



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

IAN SANTANA RESQUE

**Cromatografia líquida de alta eficiência, Extração líquido-
líquido e derivatização com DANSYL para quantificação de aminas
biogênicas em queijos**

Recife
2022

IAN SANTANA RESQUE

Cromatografia líquida de alta eficiência, Extração líquido-líquido e derivatização com DANSYL para quantificação de aminas biogênicas em queijos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Vagner Bezerra dos Santos

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecária Luiza de Oliveira, CRB4-1316

R429c Resque, Ian Santana

Cromatografia líquida de alta eficiência, Extração líquido-líquido e derivatização com DANSYL para quantificação de amins biogênicas em queijos / Ian Santana Resque. – 2022.
71 f.: il., tab.

Orientador: Vagner Bezerra dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química Fundamental, Recife, 2022.

Inclui referências. Inclui apêndice.

1. Amins biogênicas. 2. Histaminas. 3. Cloreto de dansila. 4. Extração líquido-líquido. 5. Queijos. 6. CLAE I. Santos, Vagner Bezerra (orientador). II. Título.

543

CDD (23. ed.)

UFPE - CCEN 2022-145

Ian Santana Resque

Cromatografia líquida de alta eficiência, Extração líquido-líquido e derivatização com DANSYL para quantificação de aminas biogênicas em queijos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Aprovado em: 19/01/2022

Banca examinadora

Prof. Vagner Bezerra dos Santos (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. José Licarion Pinto Segundo Neto

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho a resiliência.

AGRADECIMENTOS

Principalmente, à minha família pelo apoio e suporte para dar o pontapé inicial a esta jornada.

A meu amigo Paulo Cardoso, que acompanhou de longe a minha jornada, sempre com conversas descontraídas.

Aos colegas de laboratório: Claudiano, Lucas César, Diana, e Rodrigo pela companhia ao longo desta jornada e execução. Em especial, à Karla Beatriz que foi uma companheira no dia a dia, dentro e fora do laboratório.

Ao meu orientador pelo insistente trabalho para a conclusão desta dissertação.

Ao Departamento de Química Fundamental da UFPE e ao órgão de fomento à pesquisa CAPES, pela bolsa de mestrado, sem a qual seria impossível a conclusão deste trabalho.

RESUMO

As aminas biogênicas (ABs) são substâncias orgânicas nitrogenadas de baixo peso molecular com efeitos fisiológicos e atividades biológicas. Deste grupo, apenas o nível da histamina em alimentos (HIS) é controlado por órgãos reguladores, com níveis máximos permitidos de 50 mg Kg⁻¹ a 200 mg Kg⁻¹, como MAPA, FDA, EPA, EEA. A intoxicação por ingestão de HIS é chamada de Escombrototoxicose, entretanto, a presença de outras espécies aumenta a toxicidade da HIS, tais como cadaverina(CAD), putrescina (PUT) e tiramina (TYR). Para atender à legislação são necessários métodos para determinar HIS, ademais torna-se necessário, também, detectar a presença de outras ABs nos alimentos devido ao aumento da toxicidade. Nesse trabalho a cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para: avaliar ABs derivadas com DNS-Cl; avaliar a eficiência da extração líquido-líquido (LLE), microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e microextração líquido-líquido assistida por *Salting-out* (SALLE) das ABs derivadas; e determinar concentração das ABs em amostras de queijos. Com um detector de arranjo de diodos foi construída uma curva de calibração das ABS derivadas e extraídas por LLE no intervalo de concentração de 1 mg L⁻¹ (9 µM) a 100 mg L⁻¹ (720 µM), com limites de detecção 0,1 mg L⁻¹ (1 µM). O método foi empregado para analisar amostras de queijos, os níveis de HIS encontrados foram inferiores ao níveis estipulados pelas agências reguladoras, entretanto a concentração de HIS corresponde apenas ao intervalo de 7% a 26% do total das aminas biogênicas encontradas. A recuperação variou no intervalo de 69% a 122%.

Palavras-chave: aminas biogênicas; histamina; cloreto de dansila; extração líquido-líquido; queijos; CLAE.

ABSTRACT

Biogenic amines (ABs) are a group of low molecular weight nitrogenous organic substances with physiological effects and biological activities. Of this group, only the level of histamine in foods (HIS) is controlled by regulatory agency, with maximum levels allowed from 50 mg Kg⁻¹ to 200 mg Kg⁻¹, such as MAPA, FDA, EPA, EEA. Intoxication by ingesting HIS is called Scombrototoxicosis, other species increases HIS toxicity, such as cadaverine (CAD), putrescine (PUT) and tyramine (TYR). To respect the legislation, methods are needed to determine HIS, in addition it is also necessary to detect the presence of other ABs in food due to increased toxicity. In this work, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to: analyze ABs derived with DANSYL; to evaluate the efficiency of liquid-liquid extraction (LLE), dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and salting-out assisted liquid-liquid microextraction (SALLE) of the derived ABs; and determine the concentration of ABs in cheese samples. With a diode array detector, a calibration curve was constructed in the concentration range from 1 mg L⁻¹ (9 µM) to 100 mg L⁻¹ (720 µM), with detection limits of 0.1 mg L⁻¹ (1 µM). The method was used to analyze cheese samples the levels of HIS found were lower than the stipulated levels, however the concentration of HIS corresponded only to 7% to 26% of the total biogenic amines. The recovery ranged from 69% to 122%.

Keywords: biogenic amines; histamine; liquid-liquid extraction; DANSYL; HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico das áreas obtidas para cada amina biogênica com solventes organoclorados e organobromados para DLLME.....	24
Figura 2 - Esquema do método SPME desenvolvido por HUANG e colaboradores..	25
Figura 3 - Estrutura molecular dos cloreto de dansila (a), OPA (b) e IBCF (C).....	29
Figura 4 - Esquema reacional do DNS-Cl com o grupo amino primário (R1= grupo alquil, R2 = H), ou secundário (R1= grupo alquil, R2 = grupo alquil).....	30
Figura 5 - Áreas de pico de 3 ABs derivadas com DNS-Cl com simultânea extração SALLE em vários pH.....	31
Figura 6 - Reação global (a) e mecanismo de reação (b) do OPA com grupo amino primário (R = grupo alquil) e nucleófilo (:A).....	32
Figura 7 - Estrutura molécula (a), esquema de síntese (b) e mecanismo de reação com uma amina (c) do IBCF.....	33
Figura 8 - Modos de derivatização pré-coluna (A), em-coluna (B) e pós-coluna (C).	34
Figura 9 - Valor médio das áreas sob diferentes pH da solução (pH 9, pH 10, pH 11) das aminas biogênicas derivadas.....	53
Figura 10 - Cromatograma das ABs derivadas a 100 mg L ⁻¹ sem extração (STD), com extrações (LLE e SALLE).....	54
Figura 11 - Valor médio das áreas com extrações LLE e SALLE e sem extração (STD) das ABs derivadas a 100 mg L ⁻¹	55
Figura 12 - Valores médios das áreas com técnicas de extração modificadas (LLE e SALLE) e sem extração (STD) das ABs derivadas a 100 mg L ⁻¹	56
Figura 13 - Cromatograma das ABs derivadas com DNS-Cl (A). Curva de calibração para determinação das ABs derivadas com DNS-Cl (B).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Breve revisão da literatura sobre ABs, matrizes estudadas, reagentes derivatizantes e técnicas de detecção.....	36
Tabela 2 - Breve revisão de trabalhos na literatura para determinação de aminas biogênicas por CLAE, destacando amostra, eluentes, vazão, volume de injeção, coluna cromatográfica e detector.....	42
Tabela 3 - Eluição gradiente com Eluente A e B, respectivamente água e acetonitrila, para separação das ABs derivadas com DNS-Cl.....	50
Tabela 4 - Parâmetros analíticos da calibração do método análise por CLAE usando LLE. Resultados obtidos em 254 nm.....	59
Tabela 5 - Parâmetros analíticos da calibração do método análise por CLAE usando LLE. Resultados obtidos em 218 nm.....	59
Tabela 6 - Concentração de ABs em mg L ⁻¹ em amostras de queijo.....	60
Tabela 7 - Recuperação percentual das concentrações encontradas após adição de cada uma das ABs.....	61
Tabela 8 - Comparação com métodos cromatográficos para análises de ABs em queijos.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABs	Aminas Biogênicas
HIS	Histamina
TRP	Triptamina
CAD	Cadaverina
PUT	Putrescina
TYR	Tiramina
SPM	Espermina
SPD	Espermidina
SALLE	<i>Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction</i>
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
SLE	<i>Solid Liquid Extraction</i>
LPME	<i>Liquid Phase Microextraction</i>
SDME	<i>Single Drop Microextraction</i>
HF-LPME	Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EEA	<i>European Environment Agency</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
MSPD	<i>Matriz Solid Phase Dispersion</i>
DNS-Cl	5-(DimethylAmino) Naphthalene 1-Sulfonyl
OPA	<i>Phthalaldehyde</i>
IBCF	<i>Isobutyl Chloroformate</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	AMINAS BIOGÊNICAS EM ALIMENTOS.....	15
2.1.1	Origem das aminas biogênicas.....	15
2.1.2	Toxicidade das Aminas Biogênicas.....	16
2.2	PREPARO DE AMOSTRA DE ALIMENTOS.....	17
2.2.1	Extração das aminas.....	17
2.2.2	Extração sólido-líquido.....	17
2.2.3	Extração em fase sólida.....	18
2.2.4	Extração líquido-líquido.....	20
2.2.5	Avanços nas técnicas de extração.....	20
2.2.5.1	Microextração de fase líquida.....	21
2.2.5.2	Extração líquido-líquido com efeito <i>Salting-out</i>	21
2.2.5.3	Microextração líquido líquido dispersiva.....	22
2.2.5.4	Microextração em fase sólida.....	24
2.2.5.5	Dispersão de matriz em fase sólida.....	26
2.3	REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO.....	26
2.3.1	Aminas biogênicas derivadas.....	26
2.3.2	Meios de derivatização.....	27
2.3.3	Reagentes de derivatização.....	28
2.3.4	Modos de derivatização.....	33
2.3.5	Derivatização de ABs em amostras de alimentos.....	35
2.4	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	38
2.4.1	Fundamentos de cromatografia.....	38
2.4.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	39
2.4.3	Separação por CLAE.....	41
3	EXPERIMENTAL.....	47
3.1	REAGENTES.....	47

3.2	INSTRUMENTAÇÃO E SOFTWARES.....	47
3.3	AMOSTRA.....	48
3.4	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	48
3.5	PREPARO DOS PADRÕES.....	48
3.6	DERIVATIZAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS.....	49
3.7	EXTRAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS DERIVADAS.....	49
3.8	ANÁLISE DAS ABS POR CLAE.....	50
3.9	TRATAMENTO DE DADOS E ESTATÍSTICA.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	DERIVATIZAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS.....	52
4.1.1	Influência do pH.....	52
4.1.2	Métodos de extração das aminas biogênicas derivadas.....	53
4.1.3	Curva de calibração com padrão externo.....	57
4.1.4	Análise das amostras.....	60
5	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE A - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS DERIVADAS COM DNS-CL.....	71

1 INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas (ABs) são espécies orgânicas nitrogenadas de baixo peso molecular com efeitos fisiológicos e atividades biológicas (ÖNAL, 2007). Nos alimentos, as ABs podem existir naturalmente, como constituintes dos alimentos (via endógenas), ou podem surgir por processos de deterioração, pela ação de microrganismos (via exógenas). Esses microrganismos possuem enzimas amino descarboxilases, as quais retiram o grupo carboxila dos aminoácidos e formam as ABs. Portanto, o aumento das ABs em alimentos está relacionado à proliferação de microrganismos e avanço da deterioração dos alimentos (BULUSHI, 2009).

A ingestão de altos níveis de ABs pode causar uma série de complicações na saúde, como: febre, diarreias, enxaquecas, ataques cardíacos (EFSA, 2011), por isso os níveis de ABs em alimentos precisam ser regulados por agências de vigilâncias sanitárias. Porém, o nível tóxico de ingestão das ABs que cada indivíduo pode consumir varia muito, pois a digestão das ABs ocorre com enzimas de monoamino oxidase, diamino oxidase e poliamino oxidase que variam de indivíduo para indivíduo. Além disso, as ABs na presença de nitrito, formam as nitrosaminas, as quais são potencialmente carcinogênicas (Önal, 2007).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina um conteúdo de histamina (HIS) nos alimentos inferior a 100 mg Kg^{-1} (MAPA, 1997). No Estados Unidos da América (EUA), a *Food and Drug Administration* e *Environmental Protection Agency* determinam uma concentração máxima de 50 mg Kg^{-1} de HIS em alimentos (FDA, 2005). A *European Environment Agency* determina um máximo de 200 mg Kg^{-1} HIS em peixes que possuem um alto teor de histidina (EEA, 2013).

Os níveis de cadaverina (CAD), histamina (HIS), putrescina (PUT) e tiramina (TYR) foram monitorados durante o armazenamento de peixe na faixa de temperatura de 8°C a 10°C (YAMANAKA e colaboradores (1989) apud BULUSHI, 2009). O aumento das ABs ocorreu em paralelo com o progresso da decomposição. Além disso, sob o armazenamento de peixes em gelo (0°C), outros autores constataram que os níveis CAD aumentaram, mas os de HIS e TYR não alteraram

significativamente (RUIZ-CAPILLAS e MORAL, 2001; ROSSI e colaboradores, 2002; PONS-SANCHEZ-CASCADO e colaboradores, 2006, apud Bulushi, 2009). Portanto, apenas a HIS de forma isolada não fornece um bom parâmetro para avaliar o grau de deterioração, ou conseqüentemente, de qualidade em alimentos, sendo assim, necessário o desenvolvimento de um método analítico mais completo, envolvendo uma maior variabilidade de ABs em alimentos.

As propriedades físicas e químicas das ABs dificultam a detecção por técnicas de espectrofotometria molecular no ultravioleta e visível (Uv-Vis) e fluorescência (JAIN; GUPTA; VERMA, 2015), pois falta um grupo cromóforo/fluoróforo. Desta forma, uma etapa de derivatização é requerida, etapa à qual um reagente derivatizante e as ABs reagem e formam um produto sensível às técnicas de detecção.

Os queijos artesanais, como queijo de coalho e queijo de manteiga, são muito consumidos na região nordeste (SIQUEIRA & SCHTTINO, 2021). Para estes produtos são necessários métodos analíticos que forneçam resultados confiáveis, para evitar o casos de intoxicação alimentar pela falta de um controle de qualidade. Este trabalho tem por objetivo desenvolver um método analítico capaz de determinar os níveis de ABs em amostras de queijos. Este método emprega procedimentos de extração, reação de derivatização com posterior separação cromatográfica e detecção espectrofotométrica Uv-Vis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AMINAS BIOGÊNICAS EM ALIMENTOS

As ABs são compostos com estruturas alifática (espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), cíclica (histamina) ou aromática (tiramina, triptamina) que podem ser encontradas em muitos alimentos naturalmente em baixas concentrações. De fato, as poliaminas, como putrescina, espermina, espermidina e cadaverina, estão naturalmente presentes em alimentos, envolvidas com o crescimento e a proliferação celular (GOMES e colaboradores, 2014).

As altas concentrações das ABs, são originadas pela ação das enzimas descarboxilases sob os aminoácidos livres. Em alimentos não fermentados as ABs são encontradas em baixas concentrações (via endógena), contudo altas concentrações das ABs indicam a contaminação por microrganismos com atividade de enzimas de aminoácidos descarboxilase (via exógena). Da mesma forma, os alimentos fermentados apresentam concentrações maiores de ABs pela presença dos microrganismos de fermentação, ou a contaminação durante a manipulação inadequada dos alimentos (Processamento, transporte, armazenamento, etc). Portanto, o teor das ABs é também considerado um marcador para contaminação microbiológica, conseqüentemente, de deterioração dos alimentos (ÖNAL, 2007).

As ABs possuem efeitos fisiológicos e tóxicos, algumas têm ação vasoconstritora (tiramina, triptamina e feniletilamina), enquanto outras são vasodilatadoras (histamina e serotonina). Entretanto, a tiramina e a histamina atuam como mediadores hormonais nos animais. Algumas aminas são neurotransmissores no sistema nervoso central, são psicoativas, como a serotonina e dopamina (ÖNAL, 2007). Além disso, as poliaminas podem reagir com nitrito para formar nitrosaminas carcinogênicas, substâncias com alta toxicidade (GOMES e colaboradores, 2014). A ingestão de alimentos com concentrações elevadas de ABs podem causar sintomas como dores de cabeça, náuseas, hipo- e hipertensão, palpitações cardíacas, choque anafiláticos, em casos mais graves pode levar à morte (ÖNAL, 2007).

2.1.1 Origem das aminas biogênicas

As aminas biogênicas exógenas são geradas com processo de descarboxilação dos aminoácidos pela atividade de enzimas descarboxilases,

presentes tanto pela deterioração microbiológica quanto em processos de fermentação (ou seja, bactérias lácticas de ocorrência natural, ou adicionadas, envolvidas na fermentação dos alimentos) (RESTUCCIA; LOIZZO; SPIZZIRRI, 2018).

Os principais microrganismos formadores de histaminas são as bactérias mesófilas, organismos que crescem melhor em temperaturas moderadas, na faixa de 20°C a 40°C, tais como as espécies *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis* que verificou-se produzirem rapidamente histamina em temperatura ambiente (BULUSHI e colaboradores, 2009). Em contrapartida, sob o armazenamento em gelo, há evidências que apenas o nível de cadaverina aumenta, enquanto o nível de histamina permanece estável (BULUSHI e colaboradores, 2009).

As ABs podem ser classificadas como monoaminas, diaminas e poliaminas. As mais comuns ABs: monoaminas são histamina, tiramina e triptamina formadas pela descarboxilação da histidina, tirosina e triptofano, respectivamente; as diaminas são putrescina e cadaverina formadas pela descarboxilação da ornitina e lisina, respectivamente; e as poliaminas são espermidina e espermina, as quais são formadas pela adição sequencial de frações de aminopropil ao esqueleto da putrescina por meio da reação enzimática catalisada pela espermidina e espermina/termoespermina sintase (PÁL; SZALAI; JANDA, 2015).

2.1.2 Toxicidade das Aminas Biogênicas

Uma intoxicação alimentar comum é causada pela ingestão de histamina proveniente, principalmente, de alimentos associados a um elevado teor de histidina. Trata-se de uma monoamina biogênica primária e heterocíclica, não volátil, termoestável. O perigo da histamina em alimentos é intensificado pela sua característica de não volatilidade e estabilidade térmica, pois a temperatura de ebulição é acima de 100°C (442°C). Ou seja, uma vez formada, a histamina pode estar presente no pescado cru, cozido, congelado e até mesmo em conservas, sendo assim, quando em concentrações elevadas, pode causar severos danos à saúde (BALDINI, 1982 apud SOUZA e colaboradores, 2015).

