



ESTG



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Rafaela Mariz Dias

DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS

2019

DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS

Implementação de uma metodologia em produtos cárneos

Rafaela Mariz Dias



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Rafaela Mariz Dias

DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS

Implementação de uma metodologia em produtos cárneos

Mestrado em Engenharia Alimentar
Dissertação / Química Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Preciosa Pires
e Coorientação da
Professora Doutora Manuela Vaz Velho

Novembro de 2019

Agradecimentos

Esta dissertação só foi possível graças à colaboração e contributo de várias pessoas na qual expressei os seguintes agradecimentos e reconhecimento, em particular:

À Professora Doutora Preciosa Pires pela orientação crítico-científica, disponibilidade e interesse demonstrado.

À Professora Doutora Manuela Vaz Velho pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo apoio que sempre demonstrou nos meus projetos profissionais.

À Minho Fumeiro - Enchidos e Fumados à moda de Ponte Lima, Lda., a disponibilização das amostras para realização do estudo.

A todo o pessoal técnico e colegas do departamento de Engenharia Alimentar pelo apoio, em particular à Engenheira Susana Rocha, à Catarina Vieito, à Diana Barros e ao Ricardo Pinto.

Ao laboratório IDEALQ pelo acolhimento e por toda a cooperação, logística, flexibilidade e suporte na realização deste trabalho e ao professor Mário Barros pela colaboração prestada.

Aos meus amigos pelo apoio e distração dado quando eu mais precisava. Em especial à Ana Maria por todo o companheirismo, amizade e por nunca me deixar ir abaixo nem morrer à fome com todas aquelas tostas mistas que enchem o corredor com um agradável aroma de fazer invejar a quem por lá passasse.

À Dona Luísa Imperadeiro por toda a ajuda, preocupação, disponibilidade e logística, principalmente de uma certa água destilada que teima em escassear. Obrigada pela amizade e simpatia que sempre teve comigo, em todos os momentos, e por todos os cafés que partilhámos juntas que sempre me deram força para continuar mais um dia.

À Doutora Élia Fernandes por tudo o que fez por mim! Por toda a sua disponibilidade e ajuda sempre dada. Obrigada pela amizade e carinho ao longo destes meses, pelos puxões de orelhas quando eu precisava e por sempre me apoiar na realização deste trabalho. Desculpe os cabelos brancos que lhe posso ter dado.

À minha família em especial à minha avó por todos os mimos e por todo o apoio que me dá diariamente, aos meus pais por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, à Safira por sempre arrancar de mim um sorriso num final de um dia cansativo e à minha Mini Me pelo companheirismo, força e conselhos sempre dados ao longo destes meses e por continuarmos a apoiar e ajudar uma à outra mesmo seguindo áreas diferentes.

Ao Ramires por todo o amor, carinho e paciência ao longo destes longos meses e por nunca deixar de acreditar em mim.

A todos um Muito Obrigada.

Declaro que a presente dissertação é da minha autoria e o seu conteúdo não foi utilizado previamente noutro curso ou unidade curricular, desta ou de outra instituição. As referências a outros autores (afirmações, ideias, pensamentos) respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, e encontram-se devidamente indicadas no texto e nas referências bibliográficas, de acordo com as normas de referência. Tenho consciência de que a prática de plágio e autoplágio constitui um ilícito académico.

RESUMO

As aminas biogénicas são substâncias formadas durante o processo de fermentação dos enchidos e, em concentração elevada, são prejudiciais para os consumidores.

Este estudo tem como objetivo a determinação de aminas biogénicas em produtos cárneos curados após a adição de uma cultura *starter* de bactéria do ácido láctico (LAB) ao longo do tempo de armazenamento do produto.

Amostras de enchidos tradicionais portugueses, alheira, salpicão e lombo, foram estudadas quanto à presença de seis aminas biogénicas. As concentrações de triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina foram determinadas durante o período de armazenamento de 90 dias para alheira e 180 dias para salpicão e lombo em intervalos de 15 dias. As aminas foram extraídas (extração sólido-líquido) e derivatizadas por dois métodos diferentes, método descrito por Eerola *et al.* (1993) e método AOAC (1999) e a sua quantificação foi efetuada por HPLC com detetor de UV. O estudo foi realizado em amostras com e sem adição de cultura *starter* para comparação.

No método baseado em Eerola *et al.* (1993) os resultados mínimos e máximos das concentrações obtidas de aminas são de 8 mg/kg e 23487 mg/kg, respetivamente. Devido à elevada dispersão dos valores obtidos estudou-se um método analítico alternativo. Com o método da AOAC foram obtidos resultados mais concordantes. Os valores mínimos e máximos foram de 0,06 mg/kg e 476 mg/kg, respetivamente, nos três produtos estudados com e sem cultura. Estes valores não ultrapassam os níveis toxicológicos sugeridos na literatura, à exceção do salpicão que apresenta concentrações de putrescina superiores. Os resultados indicam que a adição da cultura *starter* LAB não afeta as características de qualidade das amostras estudadas no respeitante à presença das aminas biogénicas determinadas.

Palavras Chave: Aminas Biogénicas, Enchidos Portugueses, Produtos Cárneos, Culturas *Starter*, HPLC

ABSTRACT

The biogenic amines are substances formed during the fermentation process of sausages and in high concentration are harmful to consumers.

This study aims to determine biogenic amines in cured meat products after the addition of a starter culture of lactic acid bacteria (LAB) over the product's storage time.

Samples of traditional Portuguese sausages like "Alheira", "Salpicão" and "Lombo" were studied for the presence of six biogenic amines. Tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine and tyramine concentrations were determined during storage time of 90 days for "Alheira" and 180 days for "Salpicão" and "Lombo" at intervals of 15 days. Amines were extracted (solid-liquid extraction) and derivatized by two different methods, described by Eerola *et al.* (1993) and AOAC method (1999) and quantified by HPLC with UV detector. The study was carried out on samples with and without the addition of starter culture for comparison.

In the method based on Eerola *et al.* (1993) the obtained minimum and maximum concentrations of amines are 8 mg/kg and 23487 mg/kg, respectively. Due to the high dispersion of the values obtained, an alternative analytical method was studied. More consistent results were obtained with the AOAC method. The minimum and maximum values were 0.06 mg/kg and 476 mg/kg, respectively, in the three products studied with and without culture. These values do not exceed the toxicological levels suggested in the literature apart from "Salpicão" which has higher putrescine concentrations. The results indicate that the addition of the LAB starter culture does not affect the quality characteristics of the studied samples regarding the presence of the determined biogenic amines.

Keywords: Biogenic Amines, Portuguese Sausages, Meat Products, Starter Cultures, HPLC

Resumos em livros de conferências

Pires, P., **Dias, R.**, Barros, M., Fernandes, E., Vaz-Velho, (2019). Effect of starter cultures in six biogenic amine content of traditional portuguese sausages. *XX EuroFoodChem Conference 2019 – Book of Abstracts of the XX EuroFoodChem Congress*. p. 273.

<https://xeurofoodchem.eventos.chemistry.pt/images/livro.pdf>

Dias, R., Barros, M., Vaz-Velho, M., Barros, D., Pereira Pinto, R., Pires, P. (2019). Cadaverine and putrescine contents in traditional Portuguese pork sausages linked to the addition of starter cultures. *13th SafePork 2019 - 13th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in the Pork Chain Proceedings Book*. p.199-201.

https://www.safepork-conference.com/fileadmin/user_upload/MAIN-dateien/web_safepork.pdf

Apresentação em poster

Pires, P., **Dias, R.**, Barros, M., Fernandes, E., Vaz-Velho, (2019). Effect of Starter Cultures in Six Biogenic Amine Content of Traditional Portuguese Sausages. XX EuroFoodChem Conference 2019, 17-19 junho 2019. Porto, Portugal.

Dias, R., Barros, M., Vaz-Velho, M., Barros, D., Pereira Pinto, R., Pires, P. (2019) Cadaverine and putrescine contents in traditional portuguese pork sausages linked to the addition of starter cultures. 13th SafePork 2019 - 13th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in the Pork Chain, 26-29 agosto 2019. Berlim, Alemanha. doi: 10.13140/RG.2.2.31100.28803

Apresentados no Apêndice A

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	v
Abstract	vii
Resumo em livros de conferência	ix
Apresentação em poster	ix
Índice	xi
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xvi
Abreviaturas	xvii
Capítulo I – Introdução	1
1.1 Enquadramento	2
1.2 Alimentos tradicionais portugueses – enchidos e fumados	2
1.3 Aminas Biogénicas	4
1.3.1 Estrutura e classificação	5
1.3.2 Formação de aminas biogénicas	6
1.3.3 Culturas “starter” e a formação de aminas biogénicas	9
1.3.4 Aminas biogénicas em produtos cárneos	9
1.3.5 Aminas biogénicas como indicador de qualidade	11
1.3.6 Efeitos toxicológicos e o seu impacto na saúde humana	12
1.3.7 Determinação de aminas biogénicas	13
1.3.8 Estudos de determinações de aminas biogénicas por HPLC	14
1.4 Objetivos do trabalho	17
Capítulo II – Material e Métodos	18
2.1 Condições gerais	19
2.2 Amostras	19
2.3 Métodos	20
2.3.1 Método 1	21
a. Reagentes	21
b. Material e equipamento	22

c. Preparação dos padrões e reagentes	23
d. Procedimento	23
e. Determinação das aminas biogénicas	25
2.3.2 Método 2	26
a. Reagentes	26
b. Material e equipamento	27
c. Preparação dos padrões e reagentes	28
d. Procedimento	28
e. Determinação das aminas biogénicas	29
f. Índices de aminas biogénicas para aferir a qualidade dos produtos	30
2.4 Condições experimentais do HPLC	31
2.5 Análise estatística	31
Capítulo III – Resultados e Discussão	32
3.1 Método 1	33
3.1.1 Testes preliminares	33
3.1.2 Quantificação de aminas biogénicas nas amostras	40
3.1.3 Aferição do método: Alteração do pH	45
3.2 Método 2	47
3.2.1 Testes preliminares	47
3.2.2 Quantificação de aminas biogénicas nas amostras	50
3.2.3 Repetibilidade do método	60
3.3 Aminas biogénicas como índice de qualidade	61
Capítulo IV– Conclusões e Trabalho Futuro	65
Bibliografia	68
Apêndices	76

Índice de Figuras

Figura 1.1: Estrutura química das ABs em estudo e dos seus precursores.	6
Figura 1.2: Descarboxilação de aminoácidos (adaptado de Erdag <i>et al.</i> (2018)).	7
Figura 1.3: Fatores que influenciam a formação de ABs em produtos cárneos (adaptado de Ruiz-Capillas & Colmenero (2005)).	8
Figura 2.1: Linha cronológica de desenvolvimento dos trabalhos do presente estudo, Método 1 e Método 2.	21
Figura 2.2: Fluxograma da extração das amostras. A: Método original de Eerola <i>et al.</i> (1993); B: Método 1.	24
Figura 2.3: Fluxograma do processo de derivatização. A: Método original de Eerola <i>et al.</i> (1993); B: Método 1.	25
Figura 2.4: Fluxograma da extração das aminas nas amostras ou preparação dos padrões pelo método 2.	29
Figura 2.5: Fluxograma do processo de derivatização do método 2.	29
Figura 3.1: Reação de derivatização de uma amina com Ds (adaptada de Pedrol & Tiburcio (2001)).	33
Figura 3.2: Reação de derivatização da histamina com Ds (adaptada de Ohtsubo <i>et al.</i> (2014)).	33
Figura 3.3: Cromatogramas da experiência 1, mistura da reação e mistura diluída (1:100). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Padrão interno.	37
Figura 3.4: Cromatogramas da experiência 2, mistura da reação e mistura diluída (1:100). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Padrão interno.	37
Figura 3.5: Cromatogramas das experiências 3 e 4 das misturas diluídas (1:100). Identificação dos picos: 1- Cadaverina; 2- Putrescina; 3- Padrão Interno.	38
Figura 3.6: Cromatograma da experiência 5, mistura da reação diluída (1:100). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Padrão interno.	39
Figura 3.7: Concentração de putrescina durante o tempo de armazenamento para as amostras controlo e LAB na alheira (AC e ALAB), no salpicão (SC e SLAB) e no lombo (LC e LLAB) ($R_f=1,25$).	41
Figura 3.8: Concentração de cadaverina durante o tempo de armazenamento para as amostras controlo e LAB na alheira, no salpicão e no lombo ($R_f=1,39$).	42
Figura 3.9: Concentração de histamina durante o tempo de armazenamento para as amostras controlo e LAB na alheira, no salpicão e no lombo ($R_f=1,13$).	43

Figura 3.10: Cromatogramas ampliados da amostra de alheira comercial - estudo de repetibilidade do método (n=3). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Histamina; 4- Padrão interno.	46
Figura 3.11: Diagrama de caixa e bigodes para comparação do M1 modificado e do M2 em cada AB.	48
Figura 3.12: Cromatogramas da repetibilidade do método 2 na amostra de alheira comercial (n=3). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Histamina; 4- Padrão interno.	49
Figura 3.13: Cromatogramas em vista “overlaid” para identificação das seis ABs. Identificação dos picos: 1- Triptamina; 2- Feniletilamina; 3- Putrescina; 4- Cadaverina; 5- Histamina; 6- Padrão Interno; 7- Tiramina.	49
Figura 3.14: Concentração de triptamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,44).	51
Figura 3.15: Concentração de feniletilamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,56).	52
Figura 3.16: Concentração de putrescina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=1,38).	53
Figura 3.17: Concentração de putrescina durante o tempo de armazenamento para as amostras de lombo fatiado em ambos os batchs (n=2) (Rf=1,38).	54
Figura 3.18: Concentração de cadaverina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=1,28).	55
Figura 3.19: Concentração de histamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,98).	56
Figura 3.20: Concentração de histamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,98).	57
Figura 3.21: Concentração de tiramina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,95).	58
Figura 3.22: Análise de componentes principais com a projeção das ABs analisadas (A) e a projeção das amostras (B).	59
Figura 3.23: Total de aminas vasoativas (VAT) durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs.	62
Figura 3.24: Índice de AB (BAI) ao longo do tempo para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs, com os limites sugeridos por Hernández-Jover et al. (1996) e Özogul & Özugol (2020).	63

Figura 3.25: Total de AB (BAT) ao longo do tempo para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs, obtidos com o limite máximo quando estas, possivelmente, apresentam risco para a saúde humana.

64

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Conteúdo de ABs (mg/kg) de estudos de vários autores em produtos cárneos (adaptada de Suzzi & Gardini (2003)).	10
Tabela 1.2: Procedimentos analíticos para a determinação de ABs por HPLC em diferentes estudos.	15
Tabela 2.1: Características dos reagentes utilizados no método 1.	22
Tabela 2.2: Características dos reagentes e dos padrões utilizados no método 2.	27
Tabela 2.3: Gradiente dos eluentes usado no HPLC.	31
Tabela 3.1: Quantidades de reagentes e condições utilizadas na reação de derivatização para as experiências preliminares efetuadas no M1.	35
Tabela 3.2: Condições de reação utilizadas nos testes de derivatização da putrescina e cadaverina.	36
Tabela 3.3: Áreas obtidas nos cromatogramas para cada padrão analisado.	38
Tabela 3.4: Teste de repetibilidade do procedimento efetuado na experiência 5 (mg/kg; n=7).	40
Tabela 3.5: Comparação dos resultados da concentração de histamina obtidos por Rf e pela reta de calibração (mg/kg).	44
Tabela 3.6: Teste de repetibilidade numa amostra de alheira controlo t=45 dias (mg/kg; n=5).	45
Tabela 3.7: Repetibilidade do método modificado (mg/kg; n=3).	46
Tabela 3.8: Comparação dos dois métodos para uma mesma amostra de alheira comercial (mg/kg; n=3).	48
Tabela 3.9: Tempos de retenção obtidos para cada padrão.	50
Tabela 3.10: Teste de repetibilidade e % <i>recovery</i> (mg/kg; n=2).	60
Tabela 3.11: Total de aminas vasoativas (VAT), índice de ABs (BAI) e total da soma das ABs (BAT) em cada produto analisado ao longo do tempo (mg/kg).	61

Abreviaturas

ABs – Aminas biogénicas

ABVT - Azote Basique Volatil Total (Aminas básicas voláteis totais)

EU – European Union (União Europeia)

Exp - Experiência

Ds – Cloreto de dansilo

GC – Gas chromatography (Cromatografia gasosa)

HPLC - High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta resolução)

LC – Liquid chromatography (Cromatografia líquida)

UPLC – Ultra performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de ultra resolução)

IC - Ion chromatography (Cromatografia iónica)

IPLC - Ion-pair liquid chromatography
Cromatografia líquida de pares iónicos

CE - Capillary Electrophoresis (Eletroforese capilar)

PCR - Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

TLC - Thin-layer chromatography
(Cromatografia de camada fina)

MS - Mass spectrometry (Espetrometria de massa)

rpm – Rotações por minuto

Rf – Response Factor (Fator de resposta)

LAB – Lactic acid bacteria (BAL - Bactérias do ácido láctico)

PI – Padrão interno

LOD – Limit of detection (Limite de deteção)

LOQ – Limit of quantification (Limite de quantificação)

M1 – Método 1

M2 – Método 2

DAD – Detetor diode-array

PCA – Principal Component Analysis (Análise de componentes principais)

UV – Ultravioleta

TRIP – Triptamina

FENI - Feniletilamina

PUT – Putrescina

CAD – Cadaverina

HIS – Histamina

TIRA – Tiramina

T_R – Tempo de retenção

CAS - Chemical Abstracts Service

VAT – Vasoactive amines total (Total de aminas vasoativas)

BAI – Biogenic amines index (Índice de aminas biogénicas)

BAT – Biogenic amines total (Total de aminas biogénicas)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

Hoje em dia há uma grande preocupação com a segurança e a qualidade alimentar, tanto a nível das matérias-primas como do produto final. Esta preocupação está relacionada com a potencial contaminação química e microbiológica. Esta contaminação advém da produção de alimentos em grande escala e das contaminações ambientais. Esta preocupação também está relacionada com a dificuldade no acesso a nutrientes. Este tema pode resumir-se no conceito de “Food Safety” e “Food Security”. Com isto, a indústria alimentar tem sido forçada a procurar novos alimentos e novas matérias-primas para combater a falta de qualidade dos produtos alimentares, procurando assim outras técnicas para resolver os problemas relacionados com a contaminação dos alimentos que afetam a saúde pública.

