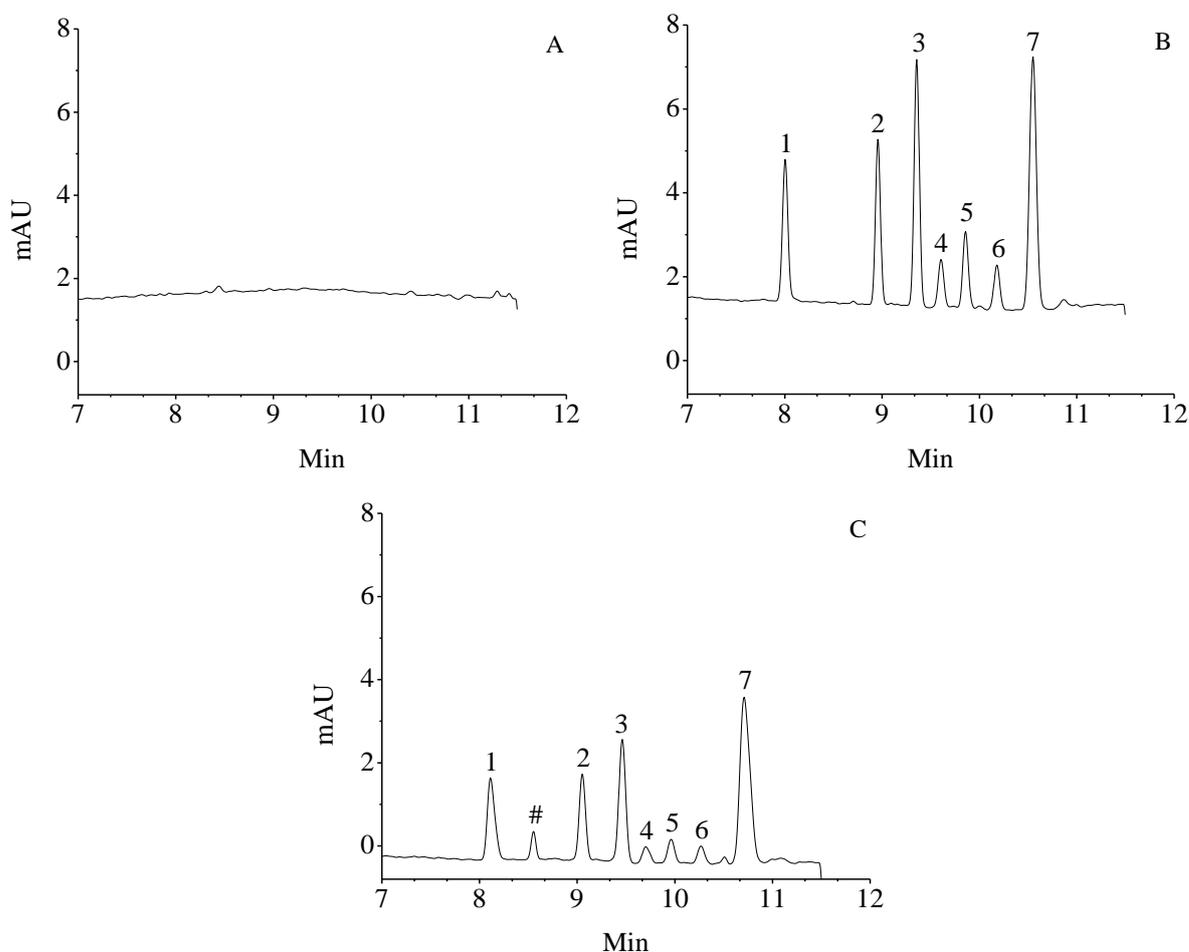
visto que os picos obtidos apresentaram maior magnitude de sinal analítico. Sendo assim, o procedimento utilizando ácido clorídrico com 30 min de agitação foi selecionado.