A contaminação histamínica é particularmente difícil de ser removida, uma vez que resiste ao tratamento térmico, podendo estar presente mesmo no produto comercialmente estéril (VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU,

1997). A intoxicação histamínica recebe o nome de escombrototoxicose, sendo que os sinais e sintomas ocorrem de vários minutos a algumas horas após a ingestão da amina. Autores relatam que a atividade tóxica histamínica é potencializada pela presença de outras aminas biogênicas, como a tiramina, a cadaverina e a putrescina, que são produzidas concomitantemente à histamina (TAYLOR, 1986 apud SOUZA e colaboradores, 2015; BJELDANES e colaboradores, 1978 apud BULUSHI e colaboradores, 2009).

A histamina (HIS) é a única das ABs que é regulamentada pela maior parte das agências sanitárias, com limite de tolerância que variam de 200 a 50 mg kg⁻¹ (MAPA, 1997; FDA, 2005; EEA, 2013). Contudo, BJELDANES e colaboradores (1978, apud BULUSHI e colaboradores, 2009) testaram um grupo de 5 a 10 porco da índia (*Cavia porcellus*) ingerindo um volume de 20 mL kg⁻¹ de solução com 150 mg L⁻¹ de HIS e 50 mg L⁻¹ de cadaverina (CAD). Um terço (33%) dos animais morreram, enquanto não houve óbitos no grupo controle que ingeriram a solução apenas com 150 ppm de HIS. Esses resultados foram reforçados por MIDDLEBROOKS e colaboradores (1988 apud BULUSHI e colaboradores, 2009), com um aumento na dose de CAD para 75 ppm em relação ao trabalho anterior, como resultado a taxa de mortalidade foi 84%. Portanto, HIS e CAD, ou PUT, são potencialmente mais tóxicos quando consumidos em conjunto.

2.2 PREPARO DE AMOSTRA DE ALIMENTOS

2.2.1 Extração das aminas

As ABs são encontradas em diferentes tipos de matrizes de amostras de alimentos, essas matrizes possuem espécies interferentes sinérgicas ou antagônicas que, respectivamente, aumentam ou diminuem a resposta analítica (HARRIS, 2016). Por isso, técnicas de extração são empregadas para eliminar, ou diminuir, a interferência da matriz da amostra. As técnicas de extração podem ser organizadas conforme a escala e princípio utilizado. Muitas vezes essas técnicas são utilizadas em conjunto para melhorar a extração dos analitos (HUANG e colaboradores, 2016).

2.2.2 Extração sólido-líquido

Extração sólido-líquido (SLE, *Solid-Liquid Extraction*) é a mais conhecida, usa uma fase líquida para extrair os analitos de amostras sólidas. Para aumentar a

eficiência da extração aumenta-se a área superficial, através de uma etapa de pulverização, moagem, trituração e homogeneização da amostra. A escolha do solvente deve ser baseada na solubilidade e afinidade do analito. Sobretudo, para aminas biogênicas dá-se preferência por um solvente ácido, pois explora-se a característica básica das aminas (JUBELE, 2018), tais como: ácido clorídrico (HCl), ácido tricloroacético (TCA, *trichloroacetic acid*) ou ácido perclórico (HClO₄).

Os procedimentos de SLE são laboriosos e consomem tempo de alguns minutos até horas, pois, geralmente, os passos são triturar a amostra e misturar com o solvente extrator. Então, a mistura é centrifugada (ou filtrada) e o sobrenadante é reservado e repete-se algumas vezes a extração com o resíduo. As frações do sobrenadante são reunidas, o solvente evaporado e o resíduo é solubilizado no solvente adequado para a análise.

Um procedimento simplificado foi utilizado por JIA e colaboradores (2011) para a determinação de 7 ABs em alimentos (Queijos, salsichas e cervejas). As amostras sólidas foram trituradas, para aumentar a área superficial, e misturadas com solução ácida (HCl 0,1 mol L⁻¹), para deixar as ABs protonadas e mais polares (com carga formal positiva, $H^+ + RNH_2 \rightarrow RNH_3^+$). A extração foi auxiliada por um banho de ultrassom durante 30 minutos, depois, a mistura foi centrifugada. A recuperação obtida foi com range de 80% - 120%.

ZAZZU e colaboradores (2019) determinaram 8 ABs em queijos do tipo Fiore Sardo (Queijo duro de leite de ovelha coalhado). A amostra foi homogeneizada com 20 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ e centrifugada (1780 G) durante 20 minutos a 4°C, para ocorrer a precipitação dos lipídios. O sobrenadante foi coletado e filtrado, o resíduo foi novamente extraído, e os sobrenadantes combinados e aferidos a 50 mL com HCl 0,1 mol L⁻¹. O percentual de recuperação dos analitos nesta matriz variou de 82% a 99%.

2.2.3 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) realiza a extração dos analitos em uma fase (ou substrato) sólida, possibilitando assim uma limpeza e/ou remoção de interferentes. A SPE é uma técnica onde os analitos são extraídos por um adsorvente extrator a partir de uma solução da amostra, então os analitos são liberados do sólido extrator em outro solvente. A SPE tem várias vantagens em

relação a LLE, sendo a redução do volume de solventes e resíduos gerados os principais. Os procedimentos de SPE são da ordem de minutos na execução e possuem elevadas recuperações de analito.

Na extração das aminas biogênicas em amostras de alimentos a SPE é especialmente vantajosa para remover os polifenóis e outros interferentes orgânicos polares. Os adsorventes são, geralmente, baseados em sílica quimicamente ligada, como a sílica com C18 (sílica ligada covalentemente a uma cadeia linear contendo 18 átomos de carbono). Para realizar a dessorção das aminas ABs uma solução ácida é utilizada, pois as aminas possuem uma natureza básica (JUBELE, 2018).

TAMEEM e colaboradores (2010) desenvolveram um adsorvente com uma hidrazona ligada à sílica gel para SPE. No trabalho determinaram-se 7 ABs (HIS; PUT; CAD; TRP; TYR; PHE; SPD) em amostras de ketchup, molho de soja, sucos de laranja e molho de peixe. Primeiramente, as amostras foram homogeneizadas com solução ácida de HCl 0,1 mol L⁻¹ por 5 minutos, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante filtrado. O pH do meio foi ajustado com tampão (solução de tris(hidroximetil)aminometano 0,1 mol L⁻¹) para 9, depois, foi adicionado o adsorvente à mistura com agitação por 25 minutos. A mistura foi filtrada, do material retido (adsorvente com os analitos) as ABs foram extraídas com uma solução ácida de HCl 0,1 mol L⁻¹ durante 30 minutos. Os valores de recuperação foram de 67% a 98%.

Utilizando um cartucho SPE comercial STRATA X, SANGRATINI e colaboradores (2012) realizaram a determinação de 8 ABs (HIS; PUT; CAD; TRP; TYR; PHE; SPD; SPM) em peixes obtidos na cidade de Valência (Espanha). As amostras foram trituradas até virar uma pasta homogênea. Uma mistura com 5 g de amostra e 20 mL da solução de TCA 5% (5g/100mL) foi preparada e agitada durante 1 minuto. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2500G, resfriada a 4°C, durante 10 minutos, para remoção dos sólidos. O sobrenadante foi separado e teve o pH corrigido para 11 com adição de solução de NH₄OH 28%. O cartucho de SPE foi condicionado, usando um sistema de vácuo, com 4 mL de metanol, seguido por 4 mL de água. Após o condicionamento do cartucho, 2 mL da solução sobrenadante percorreram o cartucho com vazão de 1 mL min⁻¹. Então, este cartucho foi lavado com 2 mL de solução de metanol/água (5:95, v/v). Para remover o excesso de água, o cartucho foi seco a vácuo por 5 minutos. Os analitos foram eluídos com 4

mL de uma solução de metanol e ácido acético (99:1, v/v). A solução resultante foi seca sob fluxo de N_2 e o resíduo solubilizado em solução de HCl 0,1 mol L^{-1} . A recuperação das ABs foi de 71% - 93%, resultado próximo ao reportado por TAMEEM e colaboradores (2010).

2.2.4 Extração líquido-líquido

A técnica de extração líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) é utilizada quando os analitos estão em meio aquoso, como a amostra dissolvida em uma solução, e usa-se um extrator líquido. Para a LLE ter sucesso, o analito deve ter maior afinidade pelo solvente extrator que a solução da matriz e o extrator ser imiscível ao líquido da matriz da amostra, para gerar a separação de fases. Geralmente, em LLE utiliza-se centenas de mililitros de solventes, os quais geram muito resíduo e impactos ambientais. Os procedimentos LLE são lentos e laboriosos, pois a formação de emulsões dificulta a extração, e resulta em baixas recuperações dos analitos.

Nessa técnica, a amostra pode ser líquida ou sólida, mas estas precisam ser preparadas e os analitos estarem em solução. No trabalho de VALE & GLÓRIA (1997), primeiramente o queijo foi ralado e misturado para melhor extração das ABs, depois 10 g de amostra e 20 mL de solução HCl 0,1 mol L^{-1} foram misturados por 5 minutos em Vortex. Então, a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 6000G em temperatura ambiente, e o sobrenadante coletado. O resíduo foi submetido à extração com 20 mL de solução HCl 0,1 mol L^{-1} mais duas vezes e seus sobrenadantes coletados foram combinados. Uma vez que os analitos da amostra foram extraídos para a fase líquida, a solução da amostra foi combinada com três porções de 50 mL de éter etílico, para extrair os analitos para a fase orgânica. Com a fase orgânica separada, o solvente foi evaporado com pressão reduzida em temperatura de 40°C por um rota-evaporador para um volume final de 2 a 3 mL. Por fim, essa solução foi diluída para 10 mL com HCl 0,1 mol L^{-1} e filtrado com filtro de seringa. A recuperação, obtida por esse método variou de 75% a 112%.

2.2.5 Avanços nas técnicas de extração

As novas técnicas de extração procuram otimizar as já existentes, como a miniaturização, simplificação, automação, entre outras melhorias em geral, e alinhar

essas técnicas aos princípios da química verde, como redução do uso de solventes tóxicos, baixo volume de resíduos, maiores eficiências energéticas, etc (LENARDÃO e colaboradores, 2003). Essas técnicas buscam um desenvolvimento ecológico, econômico e rápido sem comprometer a eficiência de recuperação e alta seletividade. Nesse sentido, ANASTASSIADES & LEHOTAY (2003) desenvolveram o método QUECHERS, uma abreviação das palavras “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*” (rápido, fácil, barato, eficiente, robusto, e seguro). Os objetivos dessa técnica são a extração dos analitos, sem a necessidade de equipamentos elaborados ou vidrarias específicas, e com uma baixa produção de resíduos. Com isso, é possível a detecção, quantificação dos analitos, além de uma alta eficiência de recuperação e exatidão.

2.2.5.1 Microextração de fase líquida

A microextração de fase líquida (LPME, *Liquid Phase Microextraction*) é uma variante moderna do método de LLE miniaturizado, pois a LPME requer o uso de um volume de solvente inferior a 1000 μL . Na LPME existem divisões promissoras que empregam diferentes princípios em suas técnicas, por exemplo a microextração em uma única gota (SDME, *Single Drop Microextraction*), microextração em fibra oca (HF-LPME, *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*) e a extração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid extraction*) (JUBELE, 2018).

2.2.5.2 Extração líquido-líquido com efeito *Salting-out*

A técnica de extração líquido-líquido com efeito *salting-out* (SALLE, *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*) é uma técnica LLE aprimorada. Na LLE tradicionalmente, com a solução da amostra aquosa faz-se uso de solventes apolares, pois utilizam-se apenas solventes imiscíveis em água, dessa forma é baixa a eficiência da extração dos compostos polares. Em SALLE usam-se solventes polares miscíveis em água, pois os compostos polares têm maior afinidade. Na solução de amostra e solvente extrator é adicionado um sal inorgânico solúvel em água. Com o aumento do caráter iônico da água ocorre a separação da fase aquosa e da fase com solvente extrator, o qual extraiu os analitos. Desta forma, os analitos com baixa polaridade são solubilizados no solvente extrator de baixa polaridade e extraídos do meio aquoso.

Um trabalho dedicado ao estudo de SALLE (VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013) avaliou o uso de três solventes orgânicos miscíveis em água (etanol, isopropanol e acetonitrila) e seus volumes, diferentes sais para aumentar a força iônica (cloretos, carbonatos, sulfatos e acetatos) e concentrações. Os estudos foram conduzidos com alfa-dicarbonil, como um analito teste para avaliar a técnica de extração. Os resultados foram avaliados pela eficiência de extração e a razão das fases ($E = Q_{\text{sup}}/Q_{\text{inf}}$ e $R = V_{\text{sup}}/V_{\text{inf}}$, respectivamente. Onde Q é a massa do analito, V é o volume da fase e os índices SUP e INF correspondem a fase superior e inferior, respectivamente). Os melhores resultados foram obtidos com o uso de acetonitrila, como solvente extrator, e os sais de MgSO_4 , Na_2CO_3 e NaCl , como agentes separadores de fase, com valores de E e R no intervalo de 0,90 a 0,98 e 1,0 a 1,2, respectivamente.

2.2.5.3 Microextração líquido-líquido dispersiva

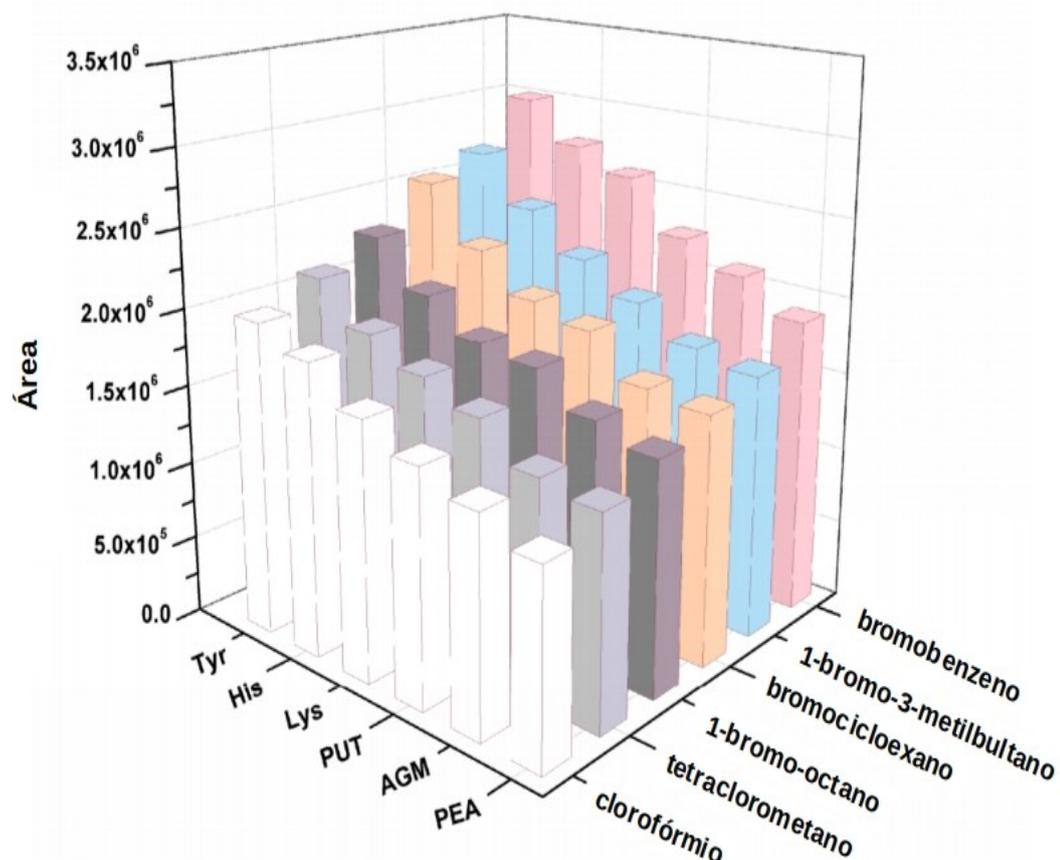
A extração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) é uma técnica criada nas últimas décadas por RAZAEE e colaboradores (2006). A DLLME baseia-se na miniaturização de LLE pela utilização de um solvente extrator e um dispersante. Esta mistura de solventes tem de criar várias microgotas, com elevada área superficial, para atingir de maneira mais rápida a saturação do analito no solvente extrator. Os solventes extrator e dispersante são adicionados na solução aquosa da amostra, então a solução turva à medida que as gotas dispersam-se. Por fim, realiza-se a centrifugação da mistura a fim de separar as fases e retirar a fase extratora com os analitos (HE e colaboradores, 2016).

Um estudo desenvolvido por PLOTKA-WASYLKA; SIMEONV; NAMIEŚNIK (2016) avaliou a extração de ABs com técnica DLLME utilizando solventes extratores com baixa e alta densidade em relação a água, sob condições ácidas e básicas. Dois procedimentos foram desenvolvidos, um com solventes extrator de baixa densidade (Tolueno, densidade: $0,87 \text{ g mL}^{-1}$) com meio básico (Tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 12) e outro com solvente extrator de alta densidade (Clorofórmio, densidade: $1,48 \text{ g mL}^{-1}$) em meio ácido ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Além disso, avaliou-se o volume utilizado de solvente extrator pelo fator de pré-concentração ($\text{FPE} = \text{Recuperação}\% \times (V_{\text{AQ}}/V_{\text{EXT}}) / 100$, onde V_{AQ} é o volume aquoso e V_{EXT} é o volume do

solvente extrator). O FE foi maior quanto menor o volume de solvente extrator, mas tem-se problema com reprodutibilidade, pois a recuperação do volume de extrator é impraticável para volumes inferiores a 100 μL . Entre os dois procedimentos desenvolvidos, a extração com clorofórmio em meio ácido obteve maior sensibilidade e uma recuperação de 77% a 105%. O procedimento: em tubos de centrífuga foram adicionados 5 mL da solução da amostra, 215 μL de metanol, 115 μL de solução (1:1, v/v) de HCl 0,1 mol L^{-1} /piridina (pois a piridina ajuda a eliminar os co-produtos de derivatização), 400 μL clorofórmio e 90 μL de cloroformiato de isobutila (**IBCF**, *Isobutyl Chloroformate*). Então agita-se durante 1 minutos para a solução ficar turva, por fim a mistura é centrifugada e a fase orgânica inferior é retirada para análise. Foram avaliados 10 ABs (Butilamina, CAD, dietilamina, dimetilamina, etilamina, HIS, metilamina, propilamina, PUT, SPM, TRP, TYR, feniletilamina) em vinhos caseiros de diferentes produtores.