A segurança alimentar é uma preocupação e tendência porque o consumidor está atento e tornou-se mais exigente com a qualidade da alimentação, resultado no aumento da investigação sobre temas relacionados com a saúde pública.

Desde sempre na história da evolução do Homem, a carne tem tido um papel relevante na sua alimentação. A partir da legislação sobre alimentos, o termo carne engloba todas as partes dos animais na sua forma fresca ou processada, de forma adequada para consumo humano. Este termo inclui o tecido de vários músculos contendo mais ou menos tecido adiposo. Em Portugal e no sul da Europa os habitantes são grandes consumidores de produtos cárneos na sua forma processada tais como enchidos e fumados.

Neste trabalho foi desenvolvido um tema inserido no projeto designado como Dem@Biofumados – Demonstrador de Biofumados Tradicionais vs Qualidade – Produção de Enchidos e Fumados Tradicionais Portugueses. Projeto este co-financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) sob o programa Operacional regional do Norte (PONorte). O tema está relacionado com o estudo da qualidade dos enchidos no parâmetro da qualidade relacionada com o conteúdo das aminas biogénicas.

1.2 Alimentos tradicionais portugueses - enchidos e fumados

Os enchidos fermentados e fumados são um dos alimentos tradicionais mais representativos, produzidos e consumidos ao longo da história por várias culturas de diferentes

áreas do mundo. Estes apresentam características específicas típicas de determinadas localizações geográficas com diferentes hábitos alimentares, história, tradições, religião e clima. Estes produtos têm uma grande variedade de *flavours*, cores e textura, constituindo uma parte importante da economia local, principalmente na sua cultura e património gastronómico. Geralmente os enchidos são feitos de carne de porco, misturas de carne de porco e carne bovina, ou apenas carne bovina. As proporções típicas são de 50 a 60% de carne de porco e de 10 a 20% de carne bovina. Outras espécies de animais também podem ser usadas, dependendo do tipo de produto e localização geográfica. Existem vários fatores que afetam a qualidade dos enchidos fumados, como a matéria prima e as condições de maturação que influenciam a textura e no *flavour* do produto final (Toldrá, 2008a).

As tecnologias convencionais de fabrico de enchidos fermentados e fumados e enchidos semi-fumados consiste em misturar carne picada e banha com diferentes especiarias, sal (cloreto de sódio), nitritos e ou nitratos, hidratos de carbono e outros aditivos. A fermentação decorre durante um determinado período e a uma dada temperatura. Após este período o produto é maturado sob condições de temperatura e humidade controladas. Na microflora da carne, as bactérias do ácido láctico (LAB) são as responsáveis pelos principais processos de maturação dos enchidos fermentados. As LAB convertem os glícidos (hidratos de carbono) em ácido láctico e em pequenas quantidades de outros metabolitos, fazendo assim o pH diminuir, melhorando a textura dos produtos e garantindo a estabilidade contra a proliferação de patogénicos alimentares (Ionescu, *et al.*, 2007).

A fermentação é uma técnica de conservação tradicional que estabiliza os produtos cárneos com características sensoriais típicas (Latorre-Moratalla *et al.*, 2008), sendo a fermentação em enchidos feita a partir de carne crua. Em muitos processos esta não é processada com temperatura ou cozinhada, sendo a segurança a nível microbiológico questionável (Hutkins, 2006).

Após o processo de fermentação são aplicados diferentes tratamentos ou combinações destes, como por exemplo a fumagem. O processo de fumagem é um dos processos mais antigos de conservação de produtos alimentares. Este processo confere um sabor característico ao produto e contribui para a sua conservação devido aos efeitos bactericidas e bacteriostáticos dos compostos do fumo. O fumo exerce propriedades antioxidantes devido aos compostos fenólicos presentes no mesmo. Contudo este apresenta efeitos indesejáveis associados à presença de formaldeído e de outras substâncias cancerígenas formadas no processo de fumagem (Toldrá, 2008a).

Na ausência de controlo das condições de higiene, algumas bactérias podem multiplicar-se e, conseqüentemente, reduzir a estabilidade e a segurança do produto. Deste modo, várias características organoléticas dos enchidos podem ser alteradas, tais como a cor, sabor, cheiro e textura. Sob estas condições, algumas substâncias tóxicas, como as amins biogénicas, também se podem formar (Bozkurt & Erkmén, 2004). A presença de amins biogénicas nos alimentos é indesejável, já que para além da sua toxicidade podem estar relacionadas com a formação de nitrosaminas (Toldrá, 2008b).

1.3 Amins biogénicas

As amins biogénicas (ABs) são bases orgânicas de baixo peso molecular que possuem atividade biológica e que podem ser formadas a partir da degradação dos aminoácidos durante o metabolismo normal de animais, plantas e microrganismos (Brink *et al.*, 1990). Nos alimentos estas amins são formadas a partir de reações enzimáticas por ação de microrganismos presentes nas matérias-primas, por uma reação de descarboxilação microbiana de aminoácidos (Erdag, Merhan & Yıldız, 2018).

Na literatura científica é possível encontrar vários estudos sobre ABs, sendo este um tema que há muito se pesquisa. Inicialmente estes estudos tinham como objetivo a análise do conteúdo de histamina no pescado e produtos derivados por imposição da legislação. De acordo com o regulamento da Comissão Europeia nº 2073/2005 de 15 de novembro, nos critérios microbiológicos para produtos da pesca e derivados, relativamente à concentração de histamina, foi estabelecido o limite máximo de 200 mg/kg para peixe fresco e 400 mg/kg para produtos de pesca.

Atualmente este tema foi alargado a outros produtos tais como vinho, cerveja, produtos lácteos, cárneos, legumes, frutas, café, entre outros. Nos alimentos fermentados, como os enchidos e aqueles que são produzidos de matérias-primas com alto teor de proteínas, um dos parâmetros de avaliação da qualidade pode ser o conteúdo em ABs. As ABs podem estar presentes naturalmente nos alimentos em quantidades reduzidas, como em frutas e legumes, carne, peixe, chocolate e leite, mas também podem ser produzidos por microrganismos em grandes quantidades (Suzzi & Gardini, 2003). As “carnes vermelhas” e as “carnes brancas” são particularmente suscetíveis à degradação das proteínas, quando sujeitas a condições favoráveis. Os níveis de ABs nestes tipos de carne, podem estar relacionadas com a deterioração das suas proteínas (Vinci & Antonelli, 2002).

Segundo a FAO/WHO (2013) a quantidade de ABs produzidas depende da concentração de aminoácidos livres presentes, que está relacionada com as espécies de peixes, assim como com a quantidade e atividade das enzimas descarboxilase. A quantidade destas enzimas está relacionada, quer com o número de bactérias produtoras de descarboxilase transferidas para o alimento por contaminação, quer com as condições favoráveis à sua multiplicação.

Existem muitos fatores que influenciam o conteúdo de ABs num alimento, sendo este conteúdo dependente do binómio tempo/temperatura de armazenamento. Quanto maior for a temperatura, maior o crescimento bacteriano e maior será a formação de ABs. Assim, a temperatura é o fator mais importante, porém existem mais fatores que podem estar envolvidos, como o pH, o teor de sal (cloreto de sódio), a disponibilidade de oxigénio e a competição com outros microrganismos (FAO/WHO, 2013).

O consumo excessivo destas ABs é preocupante para a saúde humana, porque pode gerar diferentes tipos de doenças, relacionadas com o sistema nervoso central, o sistema gástrico e intestinal e ter influência na pressão sanguínea (Suzzi & Gardini, 2003).

1.3.1 Estrutura e classificação

As ABs podem ser classificadas segundo a sua estrutura química, podendo ser: alifáticas, isto é, sem anéis aromáticos, tais como a putrescina e a cadaverina; aromáticas tais como tiramina e feniletilamina; ou heterocíclicas, como a histamina e triptamina. Outra classificação para estas aminas pode ser elaborada com base no número de grupos amina que contêm, ou seja, as aminas são agrupadas em monoaminas, como a tiramina e a feniletilamina; e diaminas como a triptamina, a histamina, a putrescina e a cadaverina (Özogul & Özogul, 2020; Spano *et al.*, 2010). A Figura 1.1 apresenta a estrutura química de cada amina biogénica estudada neste trabalho e dos seus respetivos precursores.

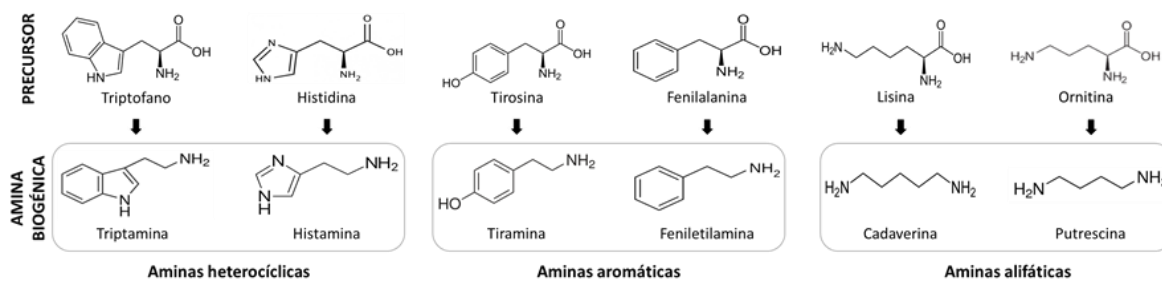


Figura 1.1: Estrutura química das ABs em estudo e dos seus precursores.

1.3.2 Formação de aminas biogênicas

O conteúdo de ABs presentes num determinado produto pode variar dependendo de vários fatores extrínsecos e intrínsecos durante o processo de produção do mesmo, como as condições de maturação, a formulação, os parâmetros físico-químicos e proteolíticos, o desenvolvimento da microflora e a atividade descarboxilase (Latorre-Moratalla *et al.*, 2008).

As ABs em produtos alimentares são geradas principalmente por descarboxilação dos aminoácidos precursores correspondentes, sendo os parâmetros mais comuns para a sua formação, a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de microrganismos (descarboxilase-positivos), as condições favoráveis ao crescimento bacteriano e síntese e a atividade de descarboxilase. Estirpes microbianas com elevada atividade enzimática proteolítica contribuem para o aumento do risco de formação de ABs em matrizes alimentares, aumentando a disponibilidade de aminoácidos livres (Karovicova & Kohajdova, 2005). Esses parâmetros são influenciados principalmente por a disponibilidade de substrato, pela temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio (Naila *et al.*, 2010).

A descarboxilação de um aminoácido por ação da descarboxilase é uma reação enzimática catalisada pelo fosfato piridoxal resultando nos seguintes produtos: dióxido de carbono e a amina biogênica correspondente ao aminoácido precursor como indicado na Figura 1.2 (Cellini *et al.*, 2013).

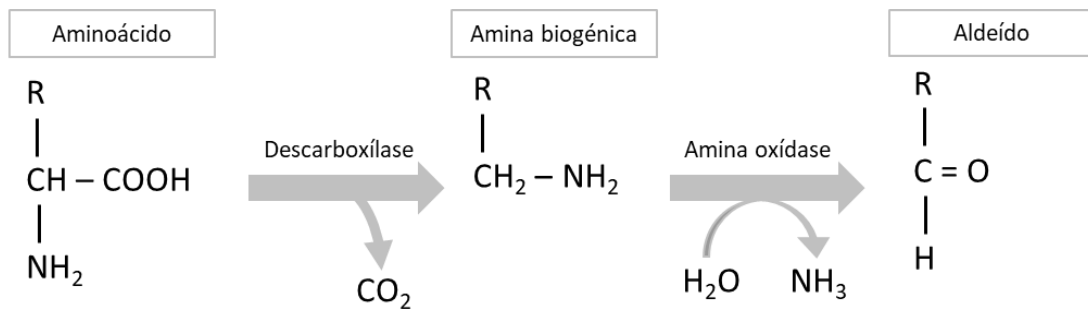


Figura 1.2: Descarboxilação de aminoácidos (adaptado de Erdag *et al.* (2018)).

Uma temperatura ótima para o crescimento microbiano favorecerá o metabolismo e a proliferação celular e deste modo o aumento de ABs (Ahmad *et al.*, 2019). Segundo Gardini *et al.* (2001) e Gardini *et al.* (2016) citados por Ahmad *et al.* (2019), a concentração de sal influencia a acumulação de ABs, ou seja, o aumento da sua concentração inibe o crescimento de microrganismos com atividade descarboxilase e consequentemente favorece a acumulação de ABs. O pH é outro fator chave que influencia a atividade descarboxilase dos aminoácidos. Assim, Joosten (1988) citado por Gardini *et al.* (2001) refere que, temperatura elevada, pH elevado e concentração de sal baixa tem sido reportado como fatores que aceleram a acumulação de aminoácidos livres e, consequentemente, estimulam a formação de aminas.

O aumento da atividade de enzimas proteolíticas em estripes microbianas torna os aminoácidos livres mais disponíveis e suscetíveis à formação de ABs em matrizes alimentares (Ahmad *et al.*, 2019; Özogul & Özogul, 2020).

A histamina cujo nome IUPAC é 2-[4-imidazole]-etilamina, é uma amina de baixo peso molecular formada a partir da descarboxilação da histidina e da enzima L-histidina descarboxilase (HDC), que depende do cofator piridoxal-5'-fosfato. A histidina descarboxilase (HDC) é uma enzima que está presente em várias células animais, incluindo no sistema nervoso central, neurónios, mucosa gástrica, células parietais, mastócitos e basófilos (Shahiid *et al.*, 2009).

A formação de histamina nos produtos cárneos pode ocorrer através da atividade de microrganismos que possuem a descarboxilase-positiva específica à histidina. Estes microrganismos pertencem maioritariamente à família de *Enterobacteriaceae* e a algumas espécies de *Lactobacillus* e *Pseudomonas* (Kanki *et al.*, 2007).

A formação de tiramina durante a fermentação deve-se principalmente à descarboxilação da tirosina devido à atividade de vários microrganismos, tais como as bactérias produtoras de ácido láctico incluindo *Lactobacillus* e *Enterococcus* (Guerrini *et al.*, 2007).

A formação de cadaverina em produtos cárneos deve-se à descarboxilação enzimática da lisina por ação de várias espécies de *Enterobacteriaceae* presentes nas etapas iniciais do processo de fermentação de produtos de enchidos (Tateno *et al.*, 2008).

A putrescina é produzida principalmente por contaminação com várias estirpes de *Enterobacteriaceae*, sendo também produzida por algumas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus* fecais (Komprda, Sládková & Dohnal, 2009).

A triptamina resulta da descarboxilação do aminoácido triptofano como resultado da atividade da descarboxilase deste aminoácido aromático (Torrens-Spence *et al.*, 2013).

A feniletilamina também pode resultar da descarboxilação da fenilalanina por várias espécies de *Enterococci* e *Lactobacillus* (Ansorena *et al.*, 2002).