#### 4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

##### 4.4.1 Seletividade

A Figura 23 mostra o controle da amostra selecionada (bebida láctea com polpa de morango) e soluções padrão contendo 4 mg L<sup>-1</sup> de cada BA preparadas em água e na amostra, respectivamente, para avaliação da seletividade do método:

**Figura 23.** Seletividade do método analítico.



**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS (4 mg L<sup>-1</sup> de cada amina). A. Controle da amostra (bebida láctea com polpa de morango); B. Mistura padrão preparada em água; C. Mistura padrão adicionada a amostra (bebida láctea com polpa de morango). Identificação dos picos: 1. benzilamina; 2. putrescina; 3. cadaverina; 4. histamina 1; 5. tiramina; 6. histamina 2; 7. triptamina; #. pico não identificado. Eletrólito de corrida: 120 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> contendo 5 % v/v de ACN pH 2,50 ajustado com TEA. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector) × 75 μm de diâmetro interno; Tensão: 18 kV; Temperatura: 23 °C; Injeção: 25 mBar × 6 s; λ = 214 nm. **Fonte:** elaborada pela autora.

Foi possível observar que a amostra de iogurte (controle) não apresentou nenhum pico que pudesse interferir nos picos das aminas de interesse, indicando que o método é específico para as BAs, ou seja, não há interferentes na amostra capazes de prejudicar a separação e a identificação. Apenas as áreas ficaram ligeiramente menor na amostra, o que sugere um efeito da matriz.

#### 4.4.2 Linearidade e intervalo de análise

A Tabela 1 apresenta os parâmetros estatísticos obtidos para a curva analítica:

**Tabela 1.** Parâmetros estatísticos da curva analítica.

<b>Amina</b>	<b><i>Intercept</i></b>	<b><i>Slope</i></b>	<b>Coef. Correlação (r)</b>
Putrescina	-0,104	0,485	0,999
Cadaverina	-0,087	0,830	0,999
Histamina 1	-0,051	0,118	0,998
Tiramina	-0,029	0,242	0,998
Histamina 2	-0,021	0,168	0,999
Triptamina	0,166	1,157	0,997

**Fonte:** elaborada pela autora.

Os coeficientes de correlação mostraram-se satisfatórios, variando de 0,997 a 0,999 no intervalo avaliado, sendo adequados de acordo com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que é de 0,990 (BRASIL, 2017).

#### 4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

A Tabela 2 apresenta duas colunas, A e B. A coluna (A) representa os valores calculados para os limites de detecção e quantificação utilizando as soluções padrão que foram derivatizadas sem pré-concentração; a coluna (B) refere-se aos valores de LOD e LOQ que foram calculados após os procedimentos de derivatização e pré-concentração.

**Tabela 2.** Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método proposto.

Amina	(A)		(B)	
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Putrescina	64	212	12	39
Cadaverina	42	141	7	25
Histamina 1	417	1.389	45	145
Tiramina	150	500	34	112
Histamina 2	188	625	29	96
Triptamina	49	163	8	27

**Legenda:** (A) sem processo de pré-concentração; (B) com processo de pré-concentração.  
**Fonte:** elaborada pela autora.

A Tabela 3 apresenta os LODs e LOQs de alguns métodos disponíveis na literatura, também calculados com base na razão sinal-ruído (S/N).

**Tabela 3.** Limites de detecção e quantificação para métodos disponíveis na literatura.

Amina	CE-C <sup>4</sup> D <sup>1</sup>		CZE-CD <sup>2</sup>		LC-UV <sup>3</sup>	
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Putrescina	41	140	176	441	30	100
Cadaverina	45	150	404	1011	-	-
Tiramina	98	490	686	2058	80	250
Triptamina	-	-	801	2403	-	-
Histamina	54	180	333	1111	60	170

**Legenda:** <sup>1</sup> (ADIMCILAR; ÖZTEKIN; BEDIA ERIM, 2018); <sup>2</sup> (KVASNIČKA; VOLDŘICH, 2006); <sup>3</sup> (RESTUCCIA et al., 2011); CE-C<sup>4</sup>D: eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (do inglês *capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detector*); CZE-CD: eletroforese capilar em zona com detecção condutométrica (do inglês *capillary zone electrophoresis with conductometric detector*); LC-UV: cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta (do inglês *liquid chromatography with ultraviolet detection*). **Fonte:** elaborada pela autora.