Em outro trabalho, HE e colaboradores (2016) avaliaram a utilização de solventes extratores de menor potencial tóxico com uma eficiência similar, ou superior, dos solventes organoclorados. Extrações com solventes organoclorados (clorofórmio e tetraclorometano) foram comparadas as extrações com solventes organobromados (1-bromoctano, bromociclohexano, 1-bromo-3-metilbutano e bromobenzeno). As áreas dos cromatogramas obtidas com os solventes organobromados foram até 50% maiores que os solventes organoclorados, Figura 1. As amostras sólidas foram preparadas com solução ácida (HCl 0,1 mol L^{-1}) durante 30 minutos em banho de ultrassom, depois a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi utilizado na DLLME. A solução da amostra foi misturada com tampão básico (NaHCO_3 - Na_2CO_3 saturado), juntamente com 200 μL do solvente dispersante (ACN) e 90 μL de solvente extrator (bromobenzeno). A solução foi agitada manualmente por 10 segundos até ficar turva e permaneceu em banho de ultrassom durante 1 minuto, depois foi centrifugada e a fase inferior foi coletada para análise. Foram determinadas 8 ABs (HIS, TYR, feniletilamina, TRP, CAD, PUT, SPM, SPD) em amostras de vinhos, cervejas, queijos, salsichas e peixes. A DLLME teve uma recuperação de 83% a 114%.

Figura 1 - Gráfico das áreas obtidas para cada amina biogênica com solventes organoclorados e organobromados para DLLME.



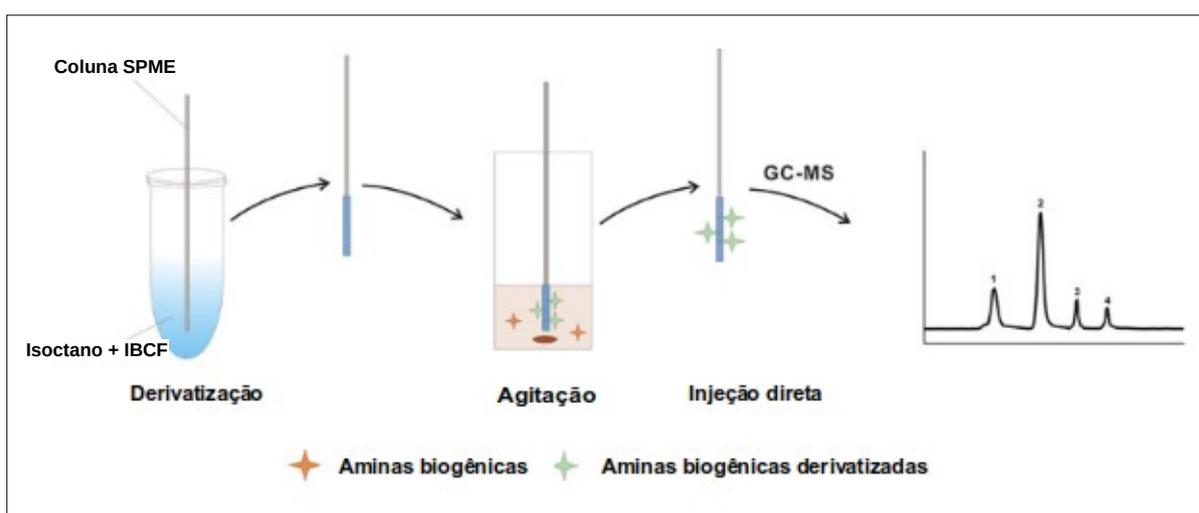
Fonte: He e colaboradores (2016).

2.2.5.4 Microextração em fase sólida

Microextração em fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) consiste em utilizar um adsorvente, usualmente uma fibra revestida de adsorvente, diretamente na solução da amostra, ou a captura dos vapores da amostra (*Headspace*). Os analitos ligam-se ao adsorvente e são liberados apenas pelo aquecimento do adsorvente. As principais vantagens dessa técnica são a ausência de solventes e a dessorção simples e efetiva (JUBELE, 2018). Como desvantagens, esta técnica possui um faixa limite de temperatura de operação (240°C a 280°C), quebra da fibra, custo elevado, remoção de revestimento e dilatação dos adsorventes em solventes orgânicos (HUANG e colaboradores, 2016).

Para desenvolver um método simples, ecológico e rápido, HUANG e colaboradores (2016) empregaram um método de derivatização em fibra com direta imersão em SPME para determinar 4 ABs (PUT, CAD, HIS, TYR) em peixes. Empregou-se uma extração mista entre SPME e DLLME, onde utilizou-se uma espécie adsorvente (uma fibra comercial de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno, PDMS/DVB) recoberta com solvente extrator (isooctano) e agente derivatizante (IBCF). A fibra de PDMS/DVB foi recoberta com mergulho em solução do agente derivatizante (IBCF) solubilizado em isooctano, solvente extrator. A amostra foi preparada pela mistura com 30 mL de solução ácida (TCA 5%, m/v), depois centrifugada, a 12000 rpm durante 10 minutos, filtrada, e, por fim, adicionou-se 30 mL de n-hexano para extração dos lipídios. A SPME foi realizada com o sobrenadante aquoso, 5 mL solução da amostra foi neutralizada com 255 μL de NaOH 2,0 mol L⁻¹, e teve a força iônica elevada pela adição de 1,25 g de NaCl. Então, nesta solução mergulhou-se a fibra revestida, durante 40 minutos sob agitação (Figura 2). Depois, a fibra foi injetada diretamente no GC-MS para análise. O método desenvolvido obteve uma recuperação de 79% a 110%. As principais vantagens foram procedimentos simples, rápidos, ademais à fibra pode ser utilizada 80 vezes com bons resultados.

Figura 2 - Esquema do método SPME desenvolvido por HUANG e colaboradores.



Fonte: Adaptado de HUANG e colaboradores (2016)

2.2.5.5 Dispersão de matriz em fase sólida

A dispersão de matriz em fase sólida (**MSPD**, *Matriz Solid Phase Dispersion*) consiste na homogeneização da matriz por maceração com um material abrasivo seguido dos procedimentos de SLE. Esse passo de homogeneização facilita a abertura da matriz e permite a recuperação dos analitos pelos solventes. MSPD é conhecido por ser uma técnica de preparo simples (JUBELE, 2018).

A técnica foi aplicada para determinar 8 ABs (CAD, Arginina, HIS, PHE, PUT, TRYP e TYR) em atum enlatado (SELF; WU; MARKS, 2011). As amostras foram homogeneizadas em almofariz com o abrasivo adsorvente de sílica-cianopropil (bondesil CN-U 49 μm) até o surgimento da cor alaranjada, depois o pó foi transferido para o tubo de extração e os analitos eluídos com solução tampão (formiato de amônio/acetato de amônio 50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 3$). A solução resultante foi diluída com acetonitrila, filtrada e analisada. Com esse procedimento simples e a recuperação ficou em torno de 83,4% a 112,5%, além disso, houve uma geração mínima de resíduos (25 mL).

2.3 REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO

Alguns analitos não possuem resposta, ou pequena resposta, com os detectores empregados, por isto nenhum sinal analítico é observado, ou não são intensos. Então, introduz-se uma molécula (reagente de derivatização, ou derivatizante) ao analito, pela reação chamada de derivatização, para formar um produto com propriedades diferentes, as quais incluem uma forte resposta com os detectores (absorção, fluorescência, etc). Os produtos dessas reações serão chamados de derivados e terão maior resposta com o detector, possibilitando um método mais sensível. Neste caso, o derivado terá interação intermoleculares e polaridade diferente a do analito, as quais contribuirão para o método de separação por aumentar/diminuir a retenção e separar os analitos (PLOTKA-WASYLKA e colaboradores, 2015).

2.3.1 Aminas biogênicas derivadas

As ABs não possuem fatores estruturais favoráveis para separação por CLAE e detecção com espectrofotometria molecular de absorção/ou emissão,

eletroquímica, ou mesmo, por espectrometria de massas (PLOTKA-WASYLKA e colaboradores, 2015). Além disso, as características básicas causam interações com os grupos silanois livres do adsorventes nas colunas de separação, resultando em separações com sobreposição de espécies. Ou seja, na incapacidade de separação das ABs (JUBELE, 2018).

As ABs são derivatizadas com o objetivo de: introduzir uma molécula para melhorar as detecções por absorção molecular no ultravioleta e visível, emissão de fluorescência, etc; também melhorar a separação cromatográfica. Assim como os derivados evitam a interação com os grupos silanois livres da coluna cromatográfica. Portanto, a derivatização das ABs aumenta a seletividade, sensibilidade e separação nos métodos analíticos (JUBELE, 2018).

2.3.2 Meios de derivatização

As reações de derivatização são realizadas tanto em meio aquoso como não aquoso. Dessa forma, as amins podem ser derivatizadas antes, ou depois, da extração com um solvente orgânico. A derivatização das ABs na fase aquosa da matriz é a mais empregada, porém possui como inconveniente o longo tempo reacional e a baixa reprodutibilidade.

RAMOS e colaboradores (2014) avaliaram três procedimentos diferentes de derivatização de 3 ABs (CAD, HIS, SPD). A derivatização realizada com cloreto de dansila (DNS-Cl) foi realizada antes, durante e após o procedimento de SALLE, o qual faz a separação das fases aquosa e orgânica pela adição de NaCl. Os sinais de área foram de 2 vezes maiores pelo uso do solvente binário de água/acetonitrila durante a reação com DNS-Cl, e posterior separação com sal. Ou seja, dentre os procedimentos estudados, a reação de derivatização durante o procedimento SALLE possui maior sensibilidade (RAMOS e colaboradores, 2014).

Os reagentes derivatizantes reagem com água, pois é uma base de Lewis, por isso apresentam resultados com maior instabilidade. O IBCF reage na presença de solventes com características de base de Lewis. Por esse motivo, D'SOUZA e colaboradores (2011), conduziram a reação em meio orgânico. A derivatização das ABs em amostras de peixes foi realizada com SPME (fibra de **PDMS/DVB**) recoberta de isoctano e derivatizante, o qual utilizou IBCF. A recuperação obtida foi de 79% a

110%.

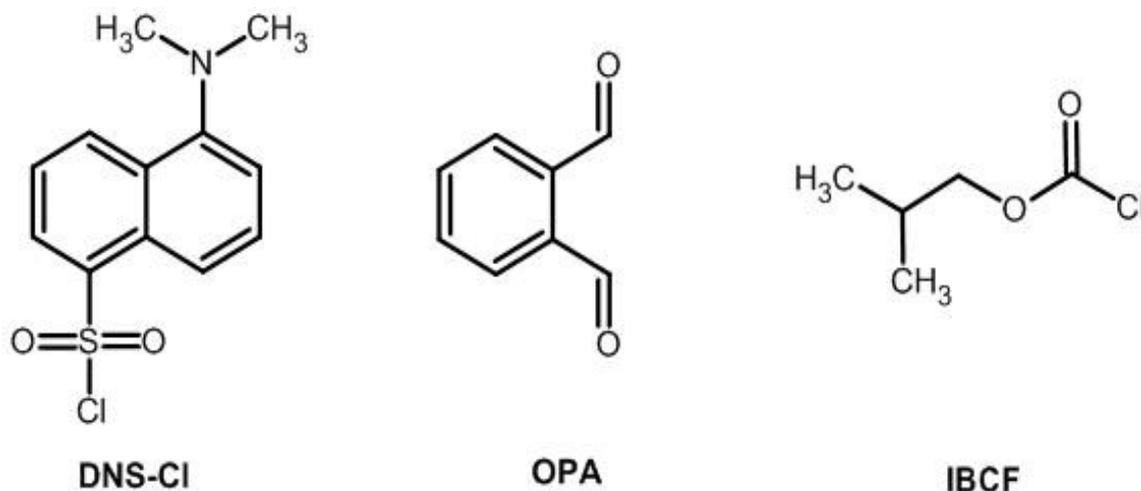
2.3.3 Reagentes de derivatização

Os reagentes de derivatização são escolhidos conforme muitos fatores, como método de análise, características das ABs de interesse e modo de derivatização. Existem dois modos de derivatização predominantes, em linha (*on-line*) e fora de linha (*off-line*), ou seja, um processo onde a derivatização ocorre, respectivamente, durante a separação cromatográfica ou fora deste procedimento (PLOTKA-WASYLKA e colaboradores, 2015). Para o modo *on-line*, a reação do agente derivatizante precisa ser rápida sob as condições de separação. Enquanto que o modo de *off-line*, o meio da reação possui condições mais severas em comparação com as de separação, como temperatura, meios ácidos ou básicos, solvente polares ou apolares, etc.

Os reagentes de derivatização têm como alvo o grupo amino. Dessa forma, as reações mais utilizadas para derivatização foram classificadas como quatro (4) tipos no trabalho de revisão de PLOTKA-WASYLKA e colaboradores (2015). São elas as reações: de acilação, onde um hidrogênio do grupo amina é substituído por um grupo acila, e as condições de reação são amenas, contudo geralmente ocorrem na presença de bases para catalisar e neutralizar os ácidos produzidos; de formação de carbamato, onde um hidrogênio é substituído pela reação com haleto formiato e, assim, um carbamato é formado em meio alcalino; de base de Schiff, onde a amina primária reage com o grupo aldeído/cetona do reagente e forma uma imina, esta reação ocorre em solução aquosa em temperatura ambiente; e de sililação, onde o hidrogênio da amina é substituída por um grupo alquilsilil, com reações de derivatização mais eficiente em condições anidras.

Para as aminas biogênicas os reagentes de derivatização mais utilizados são o DNS-Cl e Orto-ftalaldeído (OPA) para as análises em CLAE, e o IBCF para análise de GC. Suas estruturas moleculares são mostradas na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura molecular dos cloreto de dansila (a), OPA (b) e IBCF (c).

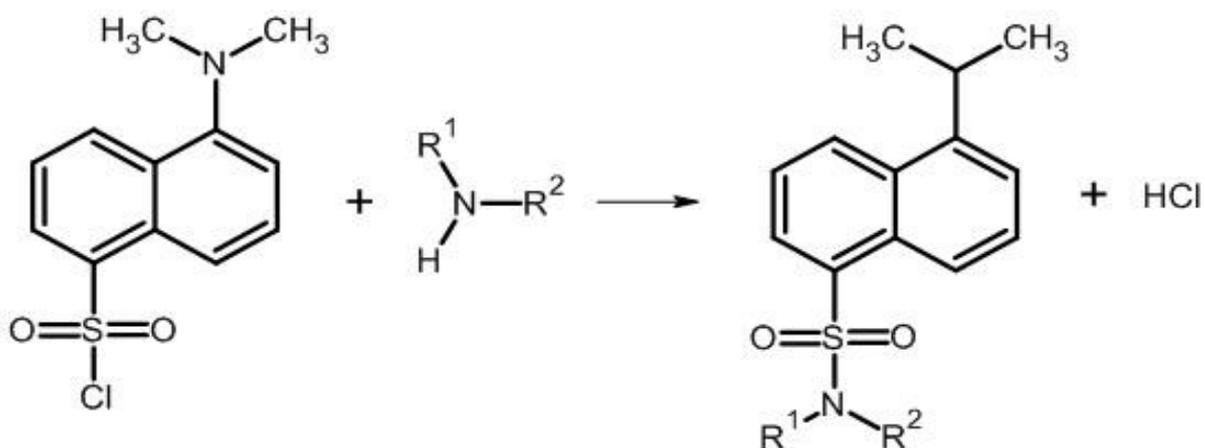


Fonte: Próprio autor

O DNS-Cl pertence à classe de compostos chamados de cloreto de sulfonila, ou cloreto de ácido sulfônico. A síntese é feita pela introdução do grupo sulfônico, no anel aromático, na posição 5 da naftalinamina, seguida da reação com metil sulfato. Por fim, ocorre a formação da sulfonila com PCl_5 , SOCl_2 ou POCl_3 . O sal DNS-Cl final é obtido pelo processo de extração com diclorometano, centrifugação e recristalização com hexano (HE RUIHUA, 2012).

A reação do cloreto de sulfonila com as ABs ocorre pela dissociação de cloro do DNS-Cl e ataque de elétrons do grupo amino, seguida da liberação de um próton. Os produtos da reação são aminas derivadas e ácido clorídrico, veja a Figura 4. Portanto, a derivatização com DNS-Cl pode ser utilizada para reações envolvendo aminas primárias e secundárias, ou seja, pode-se derivatizar ABs alifáticas, cíclicas ou aromáticas.

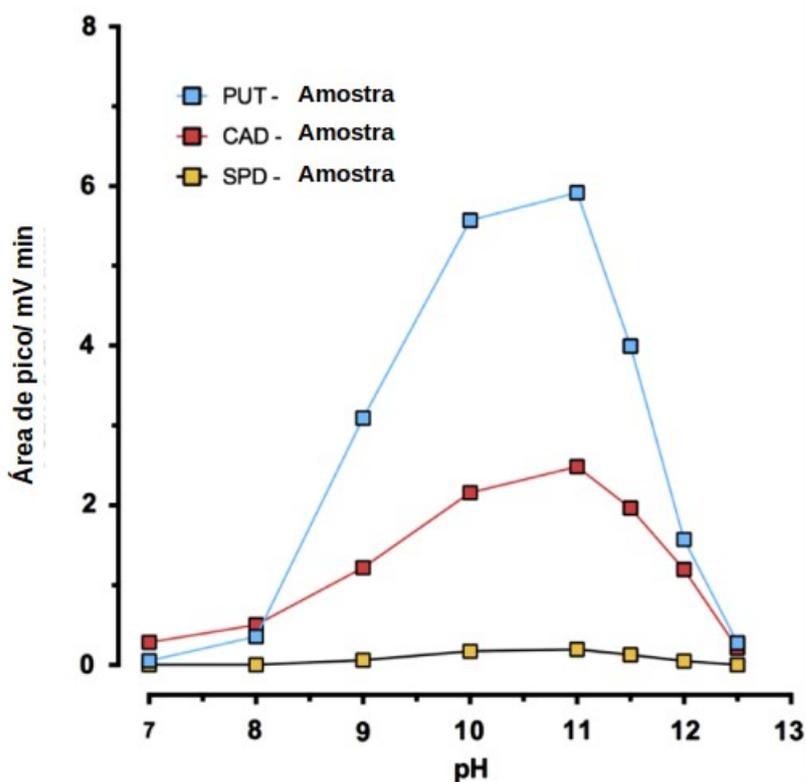
Figura 4 - Esquema reacional do DNS-Cl com o grupo amino primário (R1= grupo alquil, R2 = H), ou secundário (R1= grupo alquil, R2 = grupo alquil).