Assim, a descarboxilação dos aminoácidos, por ação de enzimas descarboxilase bacterianas, desempenha um papel fundamental na formação de ABs, sendo os microrganismos os intervenientes responsáveis desta degradação, tal como mostra a Figura 1.3.

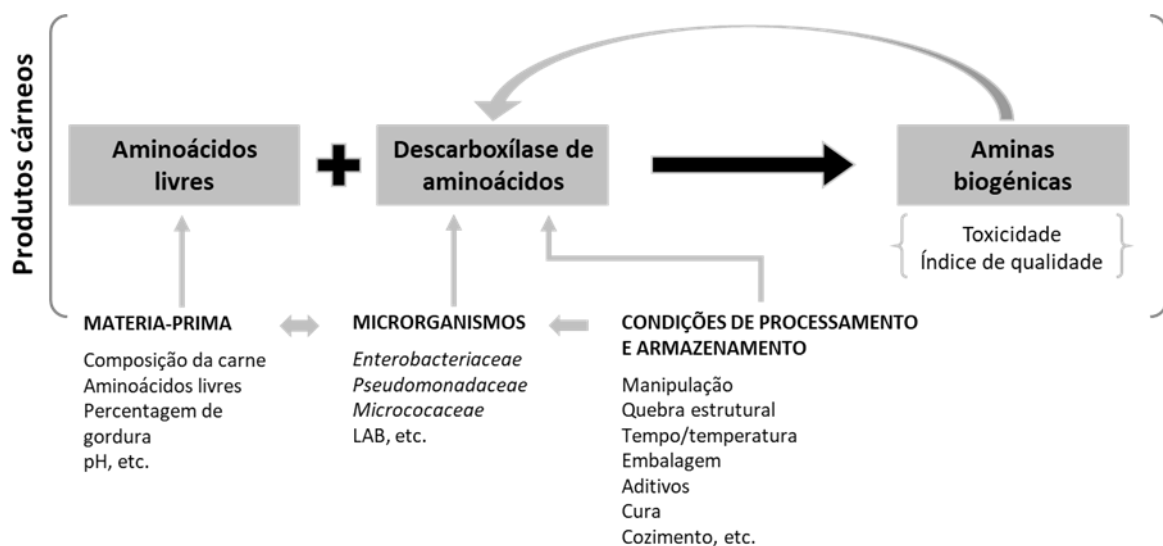


Figura 1.3: Fatores que influenciam a formação de ABs em produtos cárneos (adaptado de Ruiz-Capillas & Colmenero (2005)).

1.3.3 Culturas “starter” e a formação de aminos biogénicas

Os alimentos fermentados são produtos de valor acrescentado, são ricos em nutrientes, têm um tempo de vida útil longo e são fáceis de consumir. As qualidades organolépticas destes alimentos são elevadas, particularmente em termos de sabor, aroma e cor. Para a produção de produtos fermentados é necessária uma cultura de iniciação, tal como as estirpes de LAB, sendo a maioria das culturas de partida de carne *Lactobacillus pentosus*, *L. casei*, *L. curvetus*, *L. planterum*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *P. Pentosaceus* (Verma, Singh & Vikas, 2012).

As LAB são muito usadas na indústria de produtos cárneos como culturas de arranque (*starter*) para a fermentação de enchidos (Suzzi & Gardini, 2003).

Os alimentos são fermentados por LAB, que são consideradas geralmente não tóxicas e não-patogénicas, no entanto algumas espécies podem produzir ABs (Spano *et al.*, 2010). As culturas *starter* são bastante usadas na fermentação da carne para reduzir o pH de forma rápida e assim, garantir a segurança do produto (Parente *et al.*, 2001).

Os enchidos fermentados resultam tanto da ação dos microrganismos como dos aminoácidos livres. Os fatores ambientais favoráveis ao crescimento bacteriano e à atividade de descarboxilação conduzem à formação de ABs (Santos, 1996).

De acordo com os estudos de Leuschner, Heidel & Hammes (1998), valores elevados de glucose e sal, e baixos de temperatura e pH, exercem um efeito negativo na degradação de aminos em enchidos. Existem estudos que mostram vários métodos de reduzir a formação de ABs nos alimentos, tais como o uso de aditivos (Mah & Hwang, 2009a) e o processamento a alta pressão (HPP) (Latorre-Moratalla *et al.*, 2007). Além destes existe a técnica de irradiação (Kim *et al.*, 2005), o controlo da temperatura (Du *et al.*, 2002) e a adição de culturas *starters* (Mah & Hwang, 2009b). No estudo de Mah & Hwang (2009b) foi possível reduzir 16% do conteúdo total de ABs no produto estudado.

1.3.4 Aminos biogénicas em produtos cárneos

Os alimentos fermentados requerem por definição um elevado crescimento de microrganismos. No entanto, estes muitas vezes são responsáveis pela acumulação de ABs, especialmente durante a fase de maturação (Ancín-Azpilicueta, 2008; Rabie *et al.*, 2011; Suzzi &

Gardini, 2003). Além dos produtos cárneos outros alimentos podem conter ABs. A tiramina é encontrada em vários alimentos, principalmente alimentos e bebidas envelhecidos e fermentados, como queijos, bananas maduras, abacate, figos enlatados, amendoins, arenque em conserva, produtos cárneos fumados e fermentados e bebidas alcoólicas (vinho, cerveja) (Glória, 2003).

A detecção precoce de bactérias produtoras de ABs é essencial na indústria alimentar para evitar o risco de formação destas aminas (Spano *et al.*, 2010).

A partir de uma revisão da literatura apresentam-se na Tabela 1.1 os valores de concentração de ABs em vários produtos cárneos expressos em mg AB/kg produto cárneo.

Tabela 1.1: Conteúdo de ABs (mg/kg) de estudos de vários autores em produtos cárneos (adaptada de Suzzi & Gardini (2003)).

Aminas/ Producto	TRIP	FENI	PUT	CAD	HIS	TIRA	Referência
Salame (industrial)	4	4	279	103	71	220	Montel <i>et al.</i> (1999)
Salame (tradicional)	0	1	223	71	15	164	Montel <i>et al.</i> (1999)
<i>Soppressata</i>		3	99	61	22	178	Parente <i>et al.</i> (2001)
Linguiça		0	20	7	0	77	Parente <i>et al.</i> (2001)
Enchidos belgas		1	15	3	4	37	Vandekerckhove (1977)
Enchidos finlandeses	15	13	79	50	54	88	Eerola <i>et al.</i> (1996); Eerola <i>et al.</i> (1998)
Enchidos russos	22	11	93	10	89	110	Eerola <i>et al.</i> (1996); Eerola <i>et al.</i> (1998)
Salsichas dinamarquesas	27	2	130	180	9	54	Eerola <i>et al.</i> (1996); Eerola <i>et al.</i> (1998)
<i>Mettwurst</i>	18	3	77	6	21	72	Eerola <i>et al.</i> (1996); Eerola <i>et al.</i> (1998)
Chouriça	16	1	60	20	18	282	Hernández-Joveer <i>et al.</i> (1997)
Salame	9	7	103	12	7	281	Hernández-Joveer <i>et al.</i> (1997)
<i>Fuet</i>	9	2	72	19	2	191	Hernández-Joveer <i>et al.</i> (1997)
<i>Sobrasada</i>	12	2	65	123	9	332	Hernández-Joveer <i>et al.</i> (1997)
Enchidos egípcios	13	10	39	19	5	14	Shalaby (1993)
Enchidos chineses	18	30	45	160	115	120	Liu <i>et al.</i> (2018)

Os vários estudos realizados com os produtos indicados na Tabela 1.1 mostram que, de forma geral, as ABs encontradas em maior quantidade são a tiramina e a putrescina.

As ABs tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina e triptamina e também a histamina foram detetadas em carnes fermentadas, enquanto a espermina e a espermidina foram detetadas em níveis significativos em carnes frescas (Vidal-Carou *et al.*, 2009; Stadnik & Zbigniew, 2010). Contudo, segundo Vidal-Carou *et al.* (2009), a formação das referidas ABs em produtos fermentados, não está diretamente associada à qualidade das matérias-primas utilizadas, mas sim, relacionada com a ação dos microrganismos envolvidos no processo de fermentação.

1.3.5 Aminas biogénicas como indicador de qualidade

A análise de ABs é importante devido às preocupações relacionadas com a saúde humana e também por ser uma forma de monitorizar a toxicidade microbiológica, assim como a qualidade e segurança dos alimentos indicando o grau de frescura ou deterioração dos mesmos (Ahmad *et al.*, 2019; Önal, 2007).

As ABs são fatores naturais de desnutrição e são importantes do ponto de vista de higiene, pois têm sido indicadas como agentes causadores de vários episódios de intoxicação alimentar e capazes de iniciar várias reações farmacológicas. Elevados teores de ABs podem denunciar más condições de processamento e/ou armazenamento tanto no aspeto de falta de higiene como na utilização de temperaturas pouco adequadas. O mesmo se aplica às matérias-primas sem qualidade e/ou utilizadas no limite da sua conservação (Önal, 2007).

Nos alimentos, a presença de grandes quantidades de ABs é uma indicação de uma possível preparação defeituosa, deterioração e atividade microbiana indesejada (Taylor, 1986). No processo de deterioração em peixe e carne existem quantidades elevadas de histamina, putrescina e cadaverina (Mohammed *et al.*, 2016). A mistura binária de putrescina e cadaverina é considerada como índice de aceitação da qualidade na carne fresca. O aumento deste índice está correlacionado com a deterioração do produto, assim como com a carga microbiana presente no mesmo (Ahmad *et al.*, 2019). Outros autores referem de forma semelhante que a concentração elevada de putrescina e cadaverina são indicadores de alimentos deteriorados (Karovicova & Kohajdova, 2005). A putrescina, tal como Komprda *et al.* (2009) refere, pode aumentar o efeito negativo da tiramina e da histamina na saúde humana.

1.3.6 Efeitos toxicológicos e o seu impacto na saúde humana

Como referido anteriormente as ABs são substâncias orgânicas presentes em alimentos que induzem riscos toxicológicos e problemas de saúde (Karovicova & Kohajdova, 2005).

O estabelecimento de limites de toxicidade de ABs num determinado produto, é de um modo geral muito difícil, pois não depende apenas da concentração destas, mas também da influência de outros compostos existentes, assim como do próprio consumidor, ou seja, da sua suscetibilidade e estado de saúde (Feddern *et al.*, 2019; Ruiz-Capillas & Colmenero, 2005).

Segundo a opinião científica sobre o risco baseado no controlo da formação de ABs em alimentos fermentados publicado pela EFSA em 2011, a histamina e a tiramina são consideradas as aminas mais tóxicas e relevantes do ponto de vista da segurança alimentar. Estas aminas são uma grande preocupação nos alimentos fermentados devido à enorme atividade microbial associada e ao potencial de formação das mesmas.

O consumo excessivo de ABs pode ser preocupante para a saúde, porque a absorção não equilibrada destas no organismo humano pode gerar diferentes graus de doença, determinados pela sua ação nos sistemas nervoso, digestivo, respiratório e circulatório (Suzzy & Gardini, 2003). Contudo, estas também têm um papel biológico crítico no corpo humano, tendo funções fisiológicas essenciais nos sistemas referidos. Deste modo, as ABs são necessárias no sistema imunológico, nos intestinos e na continuação da atividade das funções metabólicas padrão do organismo humano (Erdag *et al.*, 2018).

Altas quantidades de ABs podem diminuir a qualidade dos alimentos e produzir vários sintomas fisiológicos, como náuseas, reações alérgicas, dificuldade respiratória, dor de cabeça, suores, palpitações cardíacas e hipertensão ou hipotensão arterial (Feddern *et al.*, 2019). Estas são também conhecidas por serem um potencial precursor das nitrosaminas cancerígenas (Özogul & Özogul, 2020).

Em condições normais nos seres humanos, as aminas exógenas absorvidas através dos alimentos são rapidamente eliminadas pela ação da amina oxidase. Contudo no caso de indivíduos alérgicos, ou quando estão presentes no organismo inibidores de monoamina, ou ainda quando são consumidos níveis muito elevados de aminas, o processo de desintoxicação é perturbado e as ABs acumulam-se no corpo humano (Karovicova & Kohajdova, 2005).

Na União Europeia apenas existe regulamentação para o limite de histamina em produtos de pesca, com o regulamento (EU) nº 1019/2013 da Comissão a estabelecer o valor limite de 200 mg/kg.

1.3.7 Determinação de aminas biogénicas

Na literatura encontram-se vários trabalhos experimentais realizados com produtos cárneos fermentados como por exemplo salame, com os resultados da concentração de ABs a variarem entre as diferentes publicações. É possível observar essas diferenças na Tabela 1.1 apresentada anteriormente onde, por exemplo, as concentrações de cadaverina no salame variam entre 12 e 103 mg/kg. Essas diferenças resultam de muitas variáveis, tais como a composição qualitativa e quantitativa da microflora microbiana, a composição química dos produtos, as variáveis físico-químicas, os procedimentos de higiene adotados durante a produção, as condições de temperatura e a presença de culturas (Suzzy & Gardini, 2003). Os enchidos são produtos de valor acrescentado com características muito específicas que dependem do local de produção.

Existem vários métodos para determinar ABs nos alimentos. Métodos baseados em cromatografia, em eletroforese ou métodos baseados em biossensores. A quantificação das ABs em amostras alimentares tem sido realizada principalmente por métodos cromatográficos, como a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC ou LC), cromatografia líquida de ultra resolução (UPLC), cromatografia iónica (IC), cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia líquida de pares iónicos (IPLC) e eletroforese capilar (CE). Contudo, nos últimos anos desenvolveram-se sensores para determinação de ABs como alternativa às técnicas cromatográficas devido aos equipamentos dispendiosos e ao tempo consumido nesta metodologia (Erim, 2013). Realçar que é imperativo utilizar um detetor sensível e eficiente para garantir a confiabilidade do método analítico no seu todo. Neste contexto, vários processos de deteção de BAs foram reportados em diversos estudos, tais como ultravioleta (UV), UV indireto, espectrometria de massa (MS), eletroquímica, condutometria, enzimática, imunoensaios e de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Neofotistos *et al.*, 2019).

Sendo os métodos cromatográficos de TLC, GC e LC os métodos mais usados, existem vantagens e desvantagens entre estes. O método TLC é simples e não requer equipamento específico, mas é um método demorado e os resultados são imprecisos, sendo este um método semi-quantitativo. A utilização do método de GC não é frequente na determinação de ABs, sendo a

LC com pré ou pós coluna, após derivatização a técnica mais utilizada para separação e quantificação destas (Lázaro & Junior, 2014). A quantificação de ABs no estudo aqui apresentado foi efetuada pelo método HPLC com detetor de UV.

O HPLC é um método analítico que consiste no bombeamento de um solvente líquido pressurizado (tipicamente uma mistura de solventes) - fase móvel, que transporta a mistura da amostra através de uma coluna que preenchida com um material adsorvente sólido - uma fase estacionária. Assim, um pequeno volume discreto (microlitros) da mistura da amostra a ser separada e analisada é introduzida na corrente da fase móvel que passa através da coluna. Como cada componente da amostra interage de forma diferenciada com o material adsorvente da coluna, então a velocidade a que cada um destes componentes se move através da coluna também é diferente, o que permite a sua separação conforme eles eluem para fora da coluna. Deste modo, a velocidade de cada componente depende da sua natureza química, da natureza da fase estacionária (coluna) e da composição da fase móvel. O momento em que um analito específico elui (emerge da coluna) é chamado de tempo de retenção, sendo este uma característica identificadora de um determinado analito se medido sob condições particulares. A deteção dos vários compostos constituintes da amostra é efetuada principalmente por detetores de absorvância para compostos orgânicos e por detetores de condutividade e eletroquímicos para componentes metálicos e inorgânicos (Franson *et al.*, 1998).

1.3.8 Estudos de determinação de aminas biogénicas por HPLC

A determinação de ABs efetuada neste estudo, como referido anteriormente foi por cromatografia líquida de alta resolução. Houve assim a necessidade de resumir os vários estudos que existem na literatura e analisar os procedimentos que utilizam HPLC (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Procedimentos analíticos para a determinação de ABs por HPLC em diferentes estudos.