Foi possível observar, com base nas Tabelas 2 e 3, que amostras contendo baixas concentrações de BAs podem ser analisadas por meio do método desenvolvido, sendo que os LODs e LOQs são equiparáveis ao método utilizando CE-C<sup>4</sup>D e superiores aos valores obtidos com CE-CD. A utilização do sistema de pré-concentração torna possível a determinação de concentrações ainda menores, com valores de LODs e LOQs bastante satisfatórios.

#### 4.4.4 Precisão

Os coeficientes de variação calculados para análise da precisão do método estão apresentados na Tabela 4:

**Tabela 4.** Precisão do método proposto expressa como coeficiente de variação.

Amina	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Coeficiente de variação (%)	
		Repetibilidade	Precisão intermediária
Putrescina	2,5	1,7	5,5
	5,0	0,9	8,8
	10,0	2,2	6,0
Cadaverina	2,5	1,6	8,0
	5,0	1,1	9,6
	10,0	2,3	5,5
Tiramina	2,5	1,1	8,2
	5,0	2,7	8,8
	10,0	2,7	8,2
Triptamina	2,5	1,1	6,5
	5,0	2,9	8,0
	10,0	2,9	6,8
Histamina total*	2,5	3,6	14,6
	5,0	9,9	14,1
	10,0	8,4	14,9

**Legenda:** DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; \* os desvios padrão e coeficientes de variação foram calculados com a área da histamina total (somadas as áreas dos picos Histamina 1 e Histamina 2). **Fonte:** elaborada pela autora.

Com exceção da histamina, os resultados obtidos para o ensaio de precisão foram considerados satisfatórios para as concentrações de 2,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>. De acordo com a literatura (HUBER, 2007), a precisão deve ser inferior a e 11 % nesse intervalo de concentração, sendo que os coeficientes de variação foram inferiores a 3,0 % para a repetibilidade e 9,7 % para a precisão intermediária.

Para a concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, a precisão deve ser inferior a 7,3 %. Ainda desconsiderando o caso da histamina, os coeficientes de variação foram inferiores a 3,0 % para a repetibilidade das outras aminas e 6,9 % para a precisão intermediária da putrescina, cadaverina e triptamina, resultados considerados satisfatórios. Apenas a tiramina apresentou

um coeficiente de variação de 8,3 % para a precisão intermediária, valor superior ao recomendado para essa concentração

Para a histamina total, os valores de precisão não foram satisfatórios (CV < 10 % para a repetibilidade e 15,0 % para a precisão intermediária). A precisão expressa justamente o grau de dispersão do procedimento e a variação significativa que ocorre nas áreas dos picos da histamina, em função do tempo, já foi ilustrada no teste apresentado na Figura 22. Portanto, pode-se inferir que tal resultado se deve à falta de estabilidade do composto.

#### 4.4.5 Exatidão

Os resultados de recuperação calculados para análise da exatidão do método estão apresentados na Tabela 5:

**Tabela 5.** Recuperação do método proposto expressa em porcentagem.

Amina	Recuperação (%)		
	2,5 mg L <sup>-1</sup>	5,0 mg L <sup>-1</sup>	10,0 mg L <sup>-1</sup>
Putrescina	96,2 ± 1,6	101,3 ± 0,9	100,6 ± 2,2
Cadaverina	87,1 ± 1,4	96,2 ± 1,1	100,8 ± 2,3
Tiramina	105,5 ± 1,2	110,7 ± 3,0	95,4 ± 2,6
Triptamina	89,9 ± 1,0	95,9 ± 2,8	98,4 ± 2,9
Histamina total*	87,4 ± 3,1	112,9 ± 11,2	104,0 ± 8,7

**Legenda:** Procedimento realizado em amostra de iogurte; \* as recuperações foram calculadas com a área da histamina total (somadas as áreas dos picos Histamina 1 e Histamina 2). **Fonte:** elaborada pela autora.