Fonte: Próprio autor

Quando a reação é realizada em meios neutros ou fracamente ácidos, com $\text{pH} < 8$, os rendimento tornam-se extremamente baixos, enquanto que para meios mais alcalinos, com $\text{pH} > 8$, tem-se um rendimento mais expressivo (PINEDA e colaboradores, 2012; RAMOS e colaboradores, 2014). Portanto, uma boa condição utilizada para esta reação consiste no meio alcalino, com $\text{pH} > 9$, onde utiliza-se tampões entre 10 e 12, Figura 5. Segundo PINEDA e colaboradores (2012), o tampão de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com pH reacional de 10,32 forneceu os melhores resultados, onde a menor sensibilidade foi para espermina. RAMOS e colaboradores (2014) utilizaram a solução de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com pH reacional 11, com a menor sensibilidade para histamina.

Figura 5 - Áreas de pico de 3 ABs derivadas com DNS-Cl com simultânea extração SALLE em vários pH.



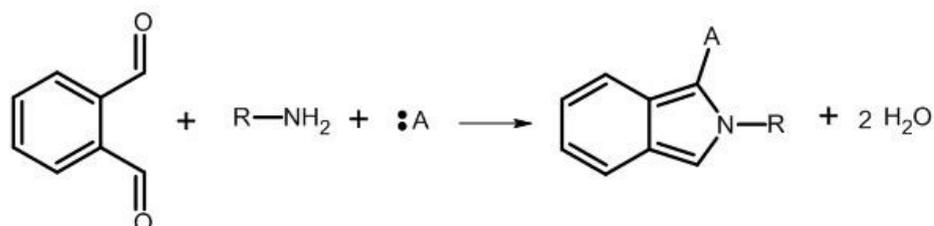
Fonte: Adaptado de Ramos e colaboradores (2014)

O OPA possui um anel aromático e dois grupos aldeídos (Figura 6). A reação do OPA é seletiva para aminas primárias, pois o produto da reação é um isoindol (Figura 6). Quando a reação acontece na presença de um nucleófilo, o mecanismo de reações propostos na literatura sugere a formação de hemiaminal, seguida de imina e, por fim, o isoindol.

As condições de síntese, geralmente, empregadas para a derivatização com OPA são a temperatura no intervalo de 25°C a 80°C, pH na faixa de 8,5 a 10,5, com soluções tampões de carbonatos (CO_3^{2-}) ou boratos (BO_3^{3-}) (ZUMAN, 2004). Os nucleófilos mais utilizados são tióis de cadeia linear, o mais utilizado é o 2-mercaptoetanol, devido a sua reação rápida e estável (JACOB; LEBURG ; MADAJ, 1986).

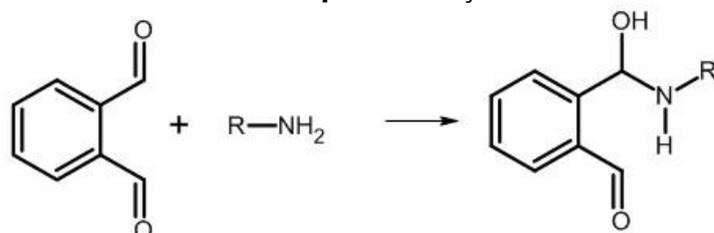
Figura 6 - Reação global (a) e mecanismo de reação (b) do OPA com grupo amino primário (R = grupo alquil) e nucleófilo (:A).

a)

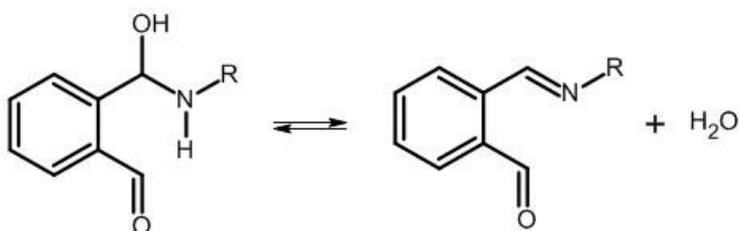


b)

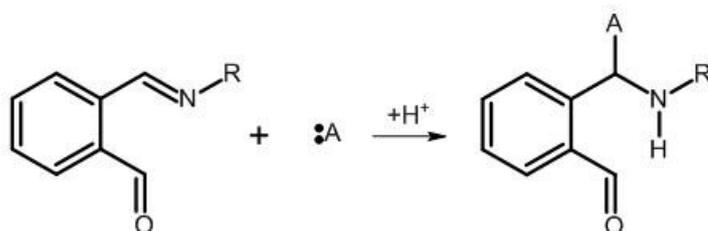
1^a Etapa: formação do hemiaminal



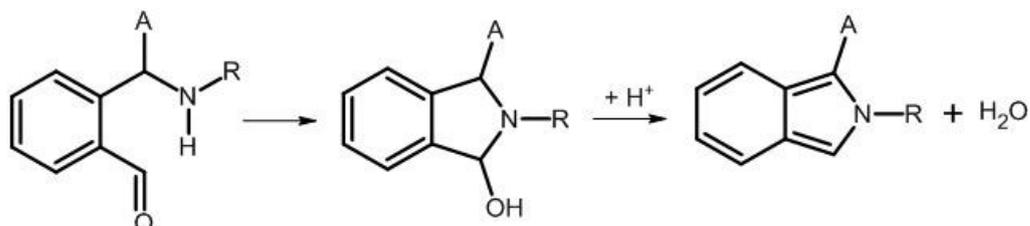
2^a Etapa: Formação da imina



3^a Etapa: Ataque do nucleófilo



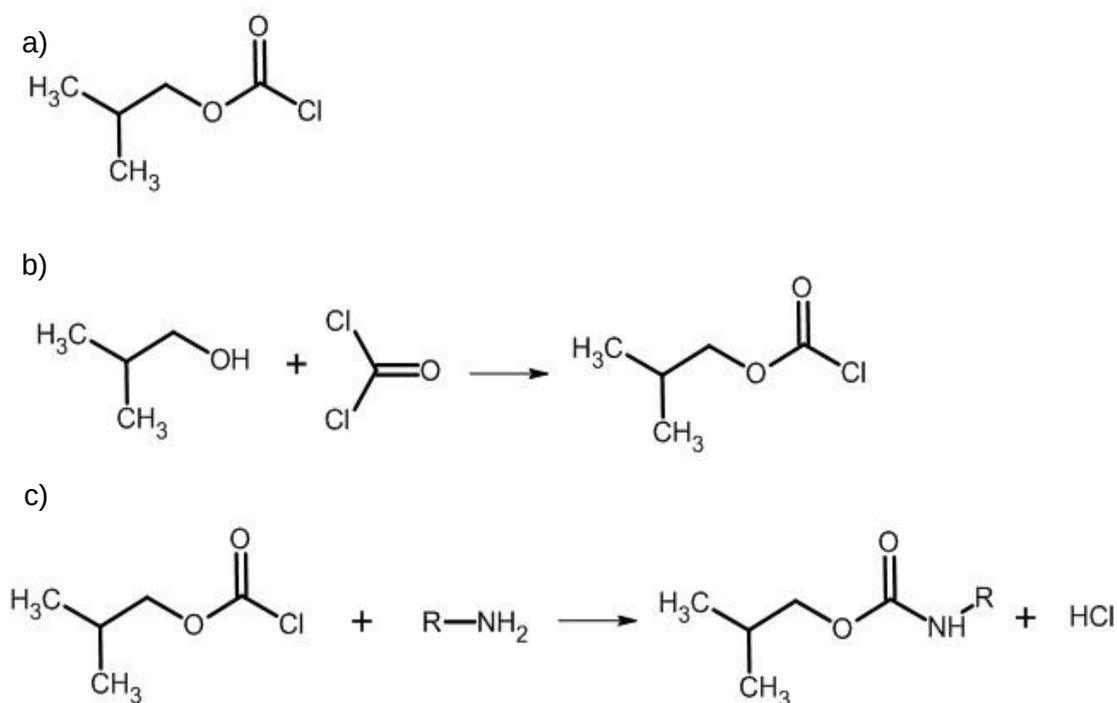
4^a Etapa: formação do isoindol



Fonte: Próprio autor.

O IBCF pertence à classe de compostos cloroformatos, que são caracterizados pela presença do grupo funcional éster com o ligante cloro ao grupo carbonila (Figura 7a). O IBCF é produto da reação do isobutanol com o fosfogênio (Figura 7b) com a produção de ácido clorídrico como coproduto (VAUGHAN & OSATA, 1952). O mecanismo de reação de uma amina com IBCF começa pelo ataque nucleofílico do grupo amino com a carbonila, seguida pela perda de um próton e eliminação do cloreto, por fim os produtos da reação são um carbamato e ácido clorídrico (D'SOUZA e colaboradores, 2011) (Figura 7c). Como o IBCF reage com água, utiliza-se em solventes orgânicos apróticos, sem carácter nucleofílico, inerte com o IBCF.

Figura 7 - Estrutura molécula (a), esquema de síntese (b) e mecanismo de reação com uma amina (c) do IBCF.



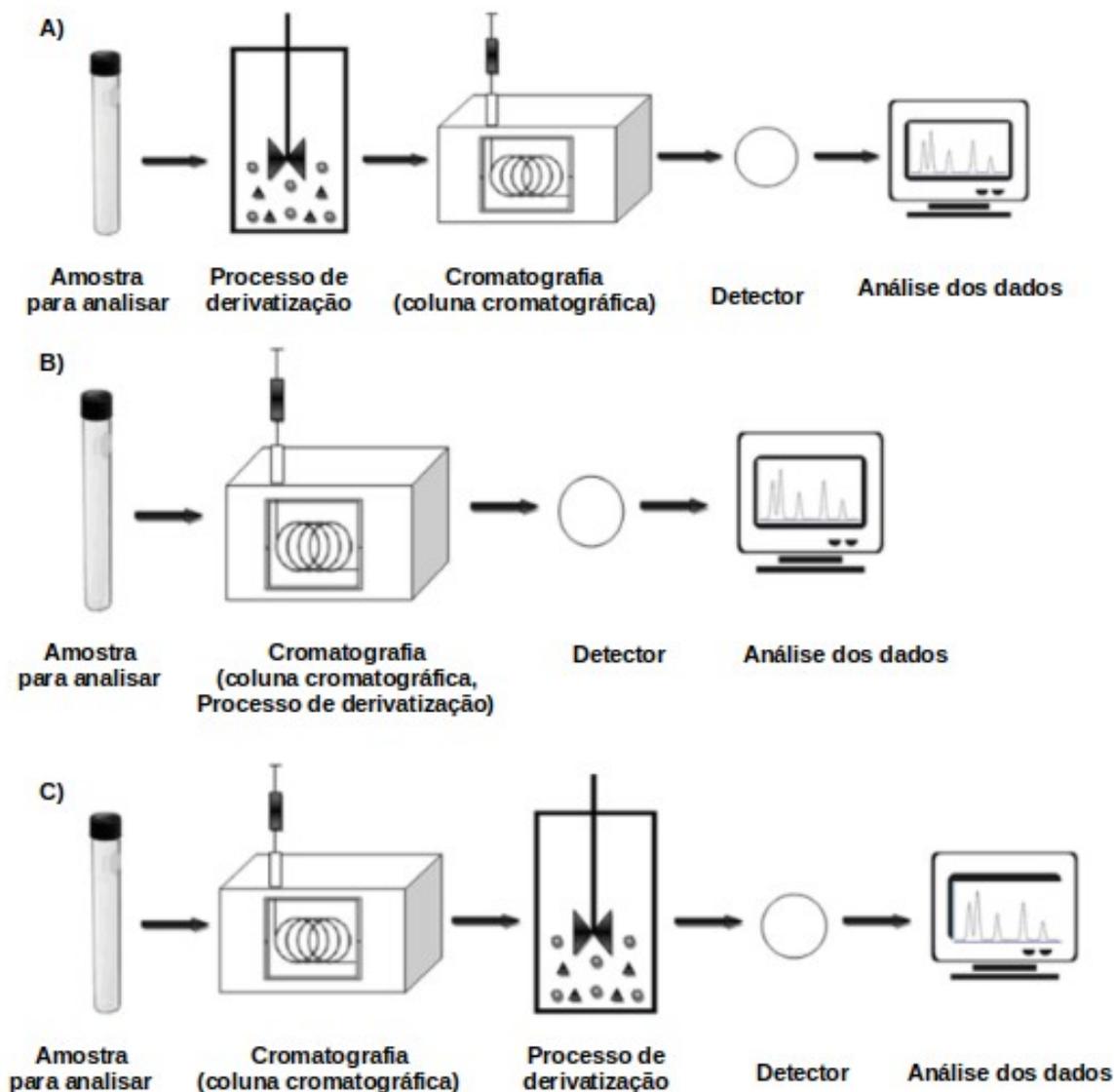
Fonte: Próprio autor.

2.3.4 Modos de derivatização

Como já mencionado, a reação de derivatização pode ser feita em diferentes momentos da análise, pré-coluna, em-coluna ou pós-coluna de separação. Na Figura 8, os esquemas dos procedimentos de derivatização são mostrados em

modos pré-coluna (a), em-coluna (b) e pós-coluna (c).

Figura 8 - Modos de derivatização pré-coluna (A), em-coluna (B) e pós-coluna (C).



Fonte: adaptado de PLOTKA-WASYLKA e colaboradores (2015)

Em CLAE, são chamadas de modo em-coluna as reações que ocorrem na coluna de separação, com o agente derivatizante compondo a fase móvel. A derivatização ocorre enquanto o analito percorre a coluna, onde o analito encontra o derivatizante, na fase móvel, e os derivados são formados antes de alcançar os detectores. Entre as vantagens desse modo estão a minimização do consumo de

reagentes, amostra, custo de operação e dispensa do uso de instrumentação especializada. Contudo, essa técnica é válida para uma pequena quantidade de amostras, pois amostra complexas possuem muitas espécies com potencial interferente para reação (basta um nucleófilo para alterar o produto da reação).

A derivatização pré-coluna ocorre em condições reacionais fora do sistema cromatográfico; após a modificação dos analitos, os derivados são separados e detectados. A principal vantagem é uma menor e mais estável linha base em comparação com o modo pós-coluna, pois os subprodutos da reação podem ser retirados antes da análise cromatográfica. Além disso, esta permite o aumento da hidrofobicidade do analito o suficiente para retenção em colunas estacionárias usadas em eluição do tipo fase reversa. Sobretudo, o reagente é adicionado diretamente na amostra, ou seja, a reação é influenciada pela matriz da amostra (PLOTKA-WASYLKA e colaboradores, 2015).

Na derivatização pós-coluna, a reação ocorre após à separação dos analitos na coluna, e então ocorre a mistura do analito com o reagente, e o produto alcança o detector. Portanto, a reação precisa ser rápida e o reagente deve gerar pouca alteração na linha base. Mas para que seja utilizada são necessários ajustes de muitos parâmetros tais como: volume morto associado à tubulação; dispositivos de mistura; célula de detecção em fluxo. Esse modo tem uma vantagem específica, o processo pode ser automatizado e geralmente fornecendo excelentes performance quantitativa e reprodutibilidade. A eficiência é pouco afetada pelo efeito de matriz. Por outro lado, esse modo de derivatização não pode ser utilizado para análises que necessitem de alta seletividade pois os picos são largos, os quais podem causar sobreposição de espécies. Uma desvantagem é o elevado consumo de reagentes, os quais são necessários para manter o fluxo constante da separação e reação pós-coluna (PLOTKA-WASYLKA e colaboradores, 2015).

2.3.5 Derivatização de ABs em amostras de alimentos

Primeiramente, as ABs devem estar disponíveis para reação de derivatização. As matrizes alimentícias podem atrapalhar o acesso das ABs para a reação de derivatização, para superar essa dificuldade realiza-se o pré-tratamento de amostras. Em algumas matrizes mais simples basta diluição e filtração para

eliminação de potencial interferência. Por exemplo, no caso de cervejas e vinhos utiliza-se polivinilpirrolidona (PVP) e filtração para retirada dos polifenóis (PINEDA e colaboradores, 2012). Para amostras sólidas é preciso um pré-tratamento mais elaborado, envolvendo passos de homogeneização, filtração, centrifugação, extração com ácidos e solventes orgânicos (JUBELE, 2018).

Com a disponibilização das ABs das matrizes alimentícias executa-se a derivatização e análise. Vários são os reagentes de derivatização utilizados, e isso irá depender dos métodos de separação e detecção utilizados. Um panorama dos diversos reagentes e procedimentos de derivatização em diferentes matrizes de alimentos para detecção de ABs por CLAE e GC é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Breve revisão da literatura sobre ABs, matrizes estudadas, reagentes derivatizantes e técnicas de detecção.