Tratamento da amostra	Derivatização	Referência
Triturar 5 g de amostras; Homogeneizar por 1 min com 25 mL de ácido perclórico 0,4M; Centrifugar a 8000 g durante 10 min; Recolher a fase aquosa e extrair novamente o resíduo usando o mesmo procedimento; Combinar os dois extratos.	100 µL aminas; 300 µL de NaHCO ₃ (20 g/L); 500 µL de Ds (5 g/L); 3s vórtex; Incubar no escuro a 45 °C durante 60 min; 100 µL de hidróxido de amónia 25% (m/v); Ajustar a 2 mL com acetonitrilo.	Liu <i>et al.</i> (2018)
2 g de amostra; Adicionar padrão interno; Homogeneizar com 10 mL de ácido perclórico 0,4 M no ultraturrax; Centrifugar por 10 min a 3000 rpm; Recolher a fase aquosa e repetir extração com 10 mL de ácido perclórico 0,4 M e misturar no vórtex; Centrifugar como anteriormente; Combinar ambos os sobrenadantes e ajustar a 25 mL com ácido perclórico 0,4 M.	1 mL extrato de amostra; 200 µL NaOH 2 N; 300 µL NaHCO ₃ saturado; 2 mL dansilo; Incubar a 40°C durante 45 min; 100 µL hidróxido de amónia; Depois de 30 min, ajustar a 5 mL com acetonitrilo; Centrifugar por 5 min a 2500 rpm; Filtrar sobrenadante por um filtro 0,45 µm.	Eerola <i>et al.</i> (1993)
10 g de amostra; 20 mL de HCl 0,1 M; Adicionar padrão interno; Saturar com NaCl ajustando o pH a 11,5; Agitar por 30 min.	1 mL extrato de amostra; 200 µL NaOH 2 N; 300 µL NaHCO ₃ saturado; 2 mL dansilo; Incubar a 40 °C por 45 min; 100 µL hidróxido de amónia; Depois de 30 min, ajustar a 5 mL com acetonitrilo; Centrifugar por 5 min a 2500 rpm; Filtrar sobrenadante por um filtro 0,45 µm.	Moret & Conte (1996) Parente <i>et al.</i> (2001)

Continua

Tabela 1.2: Procedimentos analíticos para a determinação de ABs por HPLC em diferentes estudos (continuação).

Tratamento da amostra	Derivatização	Referência
<p>5 g de amostra; 20 mL de ácido perclórico 0,4 M; Misturar no vórtex e manter numa camara fria a 4°C por 2 h; Centrifugar a 3000 g a 4°C por 10 min; Recolher sobrenadante e extrair o resíduo novamente com um volume igual de ácido perclórico 0,4 M; Combinar ambos os sobrenadantes; Ajustar volume final a 50 mL com ácido perclórico 0,4 M; Filtrar o extrato.</p>	<p>1 mL extrato; 200 µL NaOH 2 M; 300 µL NaHCO₃ saturado; 2mL dansilo (10 mg/mL); Incubar a 40°C por 45 min; 100 µL de hidróxido de amónia 25%; Depois de incubar por 30 min a 25°C ajustar o volume a 5 mL com acetonitrilo; Centrifugar a 3000 g por 5 min; Filtrar sobrenadante através de um filtro 0,2 µm.</p>	Yoon <i>et al.</i> (2015)
<p>4g amostra; 10 mL de ácido perclórico 0,4M; 200 µL padrão interno (PI); Homogeneizar no ultraturrax; Centrifugar a 3000 rpm por 10 min; Recolher sobrenadante para um balão volumétrico de 25 mL; Extrair resíduo novamente com uma quantidade igual de ácido perclórico 0,4 M; Combinar sobrenadantes e ajustar volume final a 25mL com ácido perclórico 0,4 M.</p>	<p>1mL extrato biológico; 200 µL NaOH 2 M; 300 µL NaHCO₃ saturado; 2 mL dansilo (10mg/mL); Incubar a 40°C por 45min; 100 µL de hidróxido de amónia 25%; Depois de incubar 30 min os extratos foram ajustados a 50 mL com acetonitrilo; Centrifugar por 5 min a 2500 rpm; Filtrar sobrenadante através de um filtro 0,5 µm.</p>	Ben-Gigirey <i>et al.</i> (1998)

1.4 Objetivos do trabalho

Neste trabalho determinou-se o conteúdo de ABs em três produtos fumados, alheira, salpicão e lombo. Foram preparados para o estudo dois tipos de enchidos, uns com adição de uma cultura *starter* e outros sem adição, designados produtos controlo. Foi assim avaliada a influência da cultura *starter Lactobacillus plantarum* ST153ch (cultura LAB) na formação de ABs nestes produtos ao longo do tempo de armazenamento do produto.

Um dos objetivos deste trabalho foi implementar uma metodologia para a determinação simultânea de várias ABs por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Um segundo objetivo deste trabalho consistiu em verificar a influência da cultura LAB na formação de ABs nestes produtos, e avaliar a sua concentração ao longo do tempo. Foram quantificadas as aminas triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina em seis produtos: alheira controlo (AC), alheira LAB (ALAB), salpicão controlo (SC), salpicão LAB (SLAB), lombo controlo (LC) e lombo LAB (LLAB).

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições gerais

Neste estudo analisou-se o conteúdo de ABs em três produtos fumados: alheira de vitela, salpicão fatiado e lombo fatiado. A estes três produtos foi adicionada à sua composição estirpes de *Lactobacillus plantarum* ST153ch, como cultura de arranque (*starter*), com o objetivo de prolongar o tempo de prateleira. Para estudos comparativos usaram-se três produtos controle, alheira de vitela, salpicão fatiado e lombo fatiado, sem adição de cultura LAB na sua formulação.

As aminas foram determinadas por HPLC com detetor de DAD (Diode-Array). As ABs selecionadas para a quantificação foram a triptamina, a feniletilamina, a putrescina, a cadaverina, a histamina e a tiramina. Na preparação das amostras para análise por HPLC realizou-se uma extração com ácido perclórico, seguida de uma derivatização com solução de cloreto de dansilo. O método de extração foi realizado por dois procedimentos distintos. O método 1 (M1) foi baseado no método Eerola *et al.* (1993) e o método 2 (M2) seguiu o procedimento do J. AOAC (1999). Foram realizadas ligeiras alterações nos dois métodos. O padrão interno (PI) utilizado nos dois métodos foi o 1,7-diaminoheptano.

2.2 Amostras

As amostras foram fornecidas no âmbito do projeto DEM@BIOFUMADOS. Foram estudadas a alheira do lote 3, o salpicão e o lombo do lote 1.

Os produtos cárneos estudados têm na sua composição um conteúdo de carne variável, ou seja, aproximadamente 92 %, 50 % e 90 % no salpicão fatiado, na alheira de vitela e lombo fatiado, respetivamente. Relativamente à composição destes produtos, o salpicão tem na sua composição 27 % de proteína, 2,5 % NaCl e 41 % de humidade; a alheira tem 14 % de proteína, 1,1 % NaCl e 57 % de humidade; e o lombo tem 23 % de proteína e 55 % de humidade.

A alheira de vitela foi produzida a partir de uma mistura de vários tipos de carne (vitela, porco e aves), pão, cebola, temperos, azeite e sal, seguindo um procedimento interno da empresa para a fumagem. Nas alheiras com adição da cultura LAB, esta foi misturada juntamente com os outros ingredientes na mistura inicial sendo estas chamadas de amostras LAB. Após a fumagem a alheira foi embalada em atmosfera modificada com 20 % de CO₂ e 80 % de N₂ e armazenada a 4 °C, sendo este o tempo zero.

O salpicão foi preparado a partir de carne de porco, vinho, alho e pimenta maioritariamente, seguindo o procedimento interno da empresa para a fermentação/fumagem. Para as amostras LAB, a estirpe de bactérias lácticas só foi aplicada no produto final depois de fatiado. As amostras de salpicão fatiado foram embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C, sendo este o tempo zero.

O lombo foi preparado por adição ao lombo de porco de sal, condimentos e especiarias. Tal como no salpicão a adição de bactérias lácticas foi efetuada no produto acabado fatiado. As amostras de lombo fatiado foram embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C, sendo este o tempo zero.

A amostragem foi efetuada em intervalos de 15 dias, sendo as amostras imediatamente congeladas a -18 °C antes da realização das análises. A alheira foi analisada ao longo do tempo durante o armazenamento de 90 dias, ou seja, desde o tempo 0 (t=0) até 90 dias (t=90). Relativamente, ao salpicão e lombo fatiados, o tempo de armazenamento foi prolongado até 180 dias, tendo sido realizadas amostragens ao longo do tempo, desde o tempo 0 (t=0) até ao tempo 180 dias (t=180). A última amostragem para todos os produtos coincidiu com o último dia de armazenamento.

No laboratório, antes do início das extrações nas amostras, estas foram trituradas sendo apenas a parte comestível de cada produto utilizada, excluindo-se assim a tripa envolvente destes produtos.

As amostras foram codificadas segundo A, S e L para a alheira, salpicão e lombo, respetivamente. A esta codificação foi acrescentado o sufixo C para as amostras que não continham cultura *starter* – amostras controlo, e o sufixo LAB para as amostras com adição de cultura *starter*.

2.3 Métodos

Neste estudo implementaram-se duas metodologias para determinação de ABs em produtos cárneos. Tal como indica a Figura 2.1, realizaram-se testes preliminares antes de iniciar a implementação do método e posteriormente fizeram-se testes de repetibilidade e aferição do método. Após a análise dos resultados obtidos no primeiro método (M1) verificou-se que alguns dos resultados apresentavam valores de histamina bastante elevados (aproximadamente 23500 mg/kg). Por essa razão, fez-se a aferição do método 1 que, apesar de apresentar resultados mais concordantes, decidiu-se optar por um método alternativo (M2) e por repetir o estudo nas mesmas amostras pois este segundo método é um método mais rápido.

No método 2 também se efetuaram testes preliminares sendo posteriormente desenvolvida toda a metodologia para a determinação das ABs.

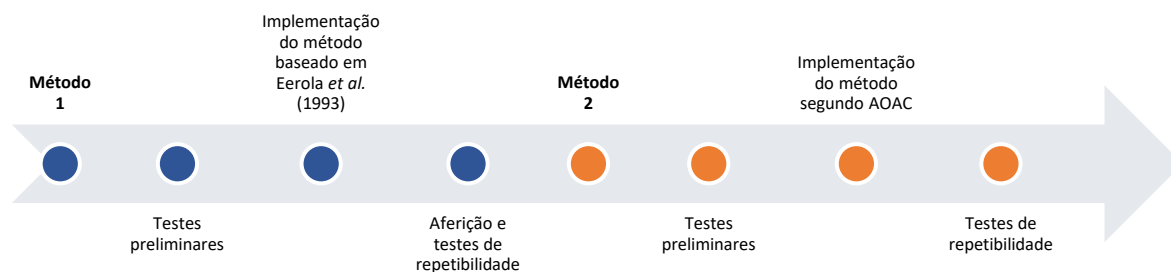


Figura 2.1: Linha cronológica de desenvolvimento dos trabalhos do presente estudo, **Método 1** e **Método 2**.

2.3.1 Método 1

O método 1 foi baseado no método desenvolvido por Eerola *et al.* (1993) com modificações de modo ajustar o método às condições de trabalho do laboratório. Neste método foi determinado o conteúdo de ABs em amostras de alheira, salpicão e lombo fatiados. Apenas foi determinado o conteúdo de histamina, putrescina e cadaverina nestas amostras. A alheira foi analisada nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias em ambos os batchs (controlo e LAB) e o salpicão e o lombo fatiados foram analisados nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 e 180 dias, também em ambos os batchs (controlo e LAB).

a. Reagentes

Neste método foram usados padrões de ABs na forma de sais hidroclicóricos. A putrescina e a histamina fornecidas por Acros Organics e a cadaverina fornecida por Sigma-Aldrich. Como padrão interno foi usado o 1,7-diaminoheptano, fornecido por Acros Organics, e como agente derivatizante foi usado o cloreto de dansilo - Ds (cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo) fornecido pela Sigma-Aldrich. Todos os padrões foram guardados segundo indicação do fabricante até ao momento da sua utilização, tendo-se colocado o cloreto de dansilo na câmara de congelação a -20 °C.

Para a extração das amostras foi usado o ácido perclórico fornecido por Riedel-de-Haën. Foram ainda usados o hidróxido de sódio fornecido por Fisher Chemical, o hidrogenocarbonato de

sódio e a acetona ambos fornecidos por Riedel-de-Haën, a solução de amónia fornecida por Merck Millipore e o acetonitrilo fornecido por J. T. Baker.

As características das substâncias referidas apresentam-se na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Características dos reagentes utilizados no método 1.

Reagentes	Grau de pureza (%)	CAS ^a	Fórmula molecular	Massa Molar (g/mol)
Putrescina ^b	99+ %	333-93-7	NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂ · 2HCl	161,07
Cadaverina ^b	≥99 %	1476-39-7	NH ₂ (CH ₂) ₅ NH ₂ · 2HCl	175,10
Histamina ^b	99 %	56-92-8	C ₅ H ₉ N ₃ · 2HCl	184,07
1,7-diaminoheptano (PI)	98 %	646-19-5	NH ₂ (CH ₂) ₇ NH ₂	130,23
Cloreto de dansilo	≥99 %	605-65-2	C ₁₂ H ₁₂ ClNO ₂ S	269,75
Ácido perclórico	70 %	7601-90-3	HClO ₄	100,454
Hidróxido de sódio	98,3 %	1310-73-2	NaOH	39,997
Hidrogenocarbonato de sódio	99,7 %	144-55-8	NaHCO ₃	84,01
Acetona	≥99,5 %	67-64-1	CH ₃ COCH ₃	58,08
Solução de amónia	25 %	1336-21-6	NH ₄ OH	17,03
Acetonitrilo	>99,8 %	75-05-8	CH ₃ CN	41,053

^a CAS: Chemical abstracts service

^b Padrões de ABs fornecidas na forma de sais hidroclicóricos.

b. Material e equipamento

As amostras foram armazenadas numa câmara de refrigeração (Iberna) e posteriormente trituradas numa picadora (Flama, picadora Pikatti 1705FL). Usou-se uma balança analítica com precisão de 0,0001 g para pesar todos os padrões e as amostras (Mettler Toledo AE 200), tendo sido usado para a extração o vórtex (ZX3 Advanced Vórtex Mixer), o ultrassons (Sonica Ultrasonic Cleaner) e a centrifuga (Finsen Bunsen).

Para cada extração de amostra usaram-se dois tubos de centrífuga de 50 mL de capacidade, uma micropipeta (100-1000 µL), uma pipeta graduada (10±0,1 mL), um kitasato, um funil de Büchner, um filtro de fibra de vidro (Whatman Reeve Angel - filter paper, Grade 403) e um balão volumétrico de 25,0 mL. Na derivatização dos extratos usou-se um balão volumétrico de 5,0 mL, micropipetas (Handrop Digital - SC), uma placa de aquecimento (ARE Heating Magnetic Stirrer) - onde se aqueceram as amostras em banho-maria, e papel de alumínio - para envolver o balão

volumétrico de modo a proteger o derivatizado da luz. Para medição do pH usou-se papel indicador de pH 0-14 da Whatman (Type CF).

Na derivatização dos extratos das amostras usou-se uma placa de aquecimento (ARE Heating Magnetic Stirrer) para manter a temperatura das amostras durante a derivatização e posteriormente usou-se o HPLC para a identificação e determinação das ABs. Todas as amostras antes de serem injetadas no HPLC foram filtradas por filtros de seringa da Whatman com porosidade de 0,2 μm . A determinação em HPLC foi efetuada através de um sistema analítico da Thermo Scientific Ultimate 3000.

c. Preparação dos padrões e reagentes

As soluções padrão foram preparadas com a concentração de sal hidrocloreto de 8 mg/mL utilizando como solvente água desionizada. Todos os padrões foram homogeneizados em ultrassons e armazenados a 4 °C, podendo ser armazenados até três semanas após a sua preparação.

O reagente de derivatização Ds foi preparado na concentração de 28 mg/mL, ou seja, adicionou-se 0,56 g de Ds a 20 mL de acetona.

A solução de ácido perclórico 0,4 M foi preparada por diluição de 34,4 mL de ácido concentrado (HClO_4 - MM=100,454 g/mol; 70% (m/m); 1,67 g/mL) a 1 L com água desionizada. A solução aquosa de hidróxido de sódio foi preparada com 8,0 g em 100 mL, sendo a concentração final de 2 N. Como a solubilidade do hidrogenocarbonato de sódio é de 7,8 g/100mL, a solução aquosa foi preparada com uma massa superior para se obter uma solução saturada. A solução de amónia foi preparada diluindo a solução de 25 % para 12,5 % usando 5 mL da solução concentrada (Solução de NH_3 - MM=17,03 g/mol; 25% (m/m); 0,91 g/mL) e aferindo a 10 mL.

d. Procedimento

Para cada amostra retirou-se a tripa e triturou-se. Estas foram embaladas a vácuo e armazenadas a -18 °C até análise. Na Figura 2.2 está apresentado o fluxograma da extração das amostras usado no procedimento original de Eerola *et al.* (1993) (Fluxograma A), assim como o fluxograma B que representa as alterações efetuadas no laboratório (Fluxograma B – Método 1).