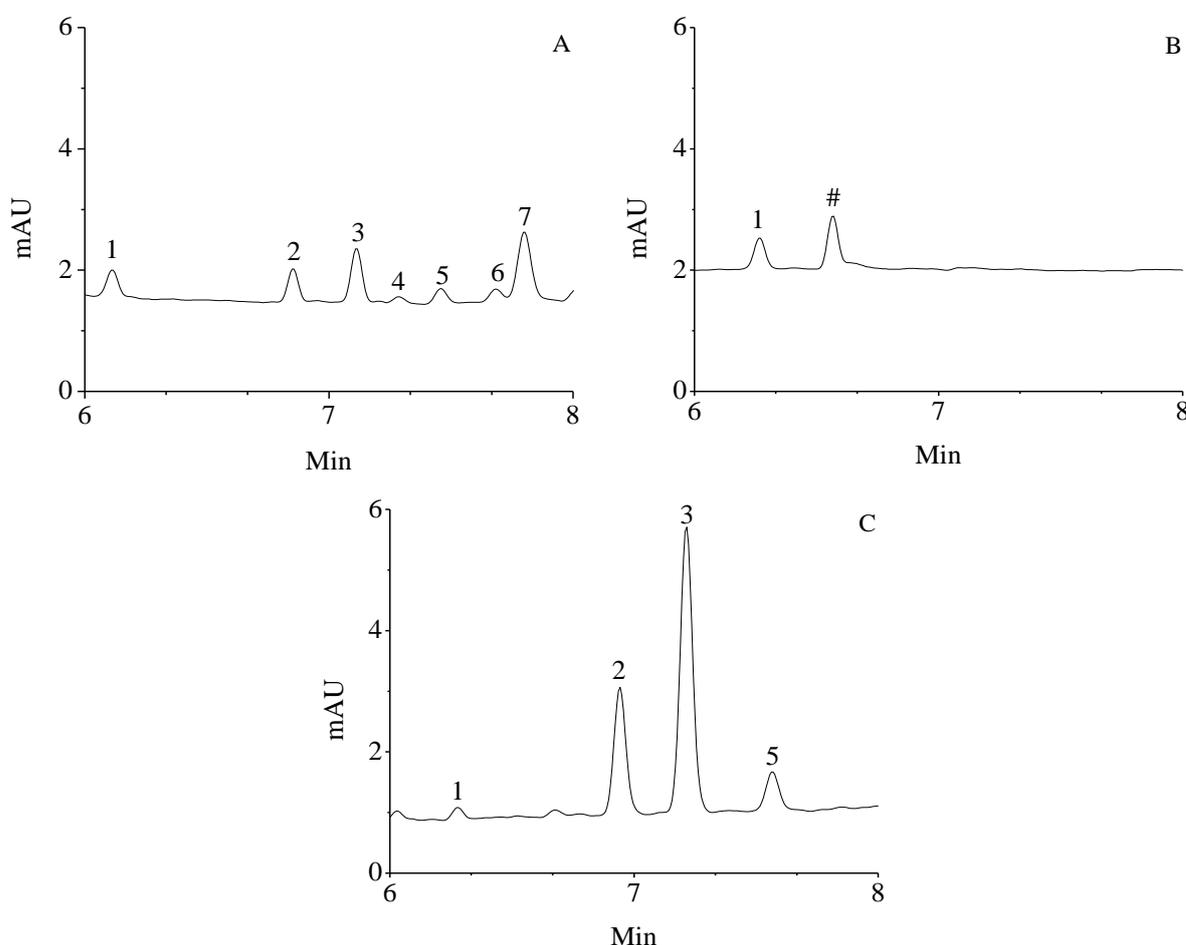
De acordo com a literatura (HUBER, 2007), a recuperação do analito deve estar entre 80 e 110 %, na faixa de concentração avaliada (2,5; 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>). No geral, os resultados obtidos para o ensaio foram satisfatórios (variação de 87,1 ± 1,4 a 105,5 ± 1,2). Apenas a recuperação da histamina total, nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> (recuperação de 112,9 ± 11,2 e 104,0 ± 8,7 %, respectivamente), e de tiramina, na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> (recuperação de 110,7 ± 3,0 %), considerando o erro, foram consideradas fora do intervalo recomendado.