Referência	Analitos	Amostras	Derivatizante	Modo de reação	Deteção
TAMEEM e colaboradores (2010)	HIS; SPD; PUT; PHE; TRP; TYR; CAD.	Ketchup; Molho de soja; Suco de laranja; Peixe;	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE-DAD ⁸ $\lambda = 254 \text{ nm}$
GÁRCIA-MARINO e colaboradores (2010)	CAD; ETA; PHE; PUT; HIS; TYR; TRP;	Vinhos	OPA ²	Pré-coluna	CLAE-FL ⁹ $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emi}} = 426 \text{ nm}$
CIRILO e colaboradores (2003)	PUT; SPD; SPM; CAD; HIST; TYR; TRYP; PHE	Café verde e torrado	OPA ²	Pós-coluna	CLAE-FL ⁹ $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emi}} = 445 \text{ nm}$
VALE; GLORIA (1997)	CAD; HIST; PHE; PUT; SPD; SPM; TRYP; TYR;	Queijis	OPA ²	Pós-coluna	LC-FL ⁹ $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emi}} = 445 \text{ nm}$
PLOTKA-WASYLKA; SIMEONOV; NAMIEŚNIK (2018)	HIST; CAD; PUT; TYR; TRYP; PHE	Vinhos	IBCF ³	Pré-coluna	GC-MS ¹⁰
SANGRATINI e colaboradores (2012)	HIS; SPM; SPD; CAD; PUT; TYR; PHE; TRP.	Peixes	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	LC-FL ⁹ $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi}} = 523 \text{ nm}$
PINEDA e colaboradores (2012)	PUT; CAD; PHE; SPD; HIS; SPM; TYR;	Vinhos	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE-UV ¹² $\lambda = 254 \text{ nm}$

Tabela 1 Continuação

RAMOS; VALENTE; RODRIGUES (2014)	HIS; PHE; PUT; CAD; SPD; MET; ETA; DMA; ISO;	Vinhos	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE-FL ⁹ $\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$ $\lambda_{emi} = 523 \text{ nm}$
HE colaboradores (2016)	e TYR; HIS; PHE; TRYP; CAD; PUT; SPM; SPD.	Vinhos; cerveja; queijo; salsicha.	CCR ⁴	Pré-coluna	UCLAE-MS ¹⁰
HUANG colaboradores (2016)	e HIS; TYR; PUT; CAD;	Peixes	IBCF ³	Pré-coluna	GC-MS ¹⁰
ZAZZU colaboradores (2019)	e HIS; SPM; SPD; PUT; CAD; PHE; TYR; TRP; IS (1,7-DAH)	Queijos Fiore Sardo	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE-DAD ⁸ $\lambda = 254 \text{ nm}$ $\lambda = 218 \text{ nm}$
JIA colaboradores (2011)	e HIS; SPD; PUT; TYR; CAD; TRYP; PHE; IS (1,7-DAH)	Queijos; salsichas.	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	UPLC-MS ¹⁰
LIU colaboradores (2020)	e HIS; SPD; PUT; TYR; CAD; TRYP; PHE; IS (1,7-DAH)	Vinhos	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE-FL ⁹ $\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$ $\lambda_{emi} = 523 \text{ nm}$
PLAKIDI colaboradores (2020)	e HIS; PUT; CAD; SPD; SPM	Peixes	PSCL ⁵	Pré-coluna	CLAE-FL ⁹ $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ $\lambda_{emi} = 489 \text{ nm}$
MANTOANELL I; GONÇALVES; PEREIRA (2020)	CAD; PUT; TYR; HIST; TRP;	Queijo; Iorgute;	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CZE-DAD ⁸ $\lambda = 214 \text{ nm}$
ISHIMARU colaboradores (2019)	e TRP; PHE; PUT; CAD; HIST; TYR; SPD	Peixes, queijos, soja fementada.	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE-FL ⁹ $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$ $\lambda_{emi} = 470 \text{ nm}$
LEE e colaboradores (2019)	TRP; PHE; PUT; CAD; HIST; TYR; SPD; SPM.	Kimchi ⁶	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE- UV/Vis ¹¹ $\lambda = 254 \text{ nm}$
JIN e colaboradores (2019)	TRP; PHE; PUT; CAD; HIST; TYR; SPD; SPM.	Kimchi	DNS-Cl ¹	Pré-coluna	CLAE- UV/Vis ¹¹ $\lambda = 254 \text{ nm}$

Tabela 1 Continuação

MOHAMMADI e colaboradores (2017)	HIST; TYR; PUT; CAD;	Queijos	IBCF ³	Pré-coluna	GC-MS ¹⁰
CUNHA; LOPES; FERNANDES (2017)	MEA; DMA; ETA; DEA; PHE; PUT; CAD; HIST; TYR.	Diversos licores	IBCF	Pré-coluna	GC-MS ¹⁰
PINTO e colaboradores (2016)	PHE; PUT; CAD; HIS; TRP	Peixes	DNS-CI	Pré-coluna	CLAE- DAD ⁸
RESTUCCIA e colaboradores (2015)	SPM; SPD; PUT; HIST; TYR; PHE; CAD.	Café	DNS-CI	Pré-coluna	CLAE-UV ¹² λ = 254 nm
JAIN e colaboradores (2015)	MEA; TYR; PUT; TRP; PHE; SPD.	Suco de frutas	NITC ⁶	Pré-coluna	CLAE- UV/vis ¹¹ λ = 254 nm
WU e colaboradores (2015)	TRP; HIS; CAD; PHE; TYR; SPM.	Queijo; Cerveja; Salsicha.	BCEC-CI ⁷	Pré-coluna	CLAE-FL ⁹

¹ Cloreto de dansila; ² Orto-ftalaldeído; ³ Cloroformiato de isobutil; ⁴ 4'-cloreto de carbonil rosamina; ⁵ *PyreneSulfonyl Chloride*; ⁶ 1-Naftilisotiocianato; ⁷ 2- (11H-benzo [a] carbazol-11-il) Etil carbonocloridrato; ⁸ Detector de arranjo de diodo; ⁹ Detector de fluorescência; ¹⁰ Detector de massas; ¹¹ Detector de radiação no ultravioleta-visível; ¹² Detector de radiação no visível.

Fonte: Próprio autor.

2.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

2.4.1 Fundamentos de cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico utilizado para separar as espécies em uma solução. A separação das substâncias ocorre graças às diferentes interações entre as estruturas químicas (moleculares ou iônicas), das espécies em estudo, com uma espécie química imobilizada. Em cromatografia, a separação das substâncias ocorre quando um fluido, líquido ou gás, transporta o analito (fase

móvel) por uma coluna que suporta partículas, ou substâncias, imobilizadas (fase estacionária). Observando que a fase estacionária deve ser inerte à fase móvel. As polaridades inversas entre a fase móvel e estacionária garantem uma retenção diferencial dos analitos ao longo da coluna, dessa forma atingem o final da coluna com tempos diferentes. Após os analitos deixarem a coluna, esses seguem para o detector, onde será registrado um sinal transiente de cada analito (SKOOG e colaboradores, 2006).

As separações ocorrem devido às estruturas de cada espécie química, pois cada uma possui interações diferentes com as fases, dessa forma elas irão percorrer a fase estacionária com velocidades e tempos de retenção distintos. Dentre a cromatografia existem diferentes técnicas, as quais dividem-se por apresentarem diferentes características, como estado físico da fase móvel (cromatografia a gás ou a líquido), mecanismo de separação (cromatografia de troca iônica, bioafinidade, exclusão por tamanho, etc), polaridade (cromatografia de fases normal e reversa).

A falta de seletividade para determinar uma espécie química torna necessária uma técnica que possa isolar o analito dos possíveis interferentes, os quais existem concomitantemente (SKOOG e colaboradores, 2006). Detectores altamente específicos limitam a quantidade de analitos avaliados, onde por vezes tem-se interesse em determinar mais de um analito na amostra em cada análise. Essas duas condições são satisfeitas quando utiliza-se um sistema de separação cromatográfica associada a um detector com uma resposta universal, como detectores espectrofotométricos, fluorescentes, condutométricos, térmicos, etc. e serão detectados apenas as espécies que possuem resposta com o detector.

Se o detector responde à concentração do analito durante a eluição e seu sinal for registrado em função do tempo, uma série de picos será obtida. Esse gráfico, chamado de cromatograma, será útil para análises qualitativas e quantitativas (SKOOG e colaboradores, 2006). A forma do sinal é do tipo gaussiano, com uma largura característica.

2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é caracterizada pelo uso de partículas de dimensões micrométricas na fase estacionária (de 3 a 10 μm), com

grande área superficial, para que haja um aumento na eficiência das separações. Com o uso de partículas tão pequenas ocorre o aumento da resistência à passagem da fase móvel. Por isto, um sistema de bombeamento pressurizado (pressões de 1 a 40 MPa) é utilizado para a fase móvel alcançar uma vazão aceitável, e obter separações com ótima resolução (SKOOG e colaboradores, 2006).

A diferença na separação com fase móvel líquida, em comparação com a gasosa, é a sua interação com o analito, pois na fase condensada estão sujeitos a reações ácidas ou básicas, a força iônica e interações íon-dipolo, dipolo-dipolo e ligação de hidrogênio. O gás de arraste, da cromatografia gasosa, apenas transporta os analitos pela coluna cromatográfica, enquanto que a fase móvel líquida interage com o analito e a fase estacionária. Portanto, a composição da fase móvel torna-se mais um parâmetro a ser avaliado na eficiência das separações. As propriedades exploradas na fase móvel são composição, pH, força iônica, etc.

Para empregar-se a técnica é necessário que a fase estacionária seja imiscível na fase móvel, pois somente assim a reprodutibilidade das separações pode ser alcançada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Os sistemas CLAE são constituídos de reservatórios para os solventes, bombas de alta pressão, uma válvula de injeção de amostras, a coluna cromatográfica, um sistema de detecção e um conjunto de outros periféricos para melhorar os sinais analíticos (SKOOG e colaboradores, 2006).

Essa técnica tornou-se essencial em estudos de espécies biológicas, pois a faixa de temperatura em que o equipamento funciona (entre 5°C a 80°C) são adequados para espécies que sofrem degradação em elevadas temperaturas. Além disso, esta é uma técnica não destrutiva, ou seja, a espécie separada pode ser recuperada ao final da separação. Em CLAE o volume de amostra necessário para análise são de 5 µL até 100 µL (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Os detectores utilizados em CLAE são compatíveis com uma série de técnicas já utilizadas em via úmida em estudos analíticos, como espectrofotometria, amperométricas, condutimétricas, espectrometria de massas, e outras. A técnica mais comum é a espectrofotométrica, pois é uma técnica sensível, robusta e bem estabelecida.

2.4.3 Separação por CLAE

Como mencionado anteriormente, as separações sofrem uma forte influência dos solventes que compõem a fase móvel, sendo necessária uma abordagem dos efeitos. Em CLAE, os analitos estão em um ambiente condensado, o quais são mais suscetíveis às transformações químicas. Essas transformações podem ter diferentes níveis de complexidades, mais simples como efeito ácido-básico ou mais complexos como as reações de derivatização.

O efeito do pH da fase móvel é fundamental para espécies com características ácido-base. De fato, pois com a fase móvel com pH menor que pKa do analito a espécie estará predominante na forma ácida, contudo com $\text{pH} > \text{pKa}$ a espécie predominante será a básica. Mas na condição de $\text{pH} = \text{pKa}$ as duas formas serão encontradas com a mesma proporção na fase móvel, e caso as duas espécies possam ser detectadas, assim existiram duas respostas para o mesmo analito, dificultando a sua determinação qualitativa e quantitativa. Esses efeitos são notados principalmente com espécie de alto peso molecular que possuem grupos anfóteros, como aminoácidos, péptidos e proteínas. Porém, o intervalo de pH que pode ser utilizado na fases móvel é o estabelecido com base nas características da coluna cromatográfica em uso, pois em pH muito baixo, as partículas da fase estacionária sofrem deformações e em pH muito alto a fase estacionária ligada quimicamente as partículas sofrem lixiviação, perdendo o revestimento.

Em CLAE existem dois tipos de eluição para às separações. Uma, a eluição isocrática, que emprega uma composição constante da fase móvel, e outra, a eluição gradiente, onde a composição da fase móvel varia com o tempo. Cada tipo de eluição possui suas vantagens e desvantagens, de forma que o sistema mais adequado depende das condições desejadas para a separação. A eluição isocrática é mais simples, pois um sistema de instrumental simples de CLAE pode utilizá-lo, as linhas base do cromatograma são mais estáveis, e o tempo de acondicionamento das colunas é menor. A eluição gradiente requer um sistema de bombeamento mais sofisticado, que permite mudança nas vazões, ou proporções, dos solventes, e o tempo de acondicionamento da coluna é maior.

Quando os analitos possuem tempos de retenção longos em eluição

isocrática, emprega-se a eluição gradiente para proporcionar um tempo de retenção menor. Porém, esse sistema gradiente precisa ser realizado de forma a não prejudicar a eficiência dos analitos separados na eluição isocrática. Ou seja, para estabelecer um programa de eluição gradiente eficiente, que atenda aos requisitos do método e matriz que deseja-se analisar. Outra situação, quando os analitos da amostra eluem junto com espécies interferentes da matriz, o sistema gradiente pode ser utilizado para eluir os interferentes com um tempo diferente, para que não atrapalhe a quantificação do analito.

Na Tabela 2, há uma breve revisão dos trabalhos na literatura para determinar aminas biogênicas em diferentes matrizes por CLAE. Os detalhes instrumentais também são descritos, assim como os solventes e sistemas de eluição. Os parâmetros mais utilizados são eluição gradiente, acetonitrila e água como solvente, vazão de 1 mL min⁻¹, o volume de injeção de 20 µL e 10 µL, coluna de fase reversa C18 de comprimento 250 mm e 150 mm, com largura 4,6 mm e tamanho das partículas de 5 µm, com detecção por absorção molecular no ultravioleta e visível (Uv-vis), ou com detector de arranjo de diodos (DAD), no comprimento de onda de 254 nm e o DNS-Cl como derivatizante.

Tabela 2 - Breve revisão de trabalhos na literatura para determinação de aminas biogênicas por CLAE, destacando amostra, eluentes, vazão, volume de injeção, coluna cromatográfica e detector.

Referência	Detalhes	Instrumentos Solventes
EEROLA e colaboradores (1993)	Amostras: Salsichas Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Acetato de amônio e acetonitrila. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Waters, Spherisorb ODS2 (125 mm x 4 mm, 5 µm) Detector: DAD (254 nm)
BEN-GIGIREY e colaboradores (1998)	Amostra: Peixes Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Acetato de amônio e acetonitrila. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Nucleosil, 120 C18 (150 mm x 4 mm, 5 µm) Detector: UV (254 nm)

Tabela 2 Continuação

VINCI e ANTONELLI (2002)	Amostra: Carnes de ave e bovina Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Acetato de amônio e acetonitrila Vazão: 1,2 mL min ⁻¹ Injeção: 10 µL Coluna: Supelcosil, LC-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Detector: UV-vis (254 nm)
MAH e colaboradores (2002)	Amostra: Frutos do mar salgados (Korean) Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Acetato de amônio e acetonitrila Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Waters, Nova-Pak C18 (150 mm x 3,9 mm, 4 µm), Detector: DAD (254 nm)
CHIACCHIERI NI; RESTUCCIA; VINCI (2006)	Amostra: Produtos à base de tomate Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e acetonitrila Vazão: 1,2 mL min ⁻¹ Injeção: 50 µL Coluna: Supelcosil, LC-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Detector: Uv-vis (254 nm)
SAAID e colaboradores (2009)	Amostra: Produtos à base de tomate Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Acetonitrila: Água (67:33, v/v) Vazão: 1,2 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Waters, Spherisorb ODS2 (250 mm x 4,5 mm, 5 µm) Detector: Uv-vis (254 nm)
DADÁKOVÁ; KRÍZEK; PELIKÁNOVÁ (2009)	Amostra: Produtos à base de tomate Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e acetonitrila Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 5 µL Coluna: Agilent, Zorbax Eclipse XDB – C18 (50 mm x 4,6 mm, 1,8 µm) Detector: Uv-vis (225 nm)
SAAID e colaboradores (2010)	Amostra: Peixes, molho de soja e tomate, queijo Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e acetonitrila Vazão: 1,2 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Waters, Spherisorb ODS2 (250 mm x 4,5 mm, 5 µm) Detector: Uv-vis (254 nm)

Tabela 2 Continuação

TAMEEM e colaboradores (2010)	Amostra: Peixes, molho de soja, tomate e laranja Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Metanol:Água:Acetonitrila(15:25:50, v/v/v) Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 50 µL Coluna: Hypersil, C18 ODS (250 mm x 4,5 mm, 5 µm), Detector: Uv-Vis (254 nm)
RESTUCCIA e colaboradores (2011)	Amostra: Queijos Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e acetonitrila Vazão: 1,2 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Supelco, C18 (250mm × 4,6mm, 5µm) Detector: ELSD ¹
PINEDA e colaboradores (2012)	Amostra: Vinhos Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e acetonitrila Vazão: 0,6 mL min ⁻¹ Injeção: 50 µL Coluna: Waters, C18 YMC-Pack ODS-A (150 mm, 4,6 mm, 5 µm), Detector: Uv-Vis (254 nm)
BYUN & MAH (2012)	Amostra: Vinhos Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Acetato de amônio e acetonitrila Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 10 µL Coluna: Waters, Nova-Pak C18 (150 mm × 4,6 mm, 4 µm) Detector: Uv-Vis (254 nm)
HU e colaboradores (2012)	Amostra: Peixes Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e acetonitrila. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Agilent, Zorbax Extend-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) Detector: DAD (254 nm)
BUNKOVA e colaboradores (2013)	Amostra: Queijos e produtos fermentados Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água (A) e Acetonitrila (B) Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 5 µL Coluna: Agilent, ZORBAX Eclipse XDB - C18 (150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm) Detector: DAD (254 nm)

Tabela 2 Continuação

BAI; BYUN; MAH (2013)	Amostra: Doces de feijão Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Acetato de amônio e Acetonitrila Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 10 µL Coluna: Waters, Nova-Pak C18 4 Im (150 mm x 4,6 mm, 4 µm) Detector: Uv-Vis (254 nm)
RAMOS e colaboradores (2014)	Amostra: Vinhos Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Tampão acetato 0,01 mol L ⁻¹ pH= 4 e acetonitrila Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Phenomenex, Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Detector: Fluorimétrico (λ _{ex} = 320 nm; λ _{em} = 523 nm)
RESTUCCIA e colaboradores (2015)	Amostra: Café Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e Acetonitrila Vazão: 1,2 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Supelco, C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Detector: UV-vis (254 nm)
ZAZZU e colaboradores (2019)	Amostra: Queijo de cabra Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e Acetonitrila Vazão: 0,8 mL min ⁻¹ Injeção: 10 µL Coluna: Kromasil, 100-5 C18 (250 mm × 4,6 mm × 5 µm) Detector: DAD (254 nm)
ISHIMURA e colaboradores (2019)	Amostra: Peixes e queijos Derivatizador: DNS-Cl	Solventes: Água e Acetonitrila Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 10 µL Coluna: Develosil, XG-C30M-5 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) Detector: Fluorimétrico (λ _{ex} = 325 nm; λ _{em} = 470 nm)
Vale & Glória (1997)	Amostra: Queijos Derivatizador: orto-ftalaldeído	Solventes: Água, metanol e acetonitrila. Vazão: 0,70 mL min ⁻¹ Injeção: 20 µL Coluna: Waters, µBondapack C18 (300 mm x 3,9 mm, 10 µm), Detector: Fluorimétrico (λ _{ex} = 340 nm; λ _{em} = 445 nm)

Tabela 2 Continuação

CIRILLO e colaboradores (2003)	Amostra: Cafés Derivatizador: OPA	Solventes: Acetato de sódio 0,2 mol L ⁻¹ e sal de octano-1-sulfonato 10 mmol L ⁻¹ e Acetonitrila Vazão: 0,6 mL min ⁻¹ Injeção: 10 µL Coluna: Waters, µBondapak C18 (300 mm x 3,9 mm, 10 µm), Detector: Fluorimétrico (λ _{ex} = 340 nm; λ _{em} = 445 nm)
GARCÍA-MARINO; TRIGUEIROS; ESCRIBANO-BAILÓN (2010)	Amostra: Vinhos Derivatizador: OPA	Solventes: Acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ , pH= 6,6, com tetrahidrofurano e metanol:Acetonitrila Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ Injeção: 10 µL Coluna: Phenomenex, Synergi-Hydro1 RP-80 (150 mm x 3,9 mm, 4 µm) Detector: Fluorimétrico (λ _{ex} = 340 nm; λ _{em} = 426 nm)

¹evaporation light scattering detector; ²cloroformiato de isobutila;

Fonte: Próprio autor.