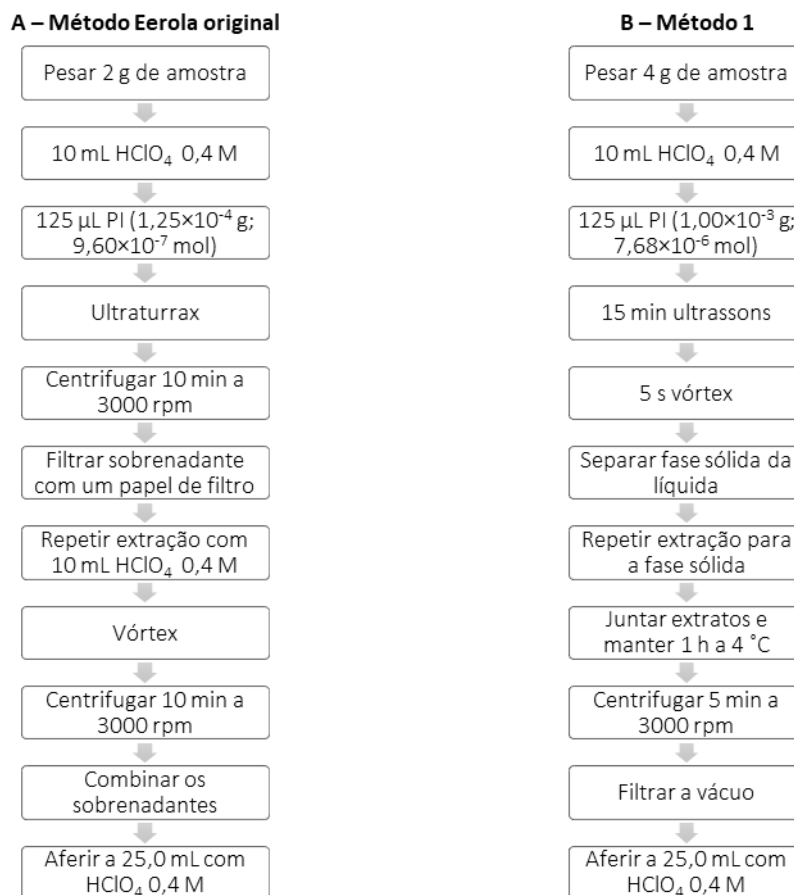


Figura 2.2: Fluxograma da extração das amostras. A: Método original de Eerola *et al.* (1993); B: Método 1.

O procedimento de derivatização original de Eerola *et al.* (1993), Fluxograma A, e o procedimento utilizado no laboratório para a derivatização dos extratos das amostras encontram-se representados na Figura 2.3.

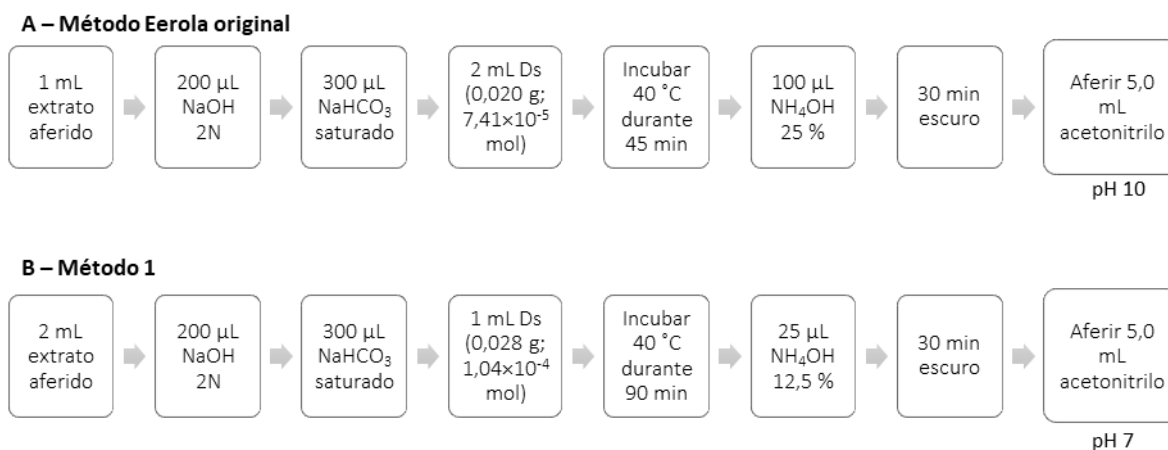


Figura 2.3: Fluxograma do processo de derivatização. A: Método original de Eerola *et al.* (1993); B: Método 1.

e. Determinação das aminas biogénicas

As amostras derivatizadas foram analisadas por HPLC, tendo sido a concentração das AB calculada pelo método do fator de resposta (Rf) o qual foi determinado segundo a fórmula apresentada na Equação 2.1.

$$Rf = \frac{A_{\text{amina}}}{A_{\text{PI}}} \times \frac{m_{\text{PI}}}{m_{\text{amina}}} \quad \text{Equação 2.1}$$

Após calcular o valor de Rf para cada amina, usou-se a fórmula apresentada na Equação 2.2 para determinar a concentração das ABs em mg/kg de amostra.

$$C_{\text{amina}}(\text{mg/kg}) = \frac{\frac{A_{\text{amina}} \times m_{\text{PI}}}{A_{\text{PI}} \times Rf}}{m_{\text{amostra}} \times \frac{2}{25}} \times 10^6 \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde,

A_{amina} - área obtida para a AB no cromatograma correspondente à amostra em estudo;

A_{PI} - área obtida para o PI no cromatograma da amostra em estudo;

m_{PI} - massa de PI na reação, em grama;

m_{amina} - massa de amina na reação, em grama (Equação 2.1);

Rf - fator de resposta calculado na Equação 2.1 para cada amina;

m_{amostra} - massa pesada da amostra em estudo, em grama.

Preparou-se uma solução padrão de histamina de 16,07 g ($C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$)/L, ou seja, 9,97 g histamina/L, para efetuar o estudo da reta de calibração desta amina. No procedimento de derivatização foi utilizado um volume de 500 μ L dessa solução, tendo no final desta etapa resultado uma solução com concentração de 0,97 g histamina/L (4,85 mg histamina derivatizadas). Partindo desta solução efetuaram-se diluições para a reta de calibração com as seguintes concentrações de histamina: $9,70 \times 10^{-5}$; $1,94 \times 10^{-4}$; $4,85 \times 10^{-4}$; $9,70 \times 10^{-4}$; $1,94 \times 10^{-3}$; $4,85 \times 10^{-3}$; $9,70 \times 10^{-3}$; $1,94 \times 10^{-2}$; e $6,06 \times 10^{-2}$ g/L (Apêndice B).

2.3.2 Método 2

O segundo método utilizado foi o método de referência da AOAC publicado em 1999 no *Journal of AOAC International* (Duflos *et al.* 1999). Foram quantificadas a triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, em amostras de alheira, salpicão e lombo fatiados. A alheira foi analisada nos tempos de armazenamento de 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias em ambos os batchs (controlo e LAB) e o salpicão e o lombo fatiados foram analisados nos tempos 0, 15, 30, 45, 75, 90, 120, 165 e 180 dias, também em ambos os batchs.

a. Reagentes

Neste método usaram-se 6 padrões de ABs na forma de sais hidroclicóricos: a triptamina e a cadaverina fornecidos por Sigma-Aldrich, a feniletilamina, a putrescina, a histamina e a tiramina fornecidos por Acros Organics. Tal como no método 1, usou-se como padrão interno (PI) o 1,7-diaminoheptano e como agente derivatizante o cloreto de dansilo (Ds) fornecidos por Acros Organics e Sigma-Aldrich, respetivamente. Todos os padrões foram guardados segundo indicação do fabricante até ao momento da sua utilização.

Para a extração das amostras foi usado o ácido perclórico fornecido por Riedel-de-Haën. Foram ainda usados o carbonato de sódio e o acetonitrilo fornecidos por J. T. Baker, a acetona, a prolina e o tolueno fornecidos por Riedel-de-Haën.

As características das substâncias acima referidas apresentam-se na tabela 2.2.

Tabela 2.2: Características dos reagentes e dos padrões utilizados no método 2.

Reagente	Grau de pureza (%)	CAS ^a	Fórmula molecular	Massa Molar (g/mol)
Triptamina ^b	99 %	343-94-2	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ · HCl	196,68
Feniletilamina ^b	98 %	156-28-5	C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ NH ₂ · HCl	157,64
Putrescina ^b	99+ %	333-93-7	NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂ · 2HCl	161,07
Cadaverina ^b	≥99 %	1476-39-7	NH ₂ (CH ₂) ₅ NH ₂ · 2HCl	175,10
Histamina ^b	99 %	56-92-8	C ₅ H ₉ N ₃ · 2HCl	184,07
Tiramina ^b	99 %	60-19-5	HOC ₆ H ₄ CH ₂ CH ₂ NH ₂ · HCl	173,64
1,7-diaminoheptano (PI)	98 %	646-19-5	NH ₂ (CH ₂) ₇ NH ₂	130,23
Cloreto de dansilo	≥99 %	605-65-2	C ₁₂ H ₁₂ ClNO ₂ S	269,75
Ácido perclórico	70 %	7601-90-3	HClO ₄	100,454
Carbonato de sódio	99,5 %	497-19-8	Na ₂ CO ₃	105,99
Prolina	99 %	147-85-3	C ₅ H ₉ NO ₂	115,13
Acetona	≥99,5 %	67-64-1	CH ₃ COCH ₃	58,08
Tolueno	99,7 %	108-88-3	C ₆ H ₅ CH ₃	92,14
Acetonitrilo	>99,8 %	75-05-8	CH ₃ CN	41,053

^a CAS: Chemical abstracts service

^b Padrões de ABs fornecidas na forma de sais hidrolóricos.

b. Material e equipamento

Em ambos os métodos usaram-se os mesmos equipamentos, nomeadamente a câmara de refrigeração e congelação, a picadora, a balança analítica, o vórtex, a centrifuga, o ultrassons, a placa de aquecimento e o HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000.

Para a extração de cada amostra usou-se um tubo de centrifuga de 50 mL de capacidade, uma micropipeta (100-1000 µL) (Handrop Digital – SC) e uma pipeta graduada (10±0,1 mL). Na derivatização dos extratos das amostras usou-se um vial, micropipetas, uma placa de aquecimento - onde se aqueceu as amostras em banho-maria, papel de alumínio - para cobrir o vial e proteger o derivatizado da luz e um sistema de ar comprimido para evaporar o solvente. Na medição do pH usou-se papel indicador de pH 0-14 da Whatman (Type CF).

Na derivatização das amostras usou-se uma placa de aquecimento para manter a temperatura de derivatização das amostras e usou-se filtros de seringa com porosidade 0,2 µm para filtrar as amostras antes de serem injetadas no HPLC, equipamento usado para a identificação e quantificação das ABs.

c. Preparação dos padrões e reagentes

As soluções padrão de triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina foram preparadas com concentrações do sal hidrocloreto igual a 2 mg/mL. A solução do padrão interno (PI) foi preparada com uma concentração de 0,8 mg/mL. Todos os padrões de ABs e o padrão interno foram preparados usando água desionizada como solvente. Estes foram homogeneizados em ultrassons e armazenados a 4 °C, podendo ser utilizadas até três semanas após a sua preparação.

O reagente Ds foi preparado na concentração de 7,5 mg/mL em acetona.

A solução de ácido perclórico 0,2 M foi preparada por diluição de 17,2 mL de ácido concentrado (HClO₄ - MM=100,454 g/mol; 70% (m/m); 1,67 g/mL) a 1 L com água desionizada. Como a solubilidade de carbonato de sódio é de 30 g/100mL, a solução aquosa foi preparada com uma massa superior de modo a obter-se uma solução saturada. A solução aquosa de prolina foi preparada com 1 g em 10 mL, sendo a concentração final de 100 mg/mL.

d. Procedimento

As amostras dos produtos utilizados neste método foram as mesmas usadas no método 1, estando armazenadas a -18 °C até à determinação das ABs. O procedimento utilizado para a extração das amostras neste método está apresentado na Figura 2.4.

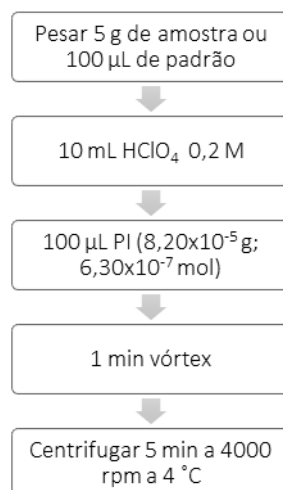


Figura 2.4: Fluxograma da extração das aminas nas amostras ou preparação dos padrões pelo método 2.

Na Figura 2.5 está apresentado o procedimento usado na derivatização dos extratos das amostras pelo método 2.

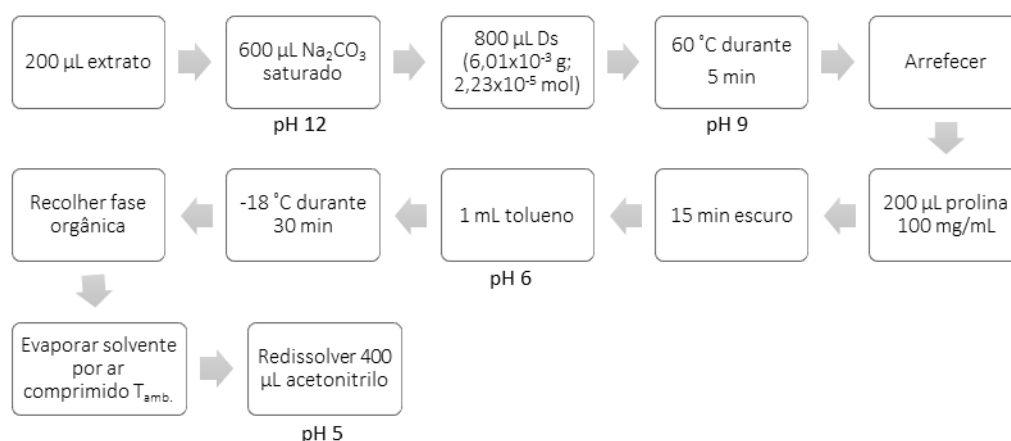


Figura 2.5: Fluxograma do processo de derivatização do método 2.

e. Determinação das aminas biogénicas

As amostras derivatizadas foram analisadas por HPLC e a sua concentração foi calculada através de um fator de resposta (Rf), o qual foi determinado segundo a fórmula apresentada na Equação 2.3.

$$Rf = \frac{A_{\text{amina}}}{A_{\text{PI}}} \times \frac{m_{\text{PI}}}{m_{\text{amina}}}$$

Equação 2.3

Após calcular o valor de Rf para cada amina biogénica, usou-se a fórmula apresentada na Equação 2.4 para determinar a concentração de ABs em mg/kg de amostra.

$$C_{amina} (mg/kg) = \frac{A_{amina} \times m_{PI}}{A_{PI} \times Rf_{amina} \times m_{amostra}} \times 10^6 \quad \text{Equação 2.4}$$

Onde,

A_{amina} - área obtida para a AB no cromatograma correspondente à amostra em estudo;

A_{PI} - área obtida para o PI no cromatograma da amostra em estudo;

m_{PI} - massa de PI na reação, em grama;

m_{amina} - massa de amina na reação, em grama (Equação 2.3);

Rf - fator de resposta calculado na Equação 2.3 para cada amina;

$m_{amostra}$ - massa pesada da amostra em estudo, em grama.

f. Índices de aminas biogénicas para aferir a qualidade dos produtos

Foram calculados três índices de ABs distintos. Um dos índices calculados foi o total de aminas vasoativas (VAT) como indicador de condições de higiene e boas praticas de fabrico (Equação 2.5). Foi calculado também o índice de ABs (BAI) dado pela soma das concentrações obtidas para as ABs putrescina, cadaverina, histamina e tiramina (Equação 2.6). Finalmente aferiu-se a possível toxicidade dos produtos para a saúde humana, pelo total das ABs (BAT) (Equação 2.7).

$$VAT = TRIP + FENI + HIS + TIRA \quad \text{Equação 2.5}$$

$$BAI = PUT + CAD + HIS + TIRA \quad \text{Equação 2.6}$$

$$BAT = TRIP + FENI + PUT + CAD + HIS + TIRA \quad \text{Equação 2.7}$$

2.4 Condições experimentais do HPLC

A determinação em HPLC foi efetuada através de um sistema analítico da Thermo Scientific Ultimate 3000 com um detetor Dionex Ultimate 3000 diode array. A coluna usada foi uma Hypersil ODS C18 (5 μm , 250x4,6 mm I.D., Agilent).