## 4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

### 4.5.1 Teste de degradação em amostras reais

Antes dos ajustes finais, o método desenvolvido foi aplicado para avaliar a presença das aminas biogênicas como indicativo de degradação do produto. As amostras (iogurte integral e queijo fresco) foram armazenadas por dois meses sob refrigeração. Os eletroferogramas obtidos para cada amostra estão apresentados na Figura 24:

**Figura 24.** Avaliação qualitativa de amostras reais: teste de degradação em amostras de iogurte e queijo.



**Legenda:** Eletroferogramas da mistura padrão dos adutos BA-DNS ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cada amina) e amostras de iogurte e queijo. A. Mistura padrão das aminas preparadas em água; B. amostra de iogurte integral; C. amostra de queijo fresco. Identificação dos picos: 1. benzilamina; 2. putrescina; 3. cadaverina; 4. histamina 1; 5. tiramina; 6. histamina 2; 7. triptamina; #. pico não identificado. Eletrólito de corrida:  $120 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  contendo 5 % v/v de ACN pH 2,50 ajustado com TEA. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno; Tensão: 20 kV; Temperatura: 23 °C; Injeção: 25 mBar  $\times$  6 s;  $\lambda = 214 \text{ nm}$ . **Fonte:** elaborada pela autora.

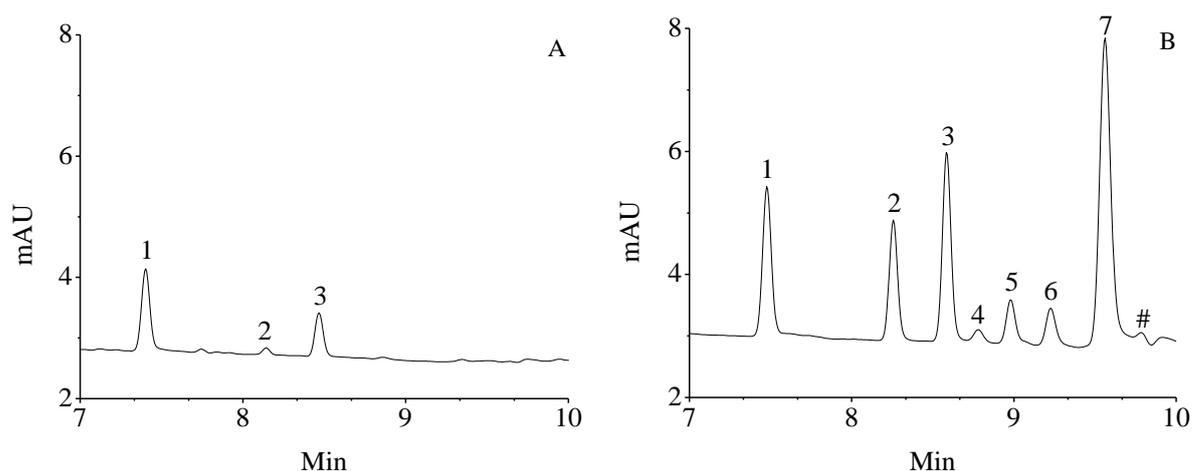
Como pôde ser observado, na amostra de iogurte (Figura 24 B) foi identificado o pico do padrão interno e um pico não identificado, que pode ser uma amina não avaliada no presente trabalho. Com essa possibilidade, foi realizado um teste para verificar se esse pico poderia representar alguma das poliaminas naturais, espermina e espermidina, que podem estar presentes nesse tipo de amostra de acordo com a literatura (ADIMCILAR; ÖZTEKIN; BEDIA ERIM, 2018; RESTUCCIA et al., 2011). Entretanto, essa hipótese não foi confirmada. As aminas avaliadas não apresentaram picos no tempo de migração correspondente ao pico não identificado na amostra.

Na amostra de queijo (Figura 24 C), foi possível identificar os picos da putrescina, cadaverina e tiramina, provavelmente resultantes do período de estocagem, evidenciando degradação do produto.