3 EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados de grau analítico e não foram purificados. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (resistividade > 18 MΩ cm) obtido por um sistema de purificação de água Millipore Direct-Q 3 UV(Brasil). Os padrões de aminas biogênicas, triptamina (Cas number 193747), cadaverina (D22606), putrescina (51799), histamina (H7125), tiramina (T90344), espermidina (49761) e espermina (S3256), 1,7-Diamino-heptano (D17408) e cloreto de 5-dimetilamino-naftaleno-1-sulfonil (DNS-Cl) (D2625), foram obtido pela Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). O ácido Clorídrico (7647-01-0), hidróxido amônio (1336-21-6), acetona (67-64-1) e éter etílico (60-29-7) foram comprados da Dinâmica (Brasil). A acetonitrila (75-05-8) foi obtida pela J.T. Baker (China). Os sais de hidróxido de sódio (1310-73-2), hidróxido de potássio (1310-58-3), carbonato de sódio anidro (497-19-8), bicarbonato de sódio anidro (144-55-8), cloreto de sódio (7647-14-5) e cloreto de potássio (7447-40-7) foram obtidos pela Dinâmica (Brasil). Para as reações de derivatização as soluções de ácido e base foram padronizadas, a solução HCl 0,1 mol L⁻¹ para solubilizar as soluções das aminas biogênicas, e a solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹ para ajustar o pH do meio reacional. O N₂ comprado da White Martins (Brasil) foi utilizado no processo da reação de derivatização com DNS-Cl.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO E SOFTWARES

Para conduzir as reações de derivatização foram utilizados agitadores magnéticos com aquecimento 752A da Fisatom (São Paulo, Brasil). Para as transferências dos volumes exatos de soluções foram usadas micropipetas de volume variável de 10 a 100 µL e 100 a 1000 µL da DeLTECH control (Índia).

O sistema de separação utilizado foi um CLAE da Shimadzu, com duas bombas LC-20AD, desgaseificador DGU-20A3, auto-amostrador SIL-20A, forno de coluna CTO-20A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A e um módulo de comunicação CBM-20A. O CLAE foi controlado com o software LabSolutions da Shimadzu. Para a separação, uma coluna da PHENOMENEX C18 Luna, de 250 mm

x 4,6 mm, 5 μ M, foi utilizada.

Para o preparo das amostras foi utilizada uma centrífuga KASVI modelo K14-24h para 6 tubos de 50 mL.

3.3 AMOSTRA

As amostras de queijo do tipo coalho sem sal (QCSS), coalho com sal (QCCS) e queijo manteiga (QM) foram obtidas na feira popular em Recife, Pernambuco, Brasil. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a -18°C .

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para extrair as aminas biogênicas das amostras de queijo, o procedimento utilizado foi adaptado de Dadáková e colaboradores (2009). Primeiramente, 100 g de queijo foi triturado em processador (Philips Walita Viva RI7630) até formar uma pasta homogênea. Depois, misturou-se 10 g da amostra homogeneizada com 20 mL de solução de HCl 0,1 mol L^{-1} em um tubo de centrífuga de 50 mL. A mistura foi agitada durante 20 minutos. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada durante 10 minutos a uma rotação de 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro, e o filtrado transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi aferido com solução de HCl 0,1 mol L^{-1} . Para realizar as medidas das aminas biogênicas, 1 mL da solução da amostra foi usada na reação de derivatização.

3.5 PREPARO DOS PADRÕES

As soluções padrões das aminas biogênicas foram preparadas em solução HCl 0,1 mol L^{-1} , padronizadas com Na_2CO_3 , como padrão primário, pela titulação potenciométrica. Soluções estoque de 1000 mg L^{-1} das aminas biogênicas foram preparadas pela medida precisa da massa, de 25 mg de cada um dos padrões de triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina, e solubilizados com solução de HCl 0,1 mol L^{-1} em um frasco de 25 mL. A solução estoque do padrão interno, diamino-heptano, foi preparada pela medida de 10 mg e solubilizada em 10 mL de solução de HCl 0,1 mol L^{-1} . As soluções da curva de calibração foram preparadas pela diluição da solução estoque das aminas biogênicas com solução de HCl 0,1 mol L^{-1} . As soluções foram armazenadas em freezer comercial, essas soluções foram utilizadas no prazo de 1 mês.

3.6 DERIVATIZAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS

Para a detecção das aminas biogênicas por Uv-vis foi incorporado um grupo cromóforo pela reação com o DNS-Cl. A derivatização das aminas biogênicas foi conduzida de acordo com o método de PINTO e colaboradores (2016), Ramos e colaboradores (2014) e EEROLA e colaboradores (1993), com algumas modificações. Em um frasco com tampa foram adicionados: 1 mL da solução da mistura das aminas; 0,2 mL da solução NaOH 2,0 mol L⁻¹; 0,3 mL da solução de NaHCO₃ saturado; Por fim, 2,0 mL de solução de DNS-Cl (1 mg mL⁻¹, em acetona). O frasco foi tampado incubado a 40°C durante 45 minutos. Depois da reação, no frasco com a reação foram adicionados 100 µL de solução de NH₄OH 28% e mantido à temperatura ambiente por 30 minutos. Após isto, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL e o volume final foi aferido com adição de acetonitrila. A solução foi filtrada através de um filtro de seringa de 0,45 µm de politetrafluoretileno (PTFE) e analisada.

3.7 EXTRAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS DERIVADAS

Para eliminar subprodutos da reação do DNS-Cl e diminuir a quantidade de espécies interferentes proveniente de amostras, alguns métodos de purificação foram testados, como **LLE** e **SALLE**.

O procedimento **LLE** foi conduzido de acordo com ZAZZU e colaboradores (2020). Após a derivatização das aminas biogênicas, foram adicionados 1,0 mL de éter etílico, a mistura foi agitada manualmente por 1 minuto e colocada em repouso. Após repouso da mistura e separação das fases, uma alíquota (de 1 mL e 0,5 mL) da fase superior foi retirada, essa extração com éter etílico foi repetida mais duas vezes. As alíquotas foram combinadas e secas sob fluxo de nitrogênio em banho maria a 40°C. O resíduo foi solubilizado em 1,0 mL de acetonitrila, e em seguida, filtrado em filtro de seringa de 0,45 µm de PTFE.

O procedimento de **SALLE** foi conduzido de acordo com o proposto por RAMOS e colaboradores (2012). No procedimento de derivatização antes da adição do DNS-Cl, 1,0 mL de acetonitrila foi adicionado ao meio reacional e, após isso, a reação de derivatização foi conduzida normalmente. Depois da conclusão da reação, foram adicionados 0,13 g de NaCl, houve a separação de duas fases, a fase inferior

é a solução aquosa e a fase superior é a solução com solvente extrator. Da fase superior foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e filtrada em filtro de seringa para ser injetada no CLAE.

Após comparação dos cromatogramas, mudou-se o solvente utilizado no método **SALLE** para a extração das amins derivadas com DNS-Cl e separação dos subprodutos sem interesse. A acetonitrila foi substituída pelo éter etílico como solvente extrator, pois elimina, ou são menores, as áreas dos subprodutos de derivatização. Após a adição de 0,13 g de NaCl e separação das fases, uma alíquota de 1,0 mL foi retirada da fase superior e seca com fluxo de N₂ em banho de água a 40°C. O resíduo foi solubilizado com 1 mL de acetonitrila e a solução filtrada com filtro de seringa 0,45 µm para ser analisada por CLAE.

3.8 ANÁLISE DAS ABS POR CLAE

O sistema de eluição utilizado foi o mesmo proposto por ZAZZU e colaboradores (2020), com uma vazão da fase móvel de 0,8 mL min⁻¹, usando como fases móveis água e acetonitrila, solvente A e B respectivamente. A eluição gradiente usada é descrita na Tabela 3. Os últimos 5 minutos com 65% de B para restabelecer as condições iniciais da coluna cromatográfica. A coluna cromatográfica fica termostaticada a 40°C. Para análise foram injetados 10 µL da solução das ABs derivadas com DNS-Cl. Os comprimentos de onda monitorados foram de 254 nm e 218 nm, ambos correspondem a máximos de absorção das ABs derivadas com DNS-Cl (ZAZZU e colaboradores, 2020) (Apêndice 1).

Tabela 3 - Eluição gradiente com Eluente A e B, respectivamente água e acetonitrila, para separação das ABs derivadas com DNS-Cl.

Tempo de eluição/ min	Concentração de B/ %
0 a 1	65%
1 a 10	65% a 80%
10 a 12	80% a 90%
12 a 16	90% a 100%
16 a 25	100,00%
25 a 30	65%

Fonte: Própria autor.

A curva de calibração foi desenvolvida com as ABs derivadas com DNS-Cl, extraídas com LLE e analisadas em CLAE. Para construção da curva de calibração foram preparados padrões com as seguintes aminas biogênicas: triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina espermina, e diamino heptano. O diamino-heptano foi utilizado como padrão interno, por esse motivo usou-se uma concentração constante de 30 ppm para cada ponto de calibração da curva.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados conforme CURRIE (1995) e recomendação da União internacional de química pura e aplicada.

$$LD = \frac{t_{(0,05, v)} * S}{A} \quad \text{equação 01}$$

$$LQ = \frac{10 * S}{A} \quad \text{equação 02}$$

Onde $t_{(0,05, 9)}$ é o valor de t tabelado com uma significância de 0,05 com 9 graus de liberdade (2,26), S é o desvio padrão de 10 medidas do branco, e A é a inclinação da reta de calibração.

3.9 TRATAMENTO DE DADOS E ESTATÍSTICA

Todos os dados foram obtidos com repetição, e o resultado final expresso com a média aritmética e desvio padrão dos resultados. A variação dos resultados foi avaliado pelo desvio padrão relativo (DPR).

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Equação 03}$$

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - M)^2}{n - 1} \quad \text{Equação 04}$$

$$DPR = \frac{S}{M} 100\% \quad \text{Equação 05}$$

Onde X_i são os resultados obtidos por cada repetição, n é o número de medidas, M é média aritmética dos resultados, S é o desvio padrão amostral e DPR é o desvio padrão relativo.

4 RESULTADOS

4.1 DERIVATIZAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS

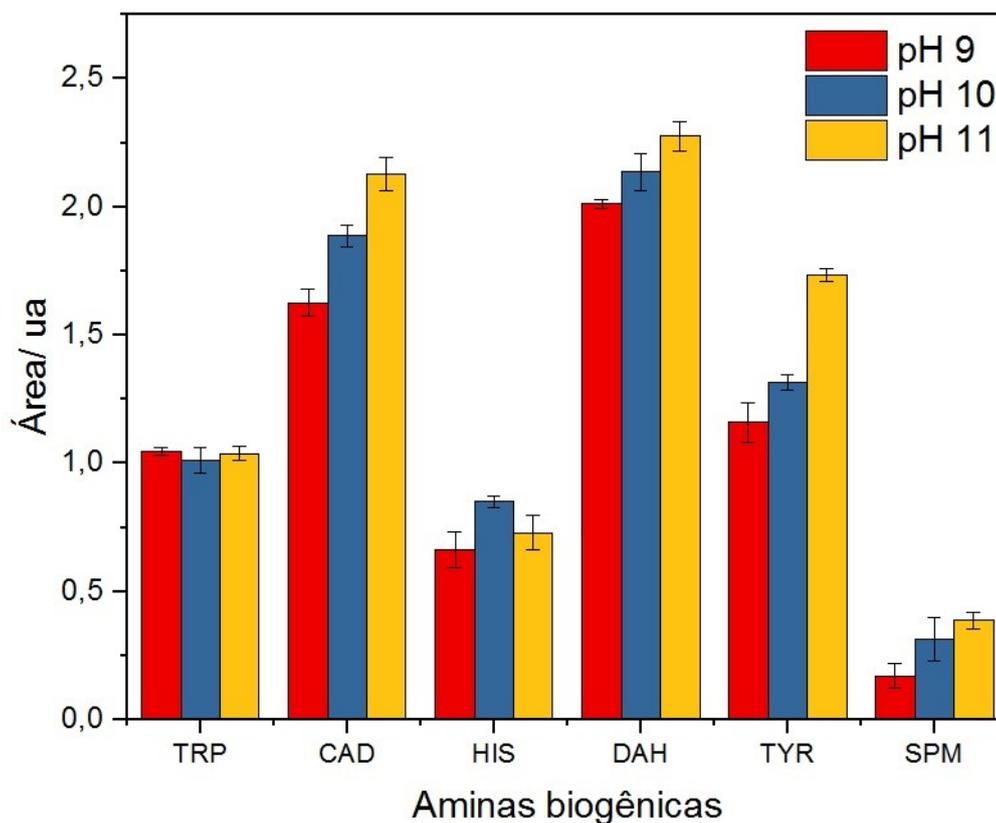
A derivatização foi realizada conforme o trabalho de PINTO e colaboradores (2016) e EEROLA e colaboradores (1993), conforme descrito na seção experimental. Iniciou-se analisando cada ABs individualmente para descobrir seus tempos de retenção. O tempo de retenção das ABs foram: TRP, 9,3 min; PUT, 11,4 min; CAD, 12,2 min; HIS, 13,2 min; DAH, 14,4 min; TYR, 15,6 min; SPD, 16,1 min; SPM, 20,2 min. Utilizando o mesmo sistema cromatográfico, a ordem de eluição das ABs foi similar com os resultados de ZAZZU e colaboradores (2020).

4.1.1 Influência do pH

A influência do pH da solução de derivatização foi observado pela adição de diferentes volumes da solução de NaOH. Três valores de pH foram avaliados, 9, 10 e 11, pois segundo RAMOS e colaboradores (2014) e PINEDA e colaboradores (2012) o pH ótimo da reação do DNS-Cl são relatados na faixa de 10 e 11, respectivamente. Na Figura 9, às áreas das ABs derivadas com solução de pH 11 são maiores, ou iguais, às de pH 9 e 10. Para a triptamina, histamina e diaminoheptano (DAH) as áreas foram similares. Diferentemente, as áreas da cadaverina, tiramina e espermina aumentaram conforme o aumento do pH do meio.

Os valores de desvio padrão relativo permaneceram inferiores ou iguais a 8%, conforme recomendação do guia de eficiência necessária para métodos padrões (AOAC, 2016). Exceto para histamina e espermidina, cujos valores de RSD foram, respectivamente, de 9,1% e 8,3%. O valor de RSD maior que 8% alerta a necessidade de controle maior do protocolo de derivatização. O pH 11 para o meio reacional foi selecionado para as análises subsequentes.

Figura 9 - Valor médio das áreas sob diferentes pH da solução (pH 9, pH 10, pH 11) das aminas biogênicas derivadas.



Fonte: Próprio autor.

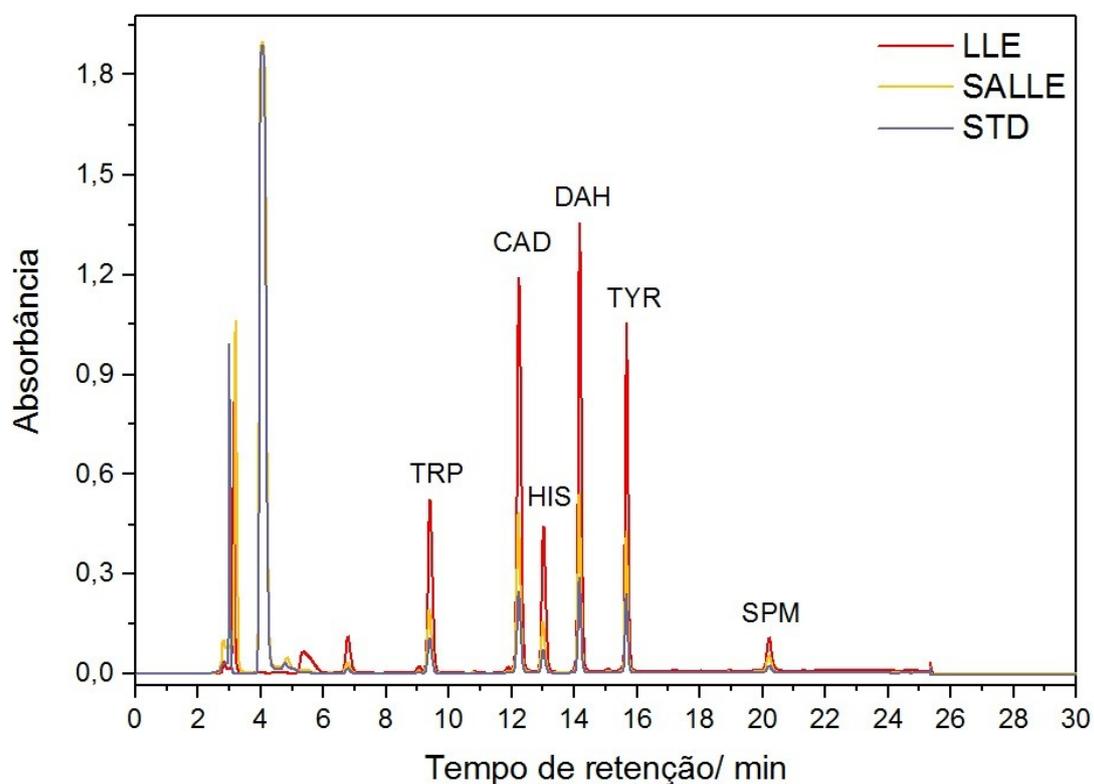
4.1.2 Métodos de extração das aminas biogênicas derivadas

Os subprodutos da reação do DNS-Cl, formados com a água e amônia, são espécies que absorvem radiação eletromagnética. Estes podem mascarar o sinal das aminas derivadas com DNS-Cl na ausência de uma técnica cromatográfica.