Nos dois métodos o volume de amostra usado em cada injeção no HPLC foi de 20 μL e o fluxo de 1 mL/min, tendo sido registados os espectros de absorção das amostras no comprimento de onda de 254 nm (UV). A temperatura da coluna foi programada para 40 °C. O gradiente dos eluentes da fase móvel binária, água (H_2O) e acetonitrilo (CH_3CN), é apresentado na Tabela 2.3.

Ambos os eluentes, acetonitrilo e água desionizada, usados em HPLC foram desgaseificados em ultrassons e purgados antes de serem utilizados para evitar que afetem o funcionamento do detetor e a eficiência da coluna, ou seja, causem danos no equipamento. A água desionizada foi ainda filtrada a vácuo com filtro de membrana (MF-Millipore Membrane Filter - 0,45 μm) antes de ser desgaseificada.

Tabela 2.3: Gradientes dos eluentes usados no HPLC.

Tempo (min)	A: H_2O	B: CH_3CN
0	50 %	50 %
10	10 %	90 %
20	50 %	50 %

2.5 Análise Estatística

Nos resultados obtidos para o método 2 foi calculada a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação para uma análise geral dos dados. Fez-se também um teste F para análise das variâncias para cada conjunto de resultados e um teste *t-student* para verificar se existem diferenças significativas nas médias, para um intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$), entre as amostras controlo e LAB para cada AB determinada. Estes testes foram feitos usando o Microsoft Excel 2016. Usou-se ainda, o software STATISTICA 7 para efetuar uma análise de componentes principais (PCA) para o estudo de aspetos analíticos comparando vários conjuntos de variáveis.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método 1

3.1.1 Testes preliminares

Numa primeira tentativa de análise das ABs seguiu-se o método de Eerola *et al.* (1993). Este método utiliza um reagente de derivatização, o cloreto de dansilo (Ds), que reage com uma amina de acordo com a reação geral apresentada na Figura 3.1.

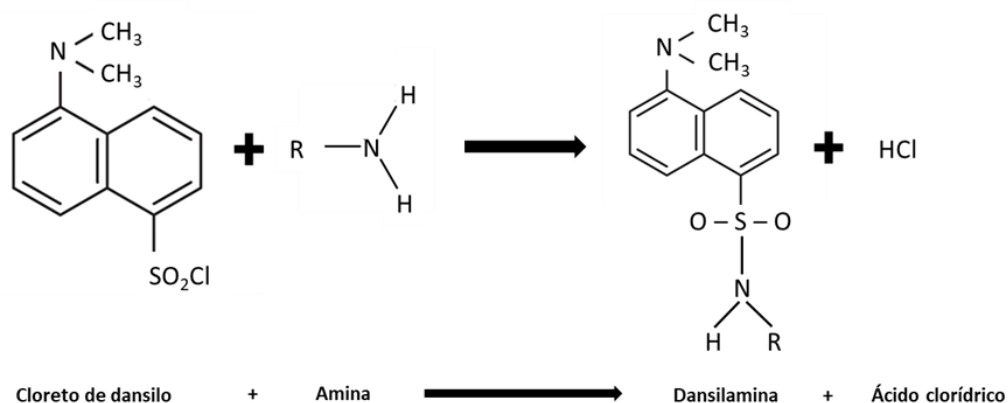


Figura 3.1: Reação de derivatização de uma amina com Ds (adaptada de Pedrol & Tiburcio (2001)).

As aminas objeto de estudo nesta experiência do trabalho são a histamina, a putrescina, e a cadaverina. A histamina reage com o Ds numa estequiometria de 1:1, enquanto as outras aminas e o padrão interno (PI), ou seja, o 1,7-diaminoheptano, reagem com o Ds numa estequiometria de 1 Ds:2 aminas. Na Figura 3.2 apresenta-se a reação de derivatização da histamina.

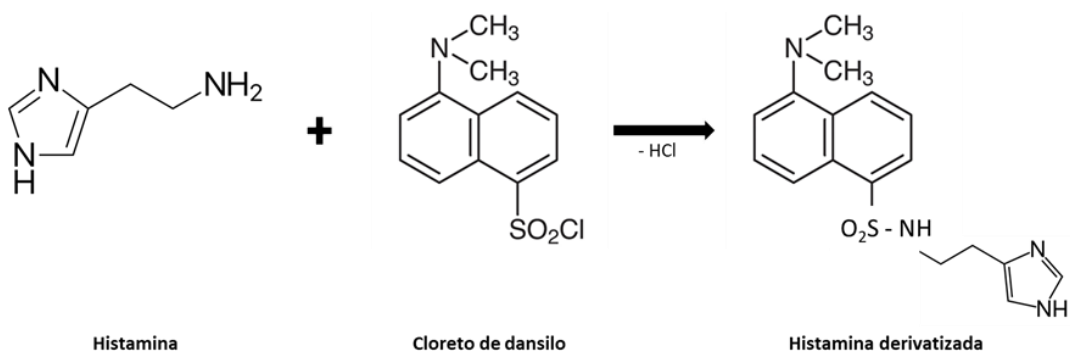


Figura 3.2: Reação de derivatização da histamina com Ds (adaptada de Ohtsubo *et al.* (2014)).

Na Tabela 3.1 indicam-se as condições de reação utilizadas nos primeiros testes de derivatização. Na última coluna da Tabela encontra-se o valor teórico do número de moles do Ds que deveria ter sido adicionado.

Tabela 3.1: Quantidades de reagentes e condições utilizadas na reação de derivatização para as experiências preliminares efetuadas no M1.

Experiência	Reagentes	Preparação de soluções (m/v) ^a		Volume usado na reação (mL) ^b	Quantidade de reagente na reação		Condições da reação	Quantidade teórica de Ds (mol)
		g	mL		g	mol		
Condições Eerola et al. (1993)	1,7-diaminoheptano	$5,0 \times 10^{-2}$	50,0	0,125	$1,25 \times 10^{-4}$	$9,60 \times 10^{-7}$	40 °C; 45 min	$2,3 \times 10^{-6}$
	Putrescina	$4,9 \times 10^{-2}$	50,0	$1,00 \times 10^{-2}$	$9,9 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-7}$		
	Cadaverina	$5,3 \times 10^{-2}$	50,0	$1,00 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-7}$		
	Ds	$1,0 \times 10^{-2}$	1,0	2,00	$2,00 \times 10^{-2}$	$7,41 \times 10^{-5}$		
Exp 1	1,7-diaminoheptano	$8,08 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$4,04 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-5}$	40 °C; 45 min	$1,58 \times 10^{-4}$
	Putrescina	$4,42 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,21 \times 10^{-3}$	$2,51 \times 10^{-5}$		
	Cadaverina	$4,69 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,34 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^{-5}$		
	Ds	$2,80 \times 10^{-1}$	10,0	1,000	$2,80 \times 10^{-2}$	$1,04 \times 10^{-4}$		
Exp 2	1,7-diaminoheptano	$8,08 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$4,04 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-5}$	40 °C; 180 min	$1,58 \times 10^{-4}$
	Putrescina	$4,42 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,21 \times 10^{-3}$	$2,51 \times 10^{-5}$		
	Cadaverina	$4,69 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,34 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^{-5}$		
	Ds	$2,80 \times 10^{-1}$	10,0	1,000	$2,80 \times 10^{-2}$	$1,04 \times 10^{-4}$		
Exp 3	1,7-diaminoheptano	$8,08 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$4,04 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-5}$	40 °C; 180 min	$1,08 \times 10^{-4}$
	Cadaverina	$4,69 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,34 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^{-5}$		
	Ds	$2,80 \times 10^{-1}$	10,0	0,670	$1,88 \times 10^{-2}$	$6,96 \times 10^{-5}$		
Exp 4	1,7-diaminoheptano	$8,08 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$4,04 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-5}$	40 °C; 180 min	$1,12 \times 10^{-4}$
	Putrescina	$4,42 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,21 \times 10^{-3}$	$2,51 \times 10^{-5}$		
	Ds	$2,80 \times 10^{-1}$	10,0	0,670	$1,88 \times 10^{-2}$	$6,96 \times 10^{-5}$		
Exp 5	1,7-diaminoheptano	$8,08 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$4,04 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-5}$	40 °C; 90 min	$1,58 \times 10^{-4}$
	Putrescina	$4,42 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,21 \times 10^{-3}$	$2,51 \times 10^{-5}$		
	Cadaverina	$4,69 \times 10^{-2}$	10,0	0,500	$2,34 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^{-5}$		
	Ds	$2,80 \times 10^{-1}$	10,0	1,000	$2,80 \times 10^{-2}$	$1,04 \times 10^{-4}$		

^a As soluções foram preparadas com água desionizada à exceção do Ds que foi preparado com acetona.

^b Medições com pipeta automática.

Na experiência 1 derivatizaram-se a putrescina e a cadaverina durante 45 minutos a 40 °C (Tabela 3.2) resultando desta reação uma mistura cujo cromatograma se encontra na Figura 3.3. Tendo-se verificado no cromatograma a existência de saturação no pico da mistura, a mesma foi diluída (1:100) para uma segunda análise cromatográfica. Para observação da evolução da reação de cada amina ao longo do tempo de derivatização, decidiu-se fazer uma segunda experiência aumentando a duração deste período para 180 minutos (Exp 2). O cromatograma desta reação (Figura 3.4) mostra que a derivatização da cadaverina parece ter aumentado em relação à experiência 1. As áreas dos picos dos cromatogramas encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.2: Condições de reação utilizadas nos testes de derivatização da putrescina e cadaverina.

Experiência	Procedimento antes da derivatização	Condições de derivatização	Procedimento após a derivatização
Exp 1	500 µL putrescina 500 µL cadaverina 500 µL PI 200 µL NaHO 2N 300 µL NaHCO ₃ saturado 1 mL Ds	t= 45 min; T= 40°C	50 µL NH ₄ OH 30 min no escuro Aferir a 5.0 mL acetoneitrilo (CH ₃ CN)
Exp 2	500 µL putrescina 500 µL cadaverina 500 µL PI 200 µL NaHO 2N 300 µL NaHCO ₃ saturado 1 mL Ds	t= 180 min; T= 40°C	50 µL NH ₄ OH 30 min no escuro Aferir a 5.0 mL acetoneitrilo (CH ₃ CN)
Exp 3	500 µL cadaverina 500 µL PI 200 µL NaHO 2N 300 µL NaHCO ₃ saturado 1 mL Ds	t= 180 min; T= 40°C	50 µL NH ₄ OH 30 min no escuro Aferir a 5.0 mL acetoneitrilo (CH ₃ CN)
Exp 4	500 µL putrescina 500 µL PI 200 µL NaHO 2N 300 µL NaHCO ₃ saturado 1 mL Ds	t= 180 min; T= 40°C	50 µL NH ₄ OH 30 min no escuro Aferir a 5.0 mL acetoneitrilo (CH ₃ CN)

Continua

Tabela 3.2: Condições de reação utilizadas nos testes de derivatização da putrescina e cadaverina (continuação).

Experiência	Procedimento antes da derivatização	Condições de derivatização	Procedimento após a derivatização
Exp 5	500 µL putrescina 500 µL cadaverina 500 µL PI 200 µL NaHO 2N 300 µL NaHCO ₃ saturado 1 mL Ds	t= 90 min; T= 40°C	50 µL NH ₄ OH 30 min no escuro Aferir a 5.0 mL acetoneitrilo (CH ₃ CN)

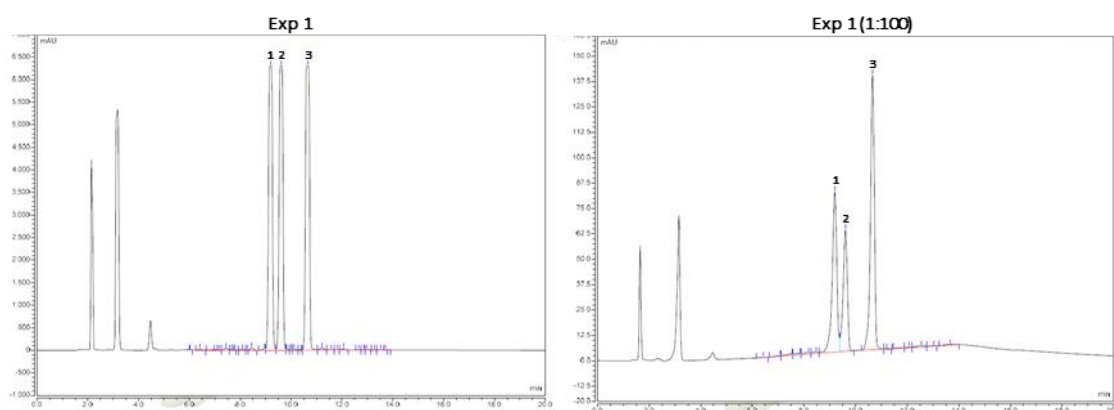


Figura 3.3: Cromatogramas da experiência 1, mistura da reação e mistura diluída (1:100). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Padrão interno.

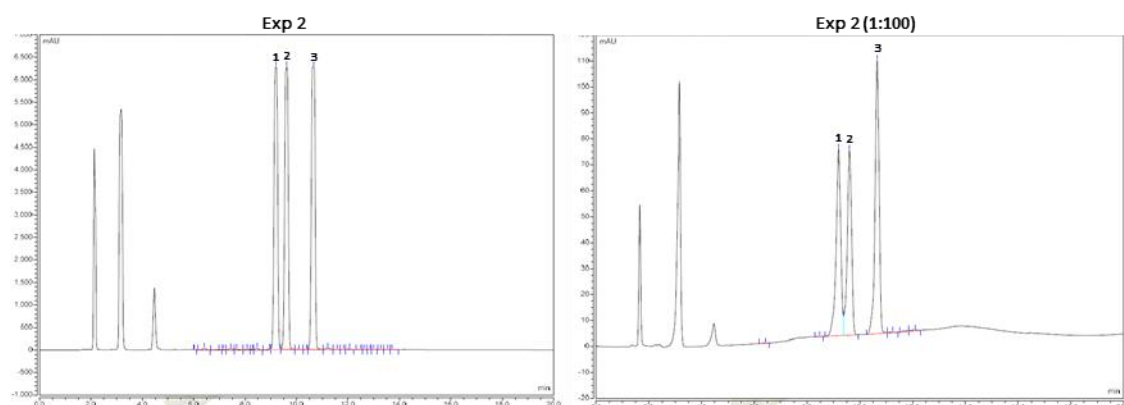


Figura 3.4: Cromatogramas da experiência 2, mistura da reação e mistura diluída (1:100). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Padrão interno.

Tabela 3.3: Áreas obtidas nos cromatogramas para cada padrão analisado.

	Áreas (mAU*min)		
	Putrescina	Cadaverina	PI
Exp 1	1107	1100	1161
Exp 1 (1:100)	16,22	11,34	23,83
Exp 2	1010	1003	1069
Exp 2 (1:100)	14,82	13,51	18,77
Exp 3		1238	1348
Exp 3 (1:100)		22,53	38,97
Exp 4	1254		1442
Exp 4 (1:100)	20,09		41,00
Exp 5	1295	1526	1881
Exp 5 (1:100)	16,17	19,68	28,31

Com o intuito de confirmar a identificação dos picos efetuada, foram realizadas a experiência 3, apenas com PI e cadaverina, e a experiência 4, com PI e putrescina (Tabela 3.2). Nestas experiências as misturas da reação também tiveram de ser diluídas no final (1:100), já que os cromatogramas apresentavam picos saturados. Os cromatogramas das misturas diluídas destas experiências são apresentados na Figura 3.5.

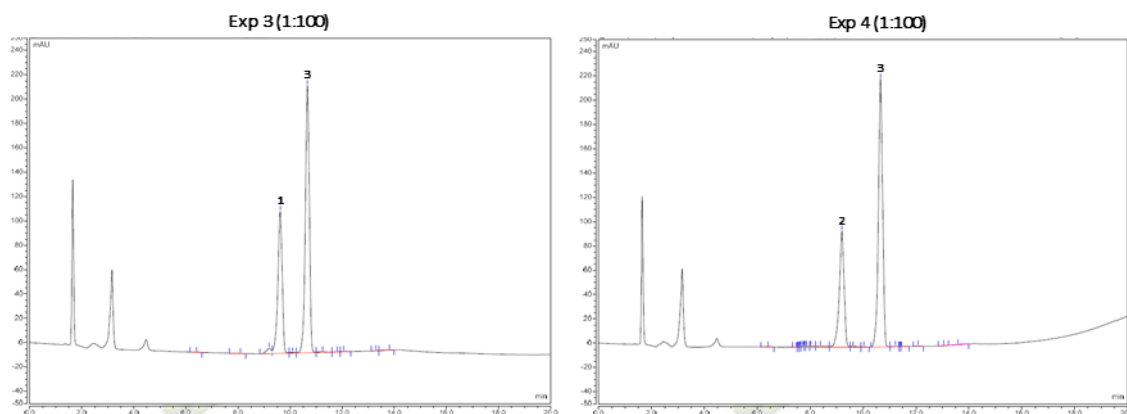


Figura 3.5: Cromatogramas das experiências 3 e 4 das misturas diluídas (1:100). Identificação dos picos: 1- Cadaverina; 2- Putrescina; 3- Padrão Interno.