#### 4.5.2 Determinação quantitativa em amostras reais

O método foi aplicado para a determinação quantitativa em cinco amostras de produtos lácteos: queijo fresco (A) e (B) e bebida láctea com polpa de frutas (A), (B) e (C). A Figura 25 apresenta os eletroferogramas de uma das amostras de queijo fresco e um padrão de aminas utilizando as condições otimizadas, definidas na seção 4.2.

**Figura 25.** Aplicação do método em amostra de queijo fresco.



**Legenda:** Eletroferogramas da aplicação do método. A. Amostra de queijo fresco; B. Mistura padrão dos adutos BA-DNS ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cada amina) preparada em água. Identificação dos picos: 1. benzilamina; 2. putrescina; 3. cadaverina; 4. histamina 1; 5. tiramina; 6. histamina 2; 7. triptamina; #. pico não identificado. Eletrólito de corrida:  $120 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  contendo 5 % v/v de ACN pH 2,50 ajustado com TEA. Capilar: 48,5 cm total (40 cm até o detector)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno; Tensão: 18 kV; Temperatura: 23 °C; Injeção: 25 mBar  $\times$  6 s;  $\lambda = 214 \text{ nm}$ . **Fonte:** elaborada pela autora.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na aplicação do método nas cinco amostras de produtos lácteos:

**Tabela 6.** Aplicação do método proposto para amostras de produtos lácteos.

Amina	Concentração das amostras (mg/kg)				
	Iogurte A	Iogurte B	Iogurte C	Queijo fresco A	Queijo fresco B
Putrescina	ND	ND	ND	ND	<LOQ**
Cadaverina	ND	ND	<LOQ*	ND	3,3 ± 0,1
Tiramina	ND	ND	ND	ND	ND
Triptamina	ND	ND	ND	ND	ND
Histamina	ND	ND	ND	ND	ND

**Legenda:** ND: não detectado; <LOQ: abaixo do limite de quantificação (pico detectado, porém com concentração inferior ao limite de quantificação sem o processo de pré-concentração, de \*141 µg L<sup>-1</sup> e \*\*212 µg L<sup>-1</sup>). **Fonte:** elaborada pela autora.

Uma amostra de queijo e duas amostras de bebida láctea não indicaram a presença de nenhuma amina. Todas as amostras foram submetidas ao processo de pré-concentração, para garantir que não havia a presença de alguma amina em concentrações abaixo dos limites de detecção e/ou quantificação do método sem procedimento de pré-concentração. Mesmo assim, essas amostras não apresentaram nenhuma amina. A amostra de iogurte C apresentou um pico para a cadaverina, acima do limite de detecção, porém abaixo do limite de quantificação do método. O mesmo ocorreu para a putrescina, na amostra de queijo fresco B. O único analito com concentração superior aos limites de detecção e quantificação do método sem procedimento de pré-concentração foi a cadaverina, também presente na amostra de queijo fresco B. A concentração encontrada, de 3,3 ± 0,1 mg de cadaverina por quilo de amostra, indica que houve prévia contaminação ou mesmo degradação bastante rápida do produto, considerando a data de fabricação e a conservação adequada. A presença da cadaverina é predominante entre diferentes tipos de queijo (PAPAGEORGIOU et al., 2018), embora a concentração encontrada tenha sido pequena em relação a outras análises realizadas no mesmo tipo de produto (364 ± 2 mg de cadaverina por quilo de queijo fresco) (ADIMCILAR; ÖZTEKIN; BEDIA ERIM, 2018).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho propôs uma nova metodologia de análise que se mostrou adequada para a determinação de aminas biogênicas em amostras de alimentos lácteos, utilizando a eletroforese capilar como técnica analítica. As principais vantagens do método foram curto tempo de análise e bom custo-benefício em relação a outras técnicas de separação.

A derivatização utilizando DNS apresentou como principais características simplicidade e rapidez, quando comparada aos procedimentos descritos na literatura que utilizam o reagente associado à técnica de HPLC. Após a otimização dos parâmetros analíticos e instrumentais, a utilização de um eletrólito de corrida com pH 2,5 possibilitou que os adutos BA-DNS adquirissem carga e que a análise fosse feita utilizando o modo CZE.