Para avaliar a influência das extrações e eliminação dos subprodutos de reação do DNS-Cl, uma solução de 100 mg L^{-1} das ABs foi derivatizada conforme os métodos de extração descritos na seção experimental. Os áreas das ABs derivadas sem extração (STD) e com extrações SALLE e LLE são mostradas na Figura 11. As análises com LLE e SALLE apresentaram, respectivamente, áreas médias de 4,4 e 2,1 vezes maiores que as análises STD. Além disso, o subproduto do DNS-Cl com pico observado em 4,1 min, na análise STD, é eliminado nas análises com extração. As ABs possuem maior solubilidade em éter etílico e acetonitrila, comparados com

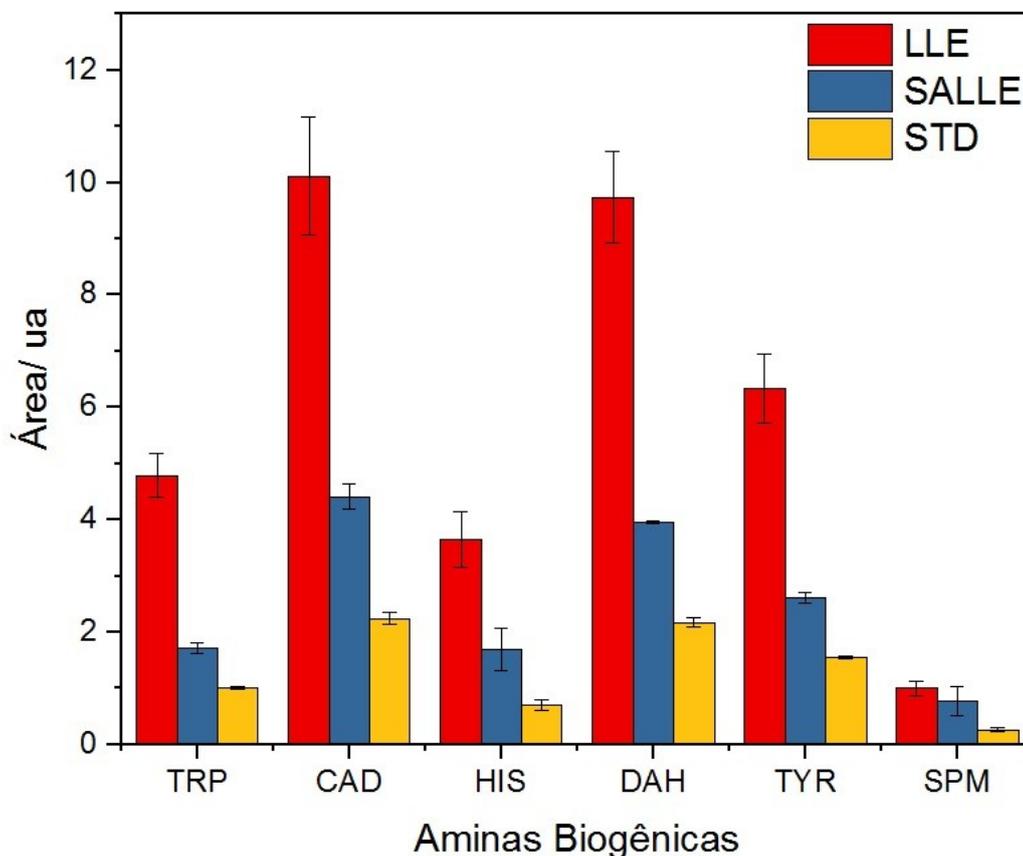
água, enquanto que as substâncias com tempo de retenção de 4,1 min e 3,1 min possuem um solubilidade maior em água (Figura 10). Por isto, a extração LLE e SALLE apresentaram uma área maior das ABs derivadas, pois possuem maior solubilidade das ABs derivadas nos solventes utilizados nas extrações. Além disso, a extração LLE possui uma etapa de concentração das ABs derivadas pela evaporação do solvente extrator.

Figura 10 - Cromatograma das ABs derivadas a 100 mg L⁻¹ sem extração (STD), com extrações (LLE e SALLE).



Fonte: Próprio autor.

Figura 11 - Valor médio das áreas com extrações LLE e SALLE e sem extração (STD) das ABs derivadas a 100 mg L^{-1} .



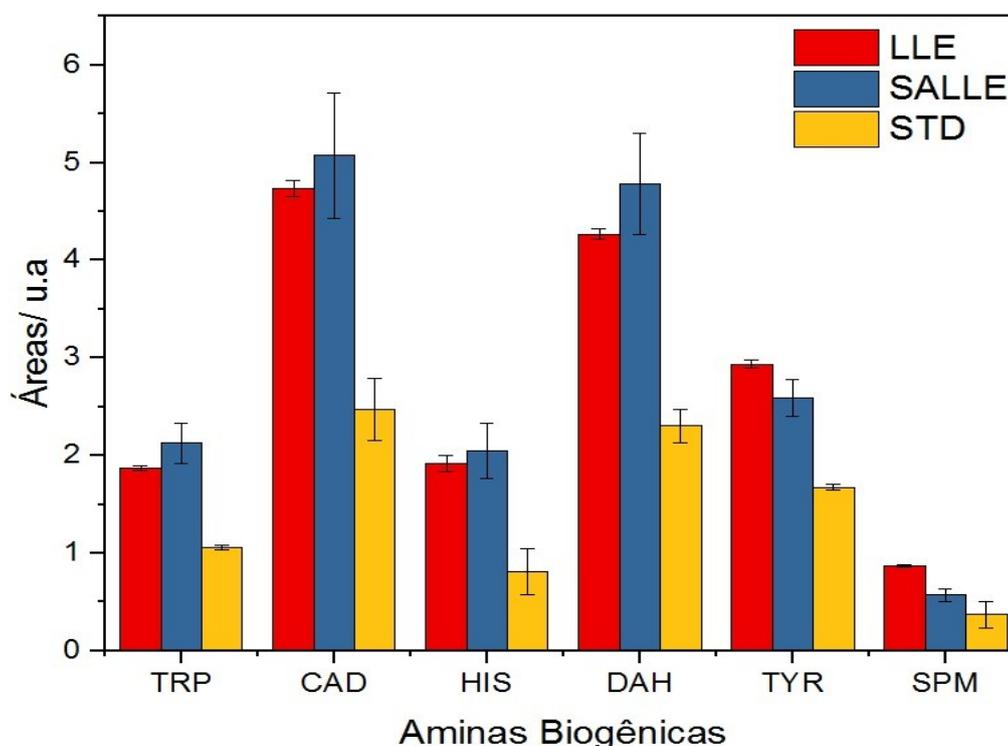
Fonte: Próprio autor

O desvio padrão relativo (DPR) das replicatas foi significativamente alto, os quais foram maiores que 10%. Devido a esse fato, os métodos de extração foram modificados para diminuir o DPR. Na LLE, observar o limite entre a fase orgânica e aquosa é difícil, pois ambas são translúcidas; então, a alíquota retirada da fase orgânica foi modificada para um volume de $500 \mu\text{L}$. Na SALLE, experimentou-se utilizar o éter etílico como solvente de extração, com uma adição de $500 \mu\text{L}$, antes da solução de DNS-Cl, e uma segunda adição de $500 \mu\text{L}$ após a reação com amônia. Conforme os resultados de Ramos e colaboradores (2014), os sinais analíticos são maiores quando o solvente de extração está presente durante a reação de derivatização das ABs.

As áreas das análises com as extrações modificadas são mostradas na Figura 12. Em comparação às áreas da análise sem extração, os sinais com extração foram 2,0 e 1,96 vezes maiores para a LLE e SALLE modificados,

respectivamente. Ademais, os DPR para extrações SALLE, de 10,9%, e LLE, 1,9%, foram menores que as extração sem modificação, porém apenas o método LLE apresentou DPR inferior a 8%, o recomendado pela AOAC international (2016). Os sinais com extração SALLE com e sem modificação permaneceram similares. Diferentemente, os sinais da extração LLE sem modificação foram 2,2 vez maior que o extração LLE modificada, essa diferença está de acordo com a modificação da extração LLE, pois retira-se uma alíquota de 500 μ L em vez de 1 mL; Como a quantidade do analito retirado é a metade, o sinal analítico foi a metade do sinal observado para a extração LLE sem modificação. A técnica LLE modificada foi selecionada para as análises subsequentes, pois apresentou o menor DPR e promoveu um aumento no sinal dos analitos e eliminou os subprodutos da reação do DNS-Cl. A extração das ABs derivadas com DNS-Cl diminuiu a quantidade dos subprodutos presentes no cromatograma e também, aumentou os sinais analíticos das ABs.

Figura 12 - Valores médios das áreas com técnicas de extração modificadas (LLE e SALLE) e sem extração (STD) das ABs derivadas a 100 mg L⁻¹.



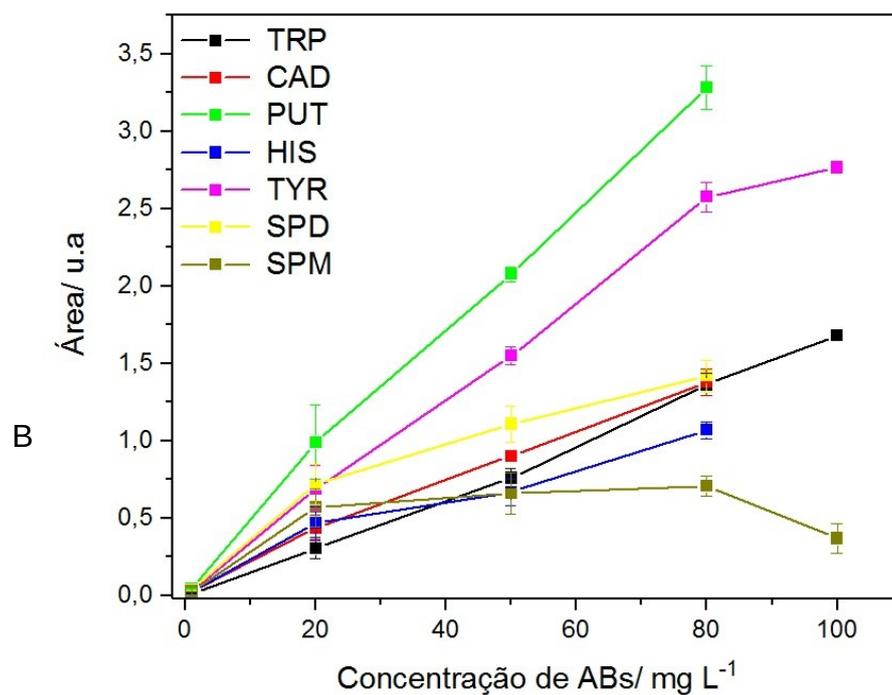
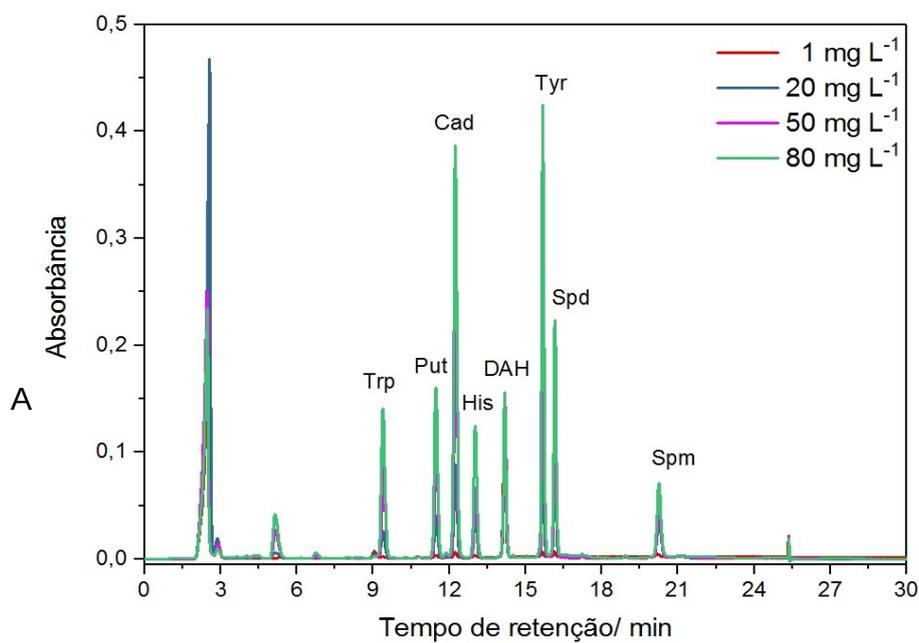
Fonte: Próprio autor

4.1.3 Curva de calibração com padrão externo

Na Figura 13 são apresentadas as áreas da calibração de cada ABs numa faixa de concentração de 1 mg L^{-1} a 100 mg L^{-1} , as áreas foram obtidas em 254 nm. A TRP (9,3 min) e a TYR (15,6 min) apresentaram um comportamento linear em todo a faixa de concentração estudada. As aminos biogênicas PUT (11,4 min), CAD (12,2 min) e HIS (13,0 min) tiveram um comportamento linear no intervalo de concentração de 1 mg L^{-1} a 80 mg L^{-1} . Por outro lado, as aminos SPD (16,1 min) e SPM (20,2 min) não apresentaram uma variação linear. Além disso, as separações foram realizadas com sucesso, pois as resoluções de separação das ABs de 2,9 a 16,5 (Apêndice 2).

Na Tabela 4 são mostradas as equações da curva de calibração para as ABs, coeficiente de correlação, LD e LQ. Como a SPD (16,1 min) e a SPM (20,2 min) não apresentaram comportamento sinal linear proporcional à concentração das aminos, o método não contempla essas aminos nas faixas de concentração estudadas. Na literatura é bem conhecido que essas aminos biogênicas de cadeia mais longas apresentam comportamento linear apenas com as concentrações maiores de DNS-Cl (RAMOS e colaboradores, 2014). Para isto exige-se uma concentração de 10 mg L^{-1} de DNS-Cl para reagir com a espermidina e espermina.

Figura 13 - Cromatograma das ABs derivadas com DNS-Cl (A). Curva de calibração para determinação das ABs derivadas com DNS-Cl (B).



Fonte: Próprio autor.

Tabela 4 - Parâmetros analíticos da calibração do método análise por CLAE usando LLE. Resultados obtidos em 254 nm.

Analito	Equação da reta	R²	Faixa/ mg L⁻¹	LD/ mg L⁻¹
TRP	$Y = 1,71(\pm 0,06) \times 10^4 C - 3,40(\pm 3,26) \times 10^4$	0,996	1 - 100	0,2
PUT	$y = 1,79(\pm 0,02) \times 10^4 C + 0,29(\pm 0,06) \times 10^4$	0,999	1 - 80	0,2
CAD	$Y = 4,14(\pm 0,04) \times 10^4 C + 0,16(\pm 0,05) \times 10^4$	0,999	1 - 80	0,1
HIS	$y = 1,34(\pm 0,08) \times 10^4 C + 0,66(\pm 0,18) \times 10^4$	0,988	1 - 80	0,3
TYR	$Y = 2,83(\pm 0,08) \times 10^4 C + 0,06(\pm 0,55) \times 10^4$	0,996	1 - 100	0,2

Fonte: Próprio autor.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método proposto, para a calibração das ABs derivadas com DNS-Cl, avaliou-se a absorção no comprimento de onda 218 nm, pois no espectro de absorção (Apêndice 1) existem máximos de absorção em 254 nm e 218 nm. Na Tabela 5, as equações apresentadas são dos sinais obtidos com absorção em 218 nm. Comparando a sensibilidades (coeficiente angular) das curvas de calibração obtidas em 218 nm, com as de 254 nm, para cada amina biogênica foi observado um aumento de 313% para TRP, 176% para PUT, 174% para CAD, 178% para HIS e 218% para TYR, corroborando com os resultados de ZAZZU e colaboradores (2019). Entretanto, o LD permanece o mesmo em ambos comprimentos de onda, pois o ruído da linha de base aumenta em 218 nm o que torna difícil detectar concentrações menores das ABs derivadas com DNS- Cl.

Tabela 5 - Parâmetros analíticos da calibração do método análise por CLAE usando LLE. Resultados obtidos em 218 nm.

Analito	Equação da reta	R²	Faixa/ mg L⁻¹	LD/ mg L⁻¹
TRP	$Y = 7,07(\pm 0,21) \times 10^4 C - 9,74(\pm 13,2) \times 10^4$	0,996	1 - 100	0,1
PUT	$Y = 4,94(\pm 0,25) \times 10^4 C + 14,5(\pm 12,3) \times 10^4$	0,992	1 - 80	0,2
CAD	$Y = 11,35(\pm 0,53) \times 10^4 C + 28,6(\pm 25,6) \times 10^4$	0,993	1 - 80	0,1
HIS	$Y = 3,73(\pm 0,23) \times 10^4 C + 1,86(\pm 0,62) \times 10^4$	0,988	1 - 80	0,2
TYR	$Y = 9,01(\pm 0,07) \times 10^4 C - 0,72(\pm 0,24) \times 10^4$	0,999	1 - 100	0,1

Fonte: Próprio autor.

4.1.4 Análise das amostras

O método CLAE com a extração LLE foi aplicado para determinar a concentração das ABs em amostras de queijo. As concentrações encontradas nas amostras são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de ABs em mg L⁻¹ em amostras de queijo.

Analito	QCCS	QCSS	QM
TRP	<LQ	3 ± 1	4 ± 1
PUT	4 ± 3	4 ± 1	<LQ
CAD	6 ± 1	19 ± 1	<LQ
HIST	<LQ	3 ± 1	1 ± 1
TYR	8 ± 5	17 ± 1	1 ± 1
SOMA	18	46	6

Fonte: Próprio autor

A concentração das HIS em todas as amostras está abaixo dos níveis estabelecidos como limites toleráveis. Entretanto, a concentração das outras ABs foram maiores que os níveis de HIS. Nas amostras QCCS e QCSS foram detectadas CAD e PUT no mínimo no mesmo nível da HIS. O conteúdo total das ABs encontradas foram de 18 mg L⁻¹, 46 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹ para as amostras QCCS, QCSS e QM, respectivamente, onde apenas de 7% a 26% corresponderam a HIS. Todas amostras estão em conformidade, pois apresentaram valores de HIS inferiores aos definidos pelas agências reguladoras (mínimo de 50 mg kg⁻¹ para [FDA, 2005]).

A amostra de QM possui as menores concentrações de ABs, pois todo o processo de fabricação é conduzido a uma temperatura elevada (próxima 100°C). Ao contrário das amostras amostras QCCS e QCSS, as quais não possuem etapas de longa exposição ao calor. A exposição a elevadas temperaturas é uma forma eficiente para eliminar microrganismos, e quanto maior o tempo de exposição menos microrganismos restaram (AQUARONE e colaboradores, 2001). A amostra QCSS

apresentou quantidade de ABs maior que a amostra QCCS, apesar do modo de produção ser similar, a adição de salmoura suprime o desenvolvimento de microrganismos e, portanto, há uma baixa formação de ABs exógenas.

Tabela 7 - Recuperação percentual das concentrações encontradas após adição de cada uma das ABs.

		Recuperação/ %			
Amostra	Analito	10 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹	30 mg L ⁻¹	Média
QCCS	TRP	78 ± 4	78 ± 4	106 ± 5	87
	PUT	122 ± 3	119 ± 5	69 ± 2	104
	CAD	83 ± 6	106 ± 6	75 ± 3	88
	HIS	97 ± 7	110 ± 3	111 ± 4	106
	TYR	88 ± 7	89 ± 10	78 ± 2	85
QCSS	TRP	111 ± 2	103 ± 4	103 ± 4	106
	PUT	84 ± 6	94 ± 4	97 ± 5	92
	CAD	81 ± 3	86 ± 4	93 ± 5	87
	HIS	115 ± 3	77 ± 2	85 ± 5	93
	TYR	115 ± 7	77 ± 5	85 ± 7	93
QM	TRP	95 ± 2	99 ± 2	104 ± 3	99
	PUT	113 ± 3	75 ± 2	72 ± 1	87
	CAD	77 ± 2	88 ± 1	99 ± 2	88
	HIS	77 ± 2	88 ± 3	99 ± 2	88
	TYR	110 ± 3	108 ± 1	84 ± 2	101

Fonte: Próprio autor.