Da observação dos cromatogramas obtidos para as experiências 3 e 4, verifica-se que o tempo de retenção obtido na experiência 3, $T_R = 9,60$ min corresponde à cadaverina, o tempo de

retenção obtido na experiência 4, $T_R = 9,20$ min corresponde à putrescina, e que os tempos de retenção $T_R = 10,63$ min da experiência 3 e $T_R = 10,65$ min da experiência 4 correspondem ao padrão interno ($T_{R\ PI}$). De realçar que a diferença observada entre os tempos de retenção da amina e do padrão interno foi maior no caso da putrescina.

Comparando os valores obtidos para as áreas dos picos nestas experiências com os observados nas Exp 1 e Exp 2 verificou-se que o aumento para a cadaverina foi pequeno tendo-se verificado o inverso para a putrescina. Assim o aumento do tempo de derivatização para 180 minutos não parece indicar um grande aumento de rendimento da reação. Realizou-se então uma nova experiência diminuindo o tempo de derivatização, para um tempo intermédio entre 45 e 180 minutos. A experiência 5 foi baseada no procedimento das experiências 1 e 2, alterando apenas o tempo de derivatização para 90 minutos (Tabela 3.2). O cromatograma da mistura diluída desta experiência está apresentado na Figura 3.6.

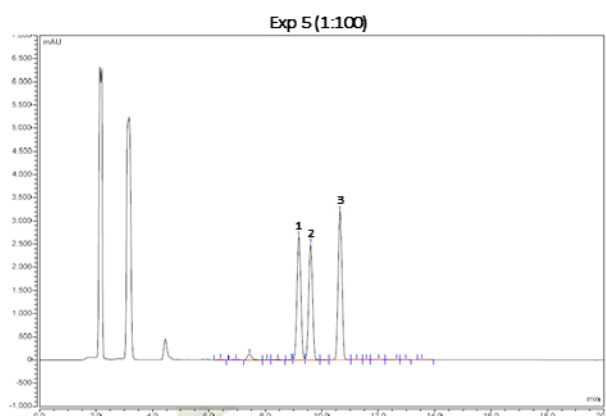


Figura 3.6: Cromatograma da experiência 5, mistura da reação diluída (1:100). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Padrão interno.

De forma a testar a repetibilidade do método, o procedimento da experiência 5 foi repetido várias vezes ($n=7$). Na Tabela 3.4 estão apresentados os resultados obtidos para este procedimento, ou seja, a média, desvio-padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo, valor máximo e a percentagem de recuperação (*recovery*). Sendo o coeficiente de variação uma medida de avaliação da precisão e esta da repetibilidade dos ensaios efetuados nas mesmas condições, os valores

registados na Tabela 3.4 parecem indicar que existe repetibilidade nos resultados obtidos nesta experiência.

Tabela 3.4: Teste de repetibilidade do procedimento efetuado na experiência 5 (mg/kg; n=7).

Amina	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	CV (%)
Putrescina	23,9	7,0	16,0	37,4	29
Cadaverina	19,7	3,2	13,8	22,6	16

Após essas experiências com os padrões, procedeu-se as extrações das amostras para este estudo. No procedimento de extração das amostras é importante os extratos estarem a temperaturas inferiores a 4 °C, pois as aminas são compostos voláteis.

3.1.2 Quantificação de aminas biogénicas nas amostras

No procedimento analítico seguido pelo método 1, a quantidade de massa de amostra utilizada foi duplicada relativamente ao método de referência – método Eerola *et al.* (1993). Esta modificação ao método original teve como objetivo possibilitar quantificar menores concentrações de ABs. As condições de derivatização da amostra foram aferidas para este novo valor de massa de amostra.

O método original aplica condições de derivatização com pH final de 10. Na utilização do método Eerola modificado (M1) a medição do pH da mistura das amostras após derivatização mostrou um pH final de 7 (Figura 2.3).

Utilizando as áreas obtidas nos cromatogramas, resultantes da determinação em HPLC das amostras estudadas, calculou-se a concentração de ABs. Os resultados obtidos encontram-se expressos em mg (AB)/kg (amostra). No Apêndice C são apresentados alguns exemplos de cromatogramas obtidos para cada produto analisado, correspondendo os cromatogramas da parte superior às amostras controlo e os da parte inferior às amostras LAB. A Figura C1 corresponde às amostras de alheira, a Figura C2 às de salpicão e a Figura C3 às do lombo. Os cromatogramas das várias amostras referem-se ao dia de início de armazenamento, ou seja, t=0.

Os resultados obtidos, para cada amina biogénica em cada produto estudado, estão apresentados no Apêndice D sob a forma de tabela (D1: Áreas obtidas nos cromatogramas para as aminas nas amostras estudadas; D2: Concentração de ABs na alheira; D3: Concentração de ABs no salpicão; D4: Concentração de ABs no lombo).

A Figura 3.7 apresenta os resultados obtidos na quantificação da AB putrescina nos três produtos em estudo nas várias amostras ao longo do tempo de armazenamento.

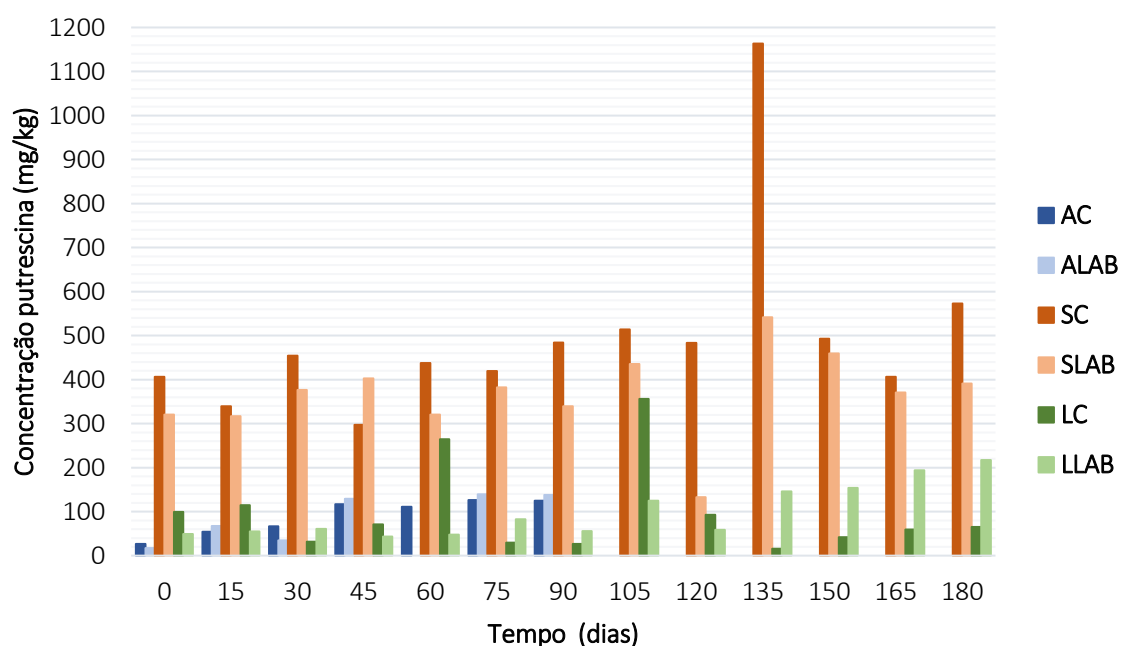


Figura 3.7: Concentração de putrescina durante o tempo de armazenamento para as amostras controlo e LAB na alheira (AC e ALAB), no salpicão (SC e SLAB) e no lombo (LC e LLAB) ($R_f=1,25$).

A Figura 3.7, Figura 3.8 e Figura 3.9 são a representação gráfica dos resultados obtidos que se encontram apresentados nas Tabelas D1, D2 e D3 do Apêndice D.

Observando a Figura 3.7, é possível verificar que dos três produtos estudados a concentração de putrescina foi superior no salpicão. O valor máximo obtido foi na amostra de salpicão controlo (SC) no $t=135$ dias, sendo que o valor mínimo registado na amostra de alheira LAB (ALAB) no $t=0$. Verificou-se ainda que os valores apresentados pelas amostras LAB do salpicão foram mais baixos do que os apresentados pelas amostras controlo. Esta tendência não foi verificada para alheira e para o lombo, já que os resultados obtidos para as amostras controlo destes produtos,

variaram entre superiores e inferiores aos das amostras LAB. Assim, nestes produtos parece haver uma tendência para serem registados valores finais de putrescina mais elevados, no entanto não existe uma tendência clara ao longo do tempo.

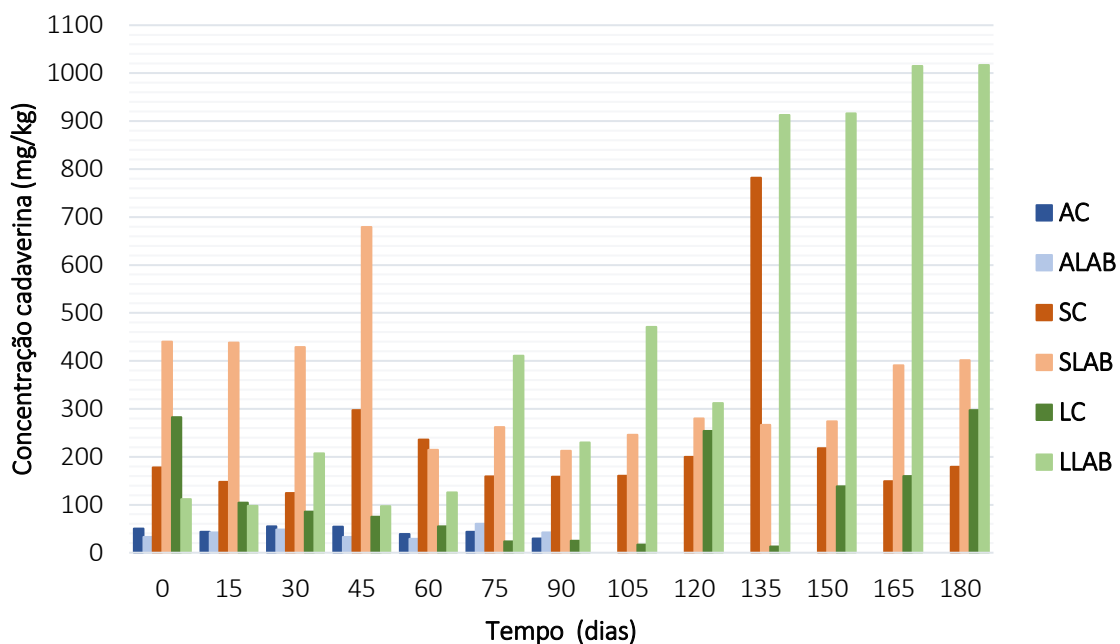


Figura 3.8: Concentração de cadaverina durante o tempo de armazenamento para as amostras controlo e LAB na alheira, no salpicão e no lombo ($R_f=1,39$).

Relativamente à cadaverina (Figura 3.8), o produto que apresentou maior concentração no período inicial de armazenamento foi o salpicão, desde o tempo zero ($t=0$) até aproximadamente o os 60 dias de armazenamento ($t=60$). No entanto, ao longo do tempo, aproximadamente a partir dos 60 dias de armazenamento, a concentração de cadaverina no lombo ultrapassou a concentração observada no salpicão. Por outro lado, comparando os valores obtidos para as amostras controlo e LAB em todos os produtos estudados e ao longo do tempo de armazenamento, parece não ter existido uma tendência clara do efeito da adição da cultura *starter* de LAB das amostras (amostras LAB) na regulação da concentração da cadaverina.

A Figura 3.9 apresenta os resultados obtidos para a AB histamina ao longo do tempo nas várias amostras analisadas.

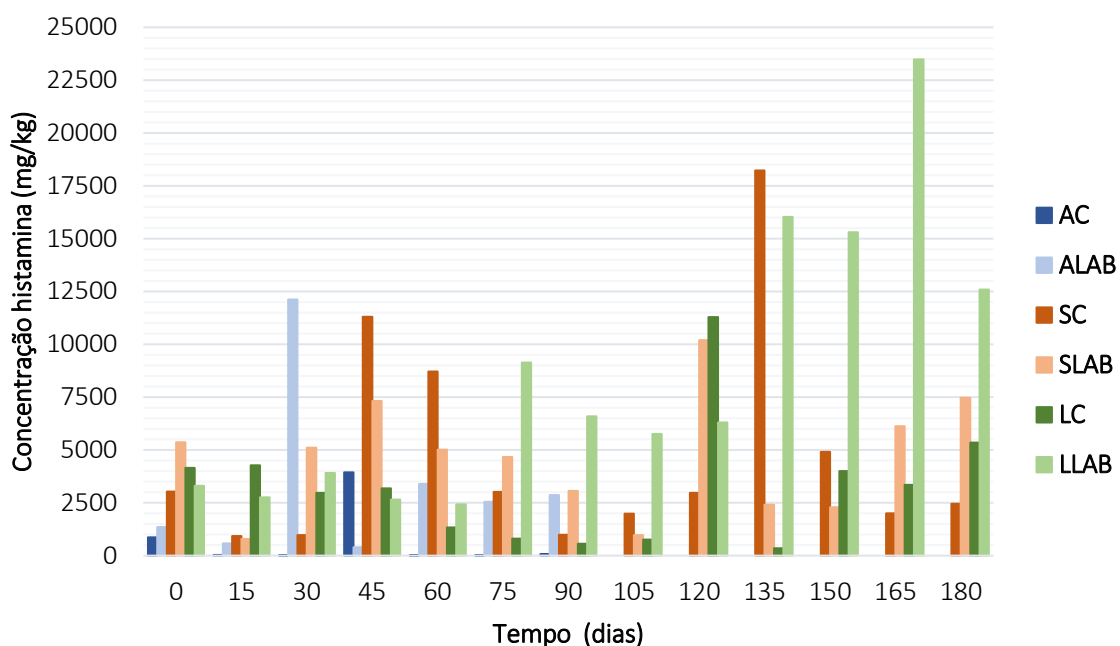


Figura 3.9: Concentração de histamina durante o tempo de armazenamento para as amostras controlo e LAB na alheira, no salpicão e no lombo (Rf=1,13).

O valor mais elevado para a histamina foi obtido na amostra LLAB no $t=165$ (23487 mg/kg) e o valor mais baixo foi obtido numa amostra de AC ($t=30$; 8 mg/kg). Verificou-se ainda que, para o lombo, os valores finais foram superiores aos valores iniciais. Para o caso da alheira, os valores mais elevados foram obtidos a meio do tempo de armazenamento, sendo que as amostras LAB foram as que apresentam valores mais elevados. No salpicão, os valores iniciais e finais foram semelhantes, contudo no $t=135$ a amostra SC apresentou o valor máximo neste produto. Da análise dos resultados obtidos para a histamina é possível verificar que as concentrações obtidas são muito elevadas atingindo valores máximos perto dos 25000 mg/kg de amostra. Deste modo, dado que não existe na literatura casos de estudos com valores tão elevados de histamina e comparando os resultados todos de uma forma geral, é possível afirmar que não existe uma tendência clara nos resultados obtidos ao longo do tempo.

A histamina foi estudada de modo mais extensivo já que esta foi a amina que apresentou valores mais preocupantes do ponto de vista toxicológico, ou seja, foi a amina onde se obteve valores mais elevados. Há ainda a acrescentar, que esta amina biogénica é a única amina com concentração sujeita à regulação legal na Europa, por exemplo, para algumas espécies de peixe o valor de

concentração máxima admissível para a histamina é de 100 mg/kg, segundo o regulamento da Comissão Europeia nº 2073/2005 de 15 de novembro.

Na Tabela 3.5 estão apresentados os resultados obtidos para a histamina - resultados calculados com o fator de respostas (Rf) e resultados calculados a partir da reta de calibração. A reta de calibração está apresentada no Apêndice B.

Tabela 3.5: Comparação dos resultados da concentração de histamina obtidos por Rf e pela reta de calibração (mg/kg).