No geral, os parâmetros de validação avaliados se mostram satisfatórios. A utilização do sistema de pré-concentração utilizando o procedimento de evaporação/redissolução proporcionou melhores resultados em relação aos limites de detecção e quantificação.

A utilização de ácido clorídrico com agitação durante 30 min apresentou melhor desempenho para extração das BAs em amostras reais. O método se mostrou eficaz para avaliação qualitativa em testes de degradação e para determinações quantitativas em produtos lácteos.

Além da possibilidade da aplicação do método para outras amostras semelhantes, adaptações nas técnicas de extração permitem que o método também possa ser utilizado para outros tipos de matriz, como produtos cárneos e embutidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIMCILAR, V.; ÖZTEKIN, N.; BEDIA ERIM, F. A Direct and Sensitive Analysis Method for Biogenic Amines in Dairy Products by Capillary Electrophoresis Coupled with Contactless Conductivity Detection. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1374–1379, 2018.

ADIMCILAR, V.; ÖZTEKIN, N.; ERIM, F. B. A Direct and sensitive analysis method for biogenic amines in dairy products by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. **Food Analytical Methods**, v. 4, n. C D, 2017.

**Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System: User Manual**. 12. ed. Germany: Agilent Technologies, 2009.

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. [s.l.] Humana Press, 1996. v. 52

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York, NY: John Wiley & Sons, 1995.

BAÑOS, C. E.; SILVA, M. A novel clean-up method for urine analysis of low-molecular mass aldehydes by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 17–18, p. 1412–1418, maio 2011.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 669–680, 2008.

BIO-RAD LABORATORIES. **An introduction to capillary electrophoresis**. California: Life Science Group, 2000.

BLANC, T.; GUZMAN, N. A.; SCHAUFELBERGER, D. E. **Capillary Electrophoresis**. 2. ed. New Mexico: Marcel Dekker, 1997.

BRASIL, A. N. DE V. S. (ANVISA). **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2018

BRÜCKNER, H.; FLASSIG, S.; KIRSCHBAUM, J. Determination of biogenic amines in infusions of tea (*Camellia sinensis*) by HPLC after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl). **Amino Acids**, v. 42, n. 2–3, p. 877–885, 29 fev. 2012.

CARDA-BROCH GUEST EDITOR, S.; HADDAD EDITOR, P. R. Method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 1, 2014.

COFFACCI, L. et al. Determination of Total Nitrosamines in Vegetables Cultivated Organic and Conventional Using Diamond Electrode. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 4, p. 1122–1127, 12 ago. 2013.

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

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

DEL RIO, B. et al. Spermine and spermidine are cytotoxic towards intestinal cell cultures, but are they a health hazard at concentrations found in foods? **Food Chemistry**, v. 269, p. 321–326, 2018.

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, 1 abr. 2011.

ELLIS, D. I. et al. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 17, p. 5706, 6 ago. 2012.

GALGANO, F. et al. Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1147–1152, 2009.

GARCÍA-VILLAR, N.; SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S. Capillary electrophoresis determination of biogenic amines by field-amplified sample stacking and in-capillary derivatization. **Electrophoresis**, v. 27, n. 2, p. 474–483, 1 jan. 2006.

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

GINTEROVÁ, P. et al. Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 904, p. 135–139, 2012.

GORDON, M. J. et al. Capillary electrophoresis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 242, n. 4876, p. 224–8, 14 out. 1988.

GUO, J. et al. A strategy to modulate the electrophoretic behavior in plastic microchips using sodium polystyrene sulfonate. **Journal of Chromatography A**, v. 1477, p. 132–140, 2016.

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

HE, L. et al. Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in beer analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 109–114, 2017.

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

ICH, H. T. G. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. Geneva, Switzerland: [s.n.].

JAIN, A.; VERMA, K. K. Strategies in liquid chromatographic methods for the analysis of biogenic amines without and with derivatization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 62–82, 2018.

JASTRZEBSKA, A.; PIASTA, A.; SZŁYK, E. Simultaneous determination of selected biogenic amines in alcoholic beverage samples by isotachopheretic and chromatographic methods. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 31, n. 1, p. 83–92, 2014.