A recuperação foi realizada para avaliar o efeito de matriz da amostra no método de extração LLE e análise CLAE. Três níveis de concentração foram adicionados de cada uma das ABs, as concentrações testadas foram 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹ e 30 mg L⁻¹. Na Tabela 7 são mostrados os percentuais das concentrações encontradas após adição de padrão dos analitos. A faixa de recuperação para todas as amostras foi de 69,3% a 122%. Na Tabela 8 este resultado de recuperação foi comparado com outros métodos de CLAE para análise de ABs em queijos descritos na literatura: Os métodos que empregam LLE, como VALE; GLÓRIA (1997) e ZAZZU e colaboradores (2020), e que não empregam, como INNOCENTE e colaboradores

(2020), possuem uma faixa de recuperação média das ABs de 72% a 98%, 82% a 99% e 67% a 98%, respectivamente, portanto o intervalo de recuperação deste método está em concordância com outros propostos; Para um método sem técnica de extração a variação do desvio padrão da recuperação foi de 2% a 5% pois com menos etapas o erro final gerado é menor, enquanto que as LLE possuem uma faixa maior – O método mais antigo (Vale; Glória. 1997) possui um intervalo de 2% a 28% usando um volume de 150 mL do solvente para extração, um método mais recente (ZAZZU e colaboradores, 2020) conseguiu uma faixa de 2% a 12% usando 3 mL do mesmo solvente. O método proposto possui um intervalo de 2% a 10% usando a metade do volume anterior, 1,5mL. De fato, o método proposto possui desempenho similar, ou melhor, a outros já propostos na literatura com a vantagem de utilizar um volume menor do solvente de extração (1,5 mL).

Tabela 8 - Comparação com métodos cromatográficos para análises de ABs em queijos.

Referência	Solvente de extração	Reagente	Intervalo	
			Recuperação	Desvio padrão
VALE; GLÓRIA (1997)	150 mL	DNS-CI	72% - 98%	2% - 28%
INNOCENTE e colaboradores (2007)	-	DNS-CI	67% - 98%	2% - 5%
ZAZZU e colaboradores (2020)	3 mL	DNS-CI	82% - 99%	2% - 12%
Este trabalho	1,5 mL	DNS-CI	87% - 106%	2% - 10%

Fonte: Próprio autor.

5 CONCLUSÃO

O método de CLAE para determinação de HIS, TRP, PUT, CAD e TYR derivadas com DNS-Cl e extração LLE foi desenvolvido para analisar amostras de queijos. Os sinais das análises com extração LLE foram em média 2,2 vezes maior para todas as ABs estudadas, em comparação com as análises sem extração. Usando o comprimento de onda de 218 nm a sensibilidade é, no mínimo, 2,7 vezes maior que a obtida em 254 nm. O método apresentou uma faixa dinâmica linear de concentração de 1 mg L^{-1} a 80 mg L^{-1} , com limite de detecção de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. O recuperação percentual no intervalo de 87% e 106%. O método proposto possui desempenho similar, ou melhor, a outros já propostos na literatura com a vantagem de utilizar um volume menor do solvente de extração (1,5 mL)

As ABs foram determinadas em amostras de queijos. As amostras QCSS, QCCS e QM apresentaram conteúdo de 46 mg L^{-1} , 18 mg L^{-1} , e 5 mg L^{-1} de ABs totais, respectivamente. A concentração de HIS encontradas nas amostras de queijo são inferiores aos níveis estimados para alimentos pelo órgãos reguladores. Entretanto, os níveis de HIS encontradas corresponderam no intervalo de 7% a 26% do conteúdo total de aminos determinadas.

REFERÊNCIAS

- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. **Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce**. Journal of AOAC International, 86, 2, 2003.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial, volume 4**. Editora Blucher, São Paulo, 2001.
- BAI, X.; BYUN, B.; MAH, J. H. **Formation and destruction of biogenic amines in Chunjang (a black soybean paste) and Jajang (a black soybean sauce)**. Food Chemistry, 141, 1026-1031, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.054.
- BEN-GIGIREY, B.; SOUZA, J. M. V. B.; VILLA, T. G.; BARROS-VELAZQUEZ, J. **Changes in Biogenic Amines and Microbiological Analysis in Albacore (Thunnus alalunga) Muscle during Frozen Storage**. Journal of Food Protection, 61 (5), 608-615, 1998. DOI: 10.4315/0362-028X-61.5.608.
- BULUSHI, I.; POOLE, S.; DEETH, H; DIKES, G. A.; **Biogenic Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation—A Review**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 49, 4, 2009. DOI: 10.1080/10408390802067514.
- BUNKOVÁ, L.; ADAMCOVA, G.; HUDCOVÁ, K.; VELICHOVÁ, H.; PACHLOVA, V.; LORENCOVÁ, E.; BUNKA, F. **Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic**. Food Chemistry, 141, 548-551, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.036.
- BYUN, Y.; MAH, J. H. **Occurrence of Biogenic Amines in Miso, Japanese Traditional Fermented Soybean Paste**. Journal of Food Science, 77 (12), 2012. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02983.x.
- CHIACCHIERINI, E.; RESTUCCIA, D.; VINCI, G. **Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products**. Talanta, 69, 548-55, 2006. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.10.027.
- CIRILO, M. P. G.; COELHO, A. F. S.; ARAÚJO, C. M.; GONÇALVES, F. R. B.; NOGUEIRA, F. D.; GLÓRIA, M. B. A. **Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee**. Food Chemistry, 82, 397-402, 2003. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00560-5.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, editora UNICAMP, 2006.

CUNHA, S. C.; LOPES, R.; FERNANDES, J. O. **Biogenic amines in liqueurs: Influence of processing and composition**. Journal of Food Composition and Analysis, 56, 147-155, 2017. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.11.016.

CURRIE, L. A. **Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities** (IUPAC Recommendations 1995). Pure Appl. Chem., 67, 10, pág. 1699-1723, 1995. DOI: 10.1351/pac199567101699.

D'SOUZA, M. J.; MCANENY, M. J.; KEVILL, D. N.; KYONG, J. B.; CHOI, S. H. **Kinetic evaluation of the solvolysis of isobutyl chloro- and chlorothioformate esters**. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 7, 543-552, 2011. DOI: 10.3762/bjoc.7.62.

DADÁKOVÁ, E.; KRÍZEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. **Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)**. Food Chemistry, 116, 365-370, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018.

EEA, European Environment Agency. **Regulamento da Comissão nº 1019/2013 de 23 de outubro de 2013**.

EEROLA, S.; HINKKANEN, R.; LINDFORS, E.; HIRVI, E. L. **Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Dry Sausages**. Journal of AOAC international, 76 (3), 1993. DOI:10.1093/jaoac/76.3.575.

EFSA, European Food Safety Authority. **Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods**. EFSA journal, 9 (10), 2393, 2011.

FDA, Food and Drug Administration. **CPG Sec 540.525 Decomposition and Histamine Raw, Frozen Tuna and Mahi-Mahi; Canned Tuna; and Related Species**. Novembro de 2005.

GÁRCIA-MARINO, M.; TRIGUEIROS, A.; ESCRIBANO-BAILÓN, T. **Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines**. Journal of Food Composition and Analysis, 23, 455-462, 2010. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.02.003.

GOMES, M. B.; PIRES, B. A. D.; FRACALANZZA, S. A. P.; MARIN, V. A. **O risco das aminas biogênicas nos alimentos**. Ciência & Saúde Coletiva, 19 (4), 1123-1134, 2014. DOI: 10.1590/1413-81232014194.18672012.

GONG, X.; QI, N.; WANG, X.; LIN, L.; LI, J. **Ultra-performance convergence chromatography (UPC2) method for the analysis of biogenic amines in fermented foods**. Food Chemistry, 162, 172-175, 2014. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.04.063.

GUO, X.; GUAN, X.; WANG, Y.; LI, L.; WU, D.; CHEN, Y.; PEI, H.; XIAO, D.

Reduction of biogenic amines production by eliminating the PEP4 gene in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of Chinese rice wine. Food Chemistry, 178, 208-211, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.089.

HARRIS, D. **Quantitative Chemical Analysis.** Editora W. H. Freeman and Company, W. H. Freeman and Company 9ª edição, 2016.

He Ruihua. "**Preparation method of compound dansyl chloride**". Nº CN102887841A, 23 de novembro de 2012.

HE, Y.; ZHAO, X. E.; WANG, R.; WEI, N.; SUN, J.; CHEN, G.; LIU, Z.; ZHU, S.; YOU, J. **Simultaneous Determination of Food-Related Biogenic Amines and Precursor Amino Acids Using in Situ Derivatization Ultrasound- Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction by Ultra-High- Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64, 8225-8234, 2016. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b03536.

HU, Y.; HUANG, Z.; LI, J.; YANG, H. **Concentrations of biogenic amines in fish, squid and octopus and their changes during storage.** Food Chemistry, 135, 2604-2611, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.121.

HUANG, J.; GAN, N.; LV, F.; CAO, Y.; OU, C.; TANG, H. **Environmentally friendly solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of biogenic amines in fish samples.** Journal of Separation Science, 39, 4384-4390, 2016. DOI: 10.1002/jssc.201600893.

INGLE, J.; CROUCH, S. **Spectrochemical Analysis.** Editora Prentice-Hall International, Estados Unidos da América, 1988.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. **Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract.** Food Chemistry, 101, 1285-1289, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.12.026.

ISHIMARU, M.; MUTO, Y.; NAKAYAMA, A.; HATATE, H.; TANAKA, R. **Determination of Biogenic Amines in Fish Meat and Fermented Foods Using Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection.** Food Analytical Methods, 12, 166-175, 2019. DOI: 10.1007/s12161-018-1349-0.

JACOBS, W.; LEBURG, E.; MADAJ, E. **Stability of o-phthalaldehyde-derived isoindoles.** Analytical Biochemistry, 156 (2), 1986. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90262-9.

JAIN, A.; GUPTA, M.; VERMA, K. K.; **Salting-out assisted liquid-liquid extraction**

for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1422, 60-72, 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.10.036.

JIA, S.; KANG, Y. P.; PARK, J. H.; LEE, J. KWON, S. W. **Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1218, 9174-9182, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.040.

JIN, Y. H.; LEE, J. H.; PARK, Y. K.; LEE, J. H.; MAH, J. H. **The Occurrence of Biogenic Amines and Determination of Biogenic Amine-Producing Lactic Acid Bacteria in Kkakdugi and Chonggak Kimchi.** Foods, 8, 73, 2019. DOI: 10.3390/foods8020073.

JUBELE, A. **CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF AMINES IN FOOD SAMPLES.** Finlândia, Universidade de Helsinki, Faculdade de ciências, Departamento de química, Tese de mestrado, 2018. Disponível em : <<https://helda.helsinki.fi/handle/10138/273519>>.

LEE, J. H.; JIN, Y. H.; PARK, Y. K.; YUN, S. J.; MAH, J. H. **Formation of Biogenic Amines in Pa (Green Onion) Kimchi and Gat (Mustard Leaf) Kimchi.** Foods, 8, 109, 2019. DOI: 10.3390/foods8030109.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. **“GREEN CHEMISTRY” – OS 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE E SUA INSERÇÃO NAS ATIVIDADES DE ENSINO E PESQUISA.** Química Nova, 26, 1, 123-129, 2003. DOI: 10.1590/S0100-40422003000100020.

LI, Y.; YANG, H.; LIAO, H.; FAN, H.; LIANG, C.; DENG, L.; JIN, S. **Simultaneous determination of ten biogenic amines in a thymopolypeptides injection using ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, 929, 33-39, 2013. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.03.025.

LIU, Y.; HAN, F.; LIU, Y.; WANG, W. **Determination of Biogenic Amines in Wine Using Modified Liquid-Liquid Extraction with High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector.** Food Analytical Methods, 13, 911-922, 2020. DOI: 10.1007/s12161-020-01710-w.

MAH, J. H.; HAN, H. K.; OH, Y. J.; Kim, M. G. ; Hwang, H. J. **Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products.** Food Chemistry, 79, 239-243, 2002. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00150-4.

MANTOANELLI, J. O. F.; GONÇALVES, L. M.; PEREIRA, E. A. **Dansyl Chloride as a Derivatizing Agent for the Analysis of Biogenic Amines by CZE-UV.** Chromatography, 83, 767-778, 2020. DOI: 10.1007/s10337-020-03896-x.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 183 de 13 de maio de 1997.

MOHAMMADI, M.; KAMANKESH, M.; HADIAN, Z.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, A. **Determination of Biogenic Amines in Cheese Using Simultaneous Derivatization and Microextraction Method Followed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry**. *Chromatographia*, 80, 119-126, 2017. DOI: 10.1007/s10337-016-3217-7.

ONAL, A. **A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods**. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028.

PÁL, M.; SZALAI, G.; JANDA, T. **Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling**. *Plant Science*, 237, 16-23, agosto de 2015. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003.

PINEDA, A.; CARRASCO, J.; PEÑA-FARFAL, C.; HERNRÍQUEZ-AEDO, K.; ARANDA, M. **Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC**. *Food Control*, 23, 251-257, 2012. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.07.025.

PINTO, L.; NIETO, C. H. D.; ZÓN, M. A.; FERNÁNDEZ, H.; ARAUJO, M. C. U. **Handling time misalignment and rank deficiency in liquid chromatography by multivariate curve resolution: Quantitation of five biogenic amines in fis**. *Analytica Chimica Acta*, 902, 59-69, 2016. DOI: 10.1016/j.aca.2015.10.043.

PLAKIDI, E. S.; MARAGOU, N. C.; DASENAKI, M. E.; MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A.; THOMAIDIS, N. S. **Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Fish Based on Pyrene Sulfonyl Chloride Pre-Column Derivatization**. *Foods*, 9, 609, 2020. DOI: 10.3390/foods9050609.

PLOTKA-WASYLKA, J. M.; MORRISON, C.; BIZIUK, M.; NAMIEŚNIK, J. **Chemical Derivatization Processes Applied to Amine Determination in Samples of Different Matrix Composition**. *Chemical Reviews*, 115, 4693-4718, 2015. DOI: 10.1021/cr4006999.

PLOTKA-WASYLKA, J.; SIMEONOV, V.; NAMIEŚNIK, J. **An in situ derivatization – dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas-chromatography – mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks**. *Journal of Chromatography A*, 1453, 10-18, 2016. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.05.052.

PLOTKA-WASYLKA, J.; SIMEONOV, V.; NAMIEŚNIK, J. **Evaluation of the Impact of Storage Conditions on the Biogenic Amines Profile in Opened Wine Bottles**. *Molecules*, 23, 1130, 2018. DOI: 10.3390/molecules23051130.

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*, 124,146-151, 2014. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.02.026.

RESTUCCIA, D.; LOIZZO, M. R.; SPIZZIRRI, U. G. **Accumulation of Biogenic Amines in Wine: Role of Alcoholic and Malolactic Fermentation.** *Fermentation*, 4, 2018. DOI: 10.3390/fermentation4010006.

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U. G.; PARISI, O. I.; CIRILLO, G.; PICCI, N. **Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV.** *Food Chemistry*, 175, 143-150, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.134.

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U. G.; PUOCI, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O. I.; LEMMA, F.; PICCI, N. **A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector.** *Talanta*, 85, 363-369, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.03.080.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANE, S. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.** *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9, 2006. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.007.

RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, A. **Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice.** *Food Research International*, 34 (5), 441-447, 2001. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00189-7.

SAAID, M.; SAAD, B.; HASHIM, N. H.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I. **Determination of biogenic amines in selected Malaysian food.** *Food Chemistry*, 113, 1356-1362, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.070.

SAAID, M.; SAAD, B.; RAHMAN, I. A.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I. **Extraction of biogenic amines using sorbent materials containing immobilized crown ethers.** *Talanta*, 80, 1183-1190, 2010. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.09.006.

SANGRATINI, G.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; BERADINIS, F.; FONT, G.; VITTORI, S.; MAÑES, J. **Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Food Chemistry*, 132, 537-543, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.054.

SELF, R. L.; WU, W. H.; MARKS, H. S. **Simultaneous Quantification of Eight Biogenic Amine Compounds in Tuna by Matrix Solid-Phase Dispersion followed by HPLC-Orbitrap Mass Spectrometry.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5906-5913, 2011. DOI: 10.1021/jf200455r.

SIQUEIRA, K.; SCHETTINO, J. P. J. **O consumo de queijos pelos brasileiros.**

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª ed. norte americana, editora Thomson, 2006.

SOUZA, A. L. M.; CALIXTO, F. A. A.; MESQUITA, E. F. M.; PACKNESS, M. P.; AZEREDO, D. P. **Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura**. Arquivo do Instituto Biológico, 82, 1-11, 2015. DOI: 10.1590/1808-1657000382013.

TAMEEM, A. A.; SAAD, B.; MAKAHLEH, A.; SALHIN, A.; SALEH, M. I. **A 4-hydroxy-N'-[(E)-(2-hydroxyphenyl)methylidene]benzohydrazide based sorbent material for the extraction-HPLC determination of biogenic amines in food samples**. Talanta, 82, 1385-1391, 2010. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.004.

VALE, S. R.; GLÓRIA, M. B. A. **Determination of Biogenic Amines in Cheese**. Journal of AOAC International, 80, 5, 1997. DOI: 10.1093/jaoac/80.5.1006.

VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A. **Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures**. Inês. Journal of Chromatography A, 1308, 58-62, 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.08.014.

VAUGHAN, J. R.; OSATA, R. L. **The Preparation of Peptides Using Mixed Carbonic-Carboxylic Acid Anhydrides**. Journal of the American Chemical Society, 74 (3), 676-678, 1952. DOI: 10.1021/ja01123a028.

VECIANA-NOGUÉS, M. T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. **Biogenic Amines as Hygienic Quality Indicators of Tuna. Relationships with Microbial Counts, ATP-Related Compounds, Volatile Amines, and Organoleptic Changes**. Journal Agric. Food Chem., 45, 2036-2041, 1997. DOI: 10.1021/jf960911l.

VINCI, G.; ANTONELLI, M. L. **Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat**. Food Control, 13, 519-524, 2002. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00031-2.

WU, H.; LI, G.; LIU, S.; JI, Z.; ZHANG, Q.; HU, N.; SUO, Y.; YOU, J. **Simultaneous Determination of Seven Biogenic Amines in Foodstuff Samples Using One-Step Fluorescence Labeling and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by HPLC-FLD and Method Optimization Using Response Surface Methodology**. Food Analytical Methods, 8, 685-695, 2015. DOI: 10.1007/s12161-014-9943-2.

ZAZZU, C.; ADDIS, M.; CAREDDA, M.; SCINTU, M. F. **Biogenic Amines in Traditional Fiore Sardo PDO Sheep Cheese: Assessment, Validation and Application of an RP-HPLC-DAD-UV Method**. Separations, 6, 11, 2019. DOI: 10.3390/separations6010011.

ZUMAN, P. **Reactions of Orthophthalaldehyde with Nucleophiles**. Chemical Reviews, 104, 7, 2004. DOI: 10.1021/cr0304424.