JONES, W. R.; JANDIK, P. Controlled changes of selectivity in the separation of ions by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 546, p. 445–458, jan. 1991.

JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D. Capillary zone electrophoresis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 222, n. 4621, p. 266–72, 21 out. 1983.

KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. **Chemical Paper**, v. 59, n. 1, p. 70–79, 2005.

KIM, S. et al. PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1202-13, 4 jan. 2016.

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

LEAREY, J. J. et al. Detection of biogenic amines in pet food ingredients by RP-HPLC with automated dansyl chloride derivatization. **Journal of Separation Science**, 2 nov. 2018.

LEE, J. Y. et al. Reduction of biogenic amine contents in fermented soybean paste using food additives. **LWT**, v. 98, p. 470–476, 2018.

LINARES, D. M. et al. Biogenic Amines in Dairy Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, p. 691–703, ago. 2011.

LINARES, D. M. et al. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 180, 28 maio 2012.

MILHEIRO, J. et al. A simple dispersive solid phase extraction clean-up/concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatisation. **Food Chemistry**, v. 274, p. 110–117, 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. **Instrução normativa n° 1, de 15 de janeiro de 2019**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-publica-norma-para-peixe-salgado/copy7\\_of\\_IN1de15DEJANEIRODE2019RTIQPeixesalgadoesalgadoseco.pdf](http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-publica-norma-para-peixe-salgado/copy7_of_IN1de15DEJANEIRODE2019RTIQPeixesalgadoesalgadoseco.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2019.

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, abr. 2016.

MORAES, M. DE L. L. DE et al. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE): parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1041–1046, 2009.

NAILA, A. et al. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. R139–R150, 1 set. 2010.

NOWAK, P. M.; WÓ ZNIAKIEWICZ, M.; KO´SCIELNIAK, P. K. 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, 2018.

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

PAPAGEORGIOU, 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, 2018.

PETRUCI, J. F. D. S.; PEREIRA, E. A.; CARDOSO, A. A. Determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in caramel colors by capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 9, p. 2263–2267, 2013.

PINU, F. R. Early detection of food pathogens and food spoilage microorganisms: Application of metabolomics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 213–215, 2016.

PŁOTKA-WASYLKAM, J.; KŁODZIŃSKA, E.; NAMIEŚNIK, J. Determination of biogenic amines in wine using micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Research Analytica**, v. 3, n. 2, p. 62–66, 2017.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101–109, 2011.

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

RESTUCCIA, D. et al. A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 363–369, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.

27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

RIVOIRA, L. et al. Novel approaches for the determination of biogenic amines in food samples. **Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia**, v. 62, n. 3, p. 103–122, 2017.

RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis: Determination of biogenic amines in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1110, n. 1–2, p. 245–253, 2006.

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines and their importance in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213–231, 1996.

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

SILVA, C. M. G.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at  $4 \pm 1$  °C and in chicken-based meat products. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 241–248, 2002.

SWINNEY, K.; BORNHOP, D. J. Detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, n. 7, p. 1239–1250, 1 abr. 2000.

TAVARES, M. F. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1996.

TAVARES, M. F. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TERABE, S. et al. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 111–113, jan. 1984.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem**, v. 74, n. 5, p. 4–5, 2002.

TOLLEFSON, J. China declared world's largest producer of scientific articles. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 390–390, 18 jan. 2018.

UCAK, I. et al. Inhibitory effects of high pressure treatment on microbial growth and biogenic amine formation in marinated herring (*Clupea harengus*) inoculated with *Morganella psychrotolerans*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 50–56, 2018.

UZAŞCI, S.; BAŞKAN, S.; ERİM, F. B. Biogenic Amines in Wines and Pomegranate Molasses—A Non-Ionic Micellar Electrokinetic Chromatography Assay with Laser-Induced Fluorescence Detection. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 1, p. 104–108, 5 fev. 2012.

VALENTE, I. M. et al. Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 58–62, 2013.

WEINBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**. San Diego, CA: Academic Press, 2000.

XIAO, M.-W. et al. Rapid determination of gizzerosine in fish meals using microchip capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 34, n. 5, p. 760–765, 22 maio 2017.