Dia	Histamina (mg/kg)	Alheira		Salpicão		Lombo	
		LAB	Controlo	LAB	Controlo	LAB	Controlo
0	Rf	1355	867,8	5367	3033	3307	4148
	reta	623,0	363,8	2602	1740	1103	2281
15	Rf	575,6	29,80	791,6	925,6	2763	4275
	reta	273,4	8,476	307,1	692,3	627,9	1993
30	Rf	12128	8,138	5104	973,0	3917	2977
	reta	1804	n.d. ^a	2497	669,6	1390	1172
45	Rf	397,7	3946	7322	11297	2648	3181
	reta	120,1	1791	2947	2867	601,6	1813
60	Rf	3394	12,59	5023	8706	2427	1339
	reta	474,4	n.d. ^a	2070	1968	727,8	473,4
75	Rf	2541	16,60	4665	3019	9131	801,2
	reta	332,2	0,3966	1832	635,0	1846	370,8
90	Rf	2870	77,64	3061	989,2	6589	564,8
	reta	553,2	19,54	1626	150,8	2702	288,6
105	Rf			974,8	1988	5760	763,4
	reta			317,4	383,3	1159	290,2
120	Rf			10200	2975	6305	11285
	reta			1270	990,3	929,9	801,5
135	Rf			2407	18226	16028	350,9
	reta			741,2	2652	2810	88,48
150	Rf			2294	4909	15302	4001
	reta			1265	2242	3032	1290
165	Rf			6121	2003	23487	3351
	reta			2598	614,4	2671	1125
180	Rf			7469	2459	12593	5349
	reta			2083	634,1	2656	1414

^a n.d. – não detetado;

Valores apresentados com 4 algarismos significativos com exceção de números inteiros com maior número de algarismos.

Devido à discrepância observada nos resultados obtidos para a histamina por estes dois métodos de cálculo, fator de resposta e reta de calibração (Tabela 3.5), realizaram-se testes de repetibilidade numa amostra aleatória (Alheira Controlo t=45). Foram realizados 5 ensaios nas mesmas condições e registados os valores das áreas resultantes da integração dos picos dos cromatogramas obtidos. Na Tabela 3.6 estão apresentados os resultados médios obtidos nesses ensaios, com os respetivos desvios-padrão, valores mínimos e máximos e o coeficiente de variação (CV) expresso em percentagem.

Observando os resultados do CV é possível afirmar que o método não é preciso nem repetível, com a cadaverina a apresentar um resultado com 97 % de coeficiente de variação.

Como os resultados obtidos não apresentaram uma fiabilidade aceitável, o método utilizado neste estudo foi aferido.

Tabela 3.6: Teste de repetibilidade numa amostra de alheira controlo t=45 dias (mg/kg; n=5).

Amina biogénica	Média (mg/kg)	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	CV (%)
Putrescina	94	33	38	117	35
Cadaverina	83	80	22	223	97
Histamina	3474	2549	864	6517	73

3.1.3 Aferição do método: Alteração do pH

Apesar de nos testes preliminares ter existido repetibilidade de resultados quando o método foi testado com padrões, o mesmo não foi verificado quando este foi utilizado nas amostras. Analisando a literatura, vários estudos mostraram que o pH ótimo para a formação de ABs é ácido, contudo na determinação por este método específico, o pH final de cada amostra derivatizada teria de ser entre 10 e 11 (Doeun *et al.*, 2017). Assim, usando uma amostra comercial de alheira (extra ao estudo), testou-se o procedimento apenas aumentando o pH da amostra a injetar de pH 7 para um pH de 10. Este aumento de pH para um valor final de pH 10, foi conseguido aumentando a quantidade de amónia adicionada após a derivatização. Assim, passou-se a adicionar 100µL de NH₄OH (25%) em vez dos 25 µL de NH₄OH (12,5%) (Mey *et al.*, 2012). Moret & Conte (1996) explicam o efeito do pH na determinação de ABs, pelo facto deste parâmetro influenciar o equilíbrio entre as fases aquosa e orgânica.

O novo procedimento (M1 modificado) foi testado tendo sido obtido os resultados apresentados na Tabela 3.7. A Figura 3.10 apresenta os cromatogramas obtidos com esta alteração do método, em vista “overlaid” para facilitar a comparação dos mesmos.

Tabela 3.7: Repetibilidade do método 1 modificado (mg/kg; n=3).

Concentração amina biogénica (mg/kg)	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	CV (%)
Putrescina	87,9	8,0	78,7	92,8	9,1
Cadaverina	74,9	3,0	71,4	76,8	4,0
Histamina	33,4	2,1	31,0	35,0	6,3

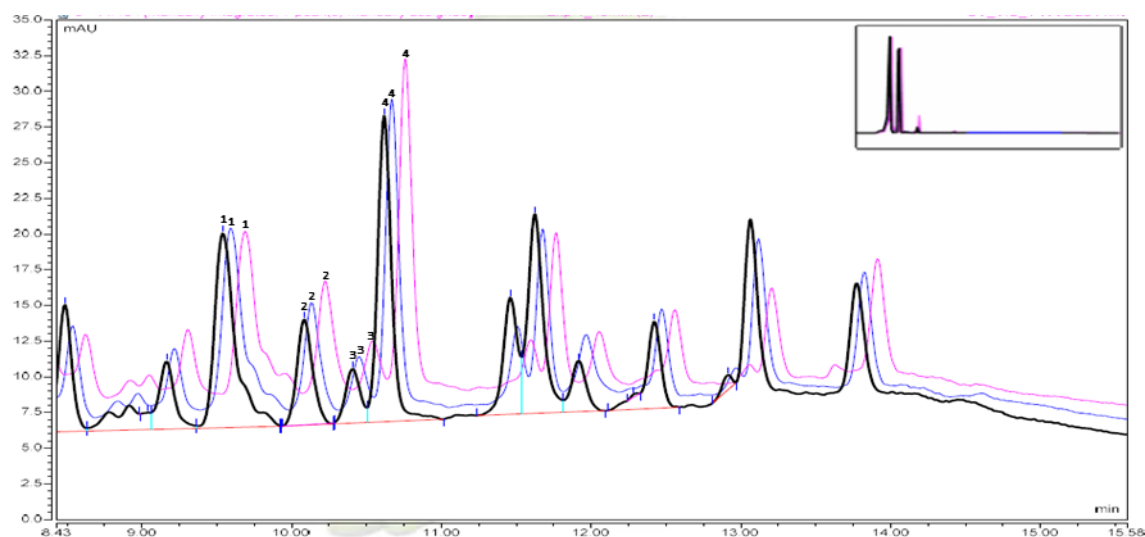


Figura 3.10: Cromatogramas ampliados da amostra de alheira comercial - estudo de repetibilidade do método (n=3). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Histamina; 4- Padrão interno.

Resultados similares de AB foram apresentados em estudos de Sun *et al.* (2016) com valores de 73 mg/kg para a putrescina e de 74 mg/kg para a cadaverina, mas com valores bastante superiores para a histamina, entre 114-327 mg/kg. O estudo de Parente *et al.* (2001) também apresentou valores semelhantes aos deste estudo com 99 mg/kg de putrescina, 61 mg/kg de cadaverina e 22 mg/kg de histamina.

Existem na literatura outros estudos em que os resultados apresentados foram mais elevados quando comparados aos deste estudo, por exemplo, em estudos com alheiras com valores

de 180 mg/kg de Cadaverina, 130 mg/kg de Putrescina e 56 mg/kg de histamina (Eerola, Sagués & Hirvi, 1998; Eerola *et al.*, 1996).

3.2 Método 2

Os resultados da quantificação das aminas nas amostras seguindo o método 1 indicaram valores muito acima do valor de referência para a histamina (200 mg/kg). Por outro lado, no método 1 as condições de reação conduziram a um pH final neutro (pH 7) nas misturas preparadas para a quantificação das AB. O pH final obtido para as amostras dos diversos produtos pode ter influenciado os resultados. Este pressuposto, parece suportado pelos autores Moret & Conte (1996) que referem que as condições de pH influenciam os resultados da quantificação as aminas.

Para verificação dos resultados da quantificação das aminas obtidos pelo método 1 optou-se pela repetição do estudo nas mesmas amostras, mas pelo método publicado no *Journal of AOAC International* VOL. 82, NO. 5, 1999 por Duflos *et al.* (1999). Este segundo método é mais produtivo pois permite fazer maior número de determinações por dia (18 amostras por dia) enquanto que no método 1 apenas se conseguia fazer 4 amostras por dia.

3.2.1 Testes preliminares

Os testes preliminares deste método consistiram principalmente em avaliar a repetibilidade do método base, usando a mesma amostra utilizada na aferição do método 1 e comparando os resultados obtidos.

Assim, na Tabela 3.8 estão apresentados os valores obtidos em cada método para a mesma amostra de alheira comercial (extra ao estudo). Nessa tabela pode-se comparar a média, desvio-padrão, valores máximos e mínimos e o coeficiente de variação. Para uma comparação mais exhaustiva dos métodos realizou-se o teste F (análise de variâncias) e o teste *t-student* para cada uma das aminas quantificadas (Tabela 3.8).

Tabela 3.8: Comparação dos dois métodos para uma mesma amostra de alheira comercial (mg/kg; n=3).

Método	Amina biogénica	Concentração média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	CV (%)
Método 1 modificado	Putrescina	87,9	8,0	78,7	92,8	9,1
	Cadaverina	74,9	3,0	71,4	76,8	4,0
	Histamina	33,4	2,1	31,0	35,0	6,3
Método 2	Putrescina	75,5	3,0	72,6	78,5	3,9
	Cadaverina	113,9	1,7	112,7	115,8	1,5
	Histamina	41,4	6,2	37,1	48,5	15
Estudo M1 vs. M2		Teste <i>t-student</i>	Análise de variâncias			
<i>p</i>	Putrescina	0,065	0,122			
	Cadaverina	<0,005	0,239			
	Histamina	0,102	0,102			

Como se pode observar na Tabela 3.8, verifica-se que os valores são muito diversos, mas a análise de variâncias indica que não há diferenças significativas entre as variâncias dos métodos 1 modificado e 2 para as três aminas. Na comparação das médias (com o teste *t-student*) verifica-se que não há diferenças significativas entre os dois métodos na quantificação de putrescina e histamina, mas que há diferença muito significativa ($p < 0,005$) para a cadaverina.

Este resultado é evidenciado pela análise da Figura 3.11 em que a amina cadaverina foi a que apresentou maior diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos.

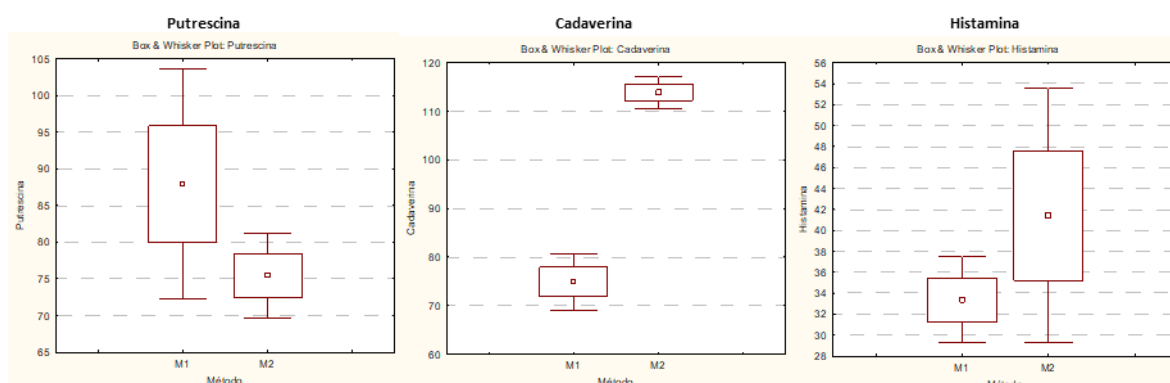


Figura 3.11: Diagramas de caixa e bigodes para comparação do M1 modificado e do M2 em cada AB.

Na Figura 3.12 é possível observar os cromatogramas das várias injeções efetuadas da amostra, tendo sido, como se pode verificar, a amostra analisada em triplicado. No lado esquerdo

da figura é apresentada a vista geral dos cromatogramas das várias injeções e do lado direito são apresentadas ampliações dos mesmos, focando os picos das aminas analisadas.

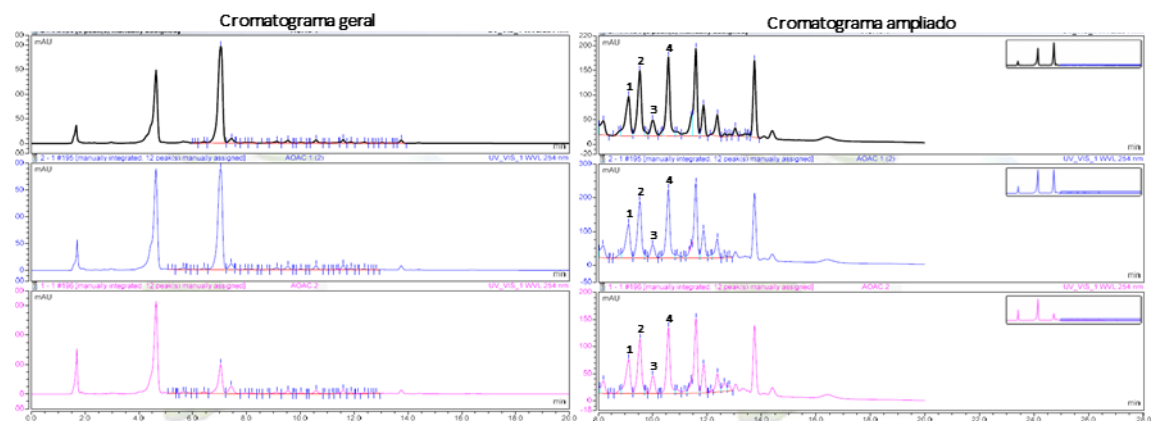


Figura 3.12: Cromatogramas da repetibilidade do método 2 na amostra de alheira comercial (n=3). Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Histamina; 4- Padrão interno.

Para estudar o comportamento seguido pelos padrões quando submetidos ao procedimento deste método, foram preparadas soluções de 2 mg/mL de cada padrão (sal hidroclicóric) e quantificadas as AB. A Figura 3.13 apresenta os seis cromatogramas das aminas analisadas em “overlaid”. Deste modo, foi possível identificar e determinar o tempo de retenção de cada padrão, ou seja, de cada amina biogénica.

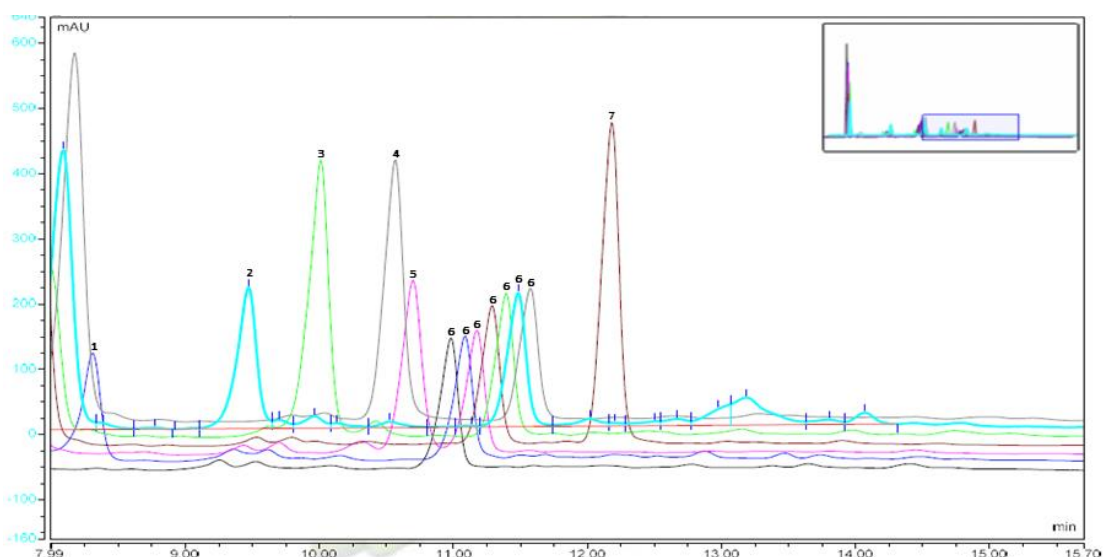


Figura 3.13: Cromatogramas em vista “overlaid” para identificação das seis ABs. Identificação dos picos: 1- Triptamina; 2- Feniletilamina; 3- Putrescina; 4- Cadaverina; 5- Histamina; 6- Padrão Interno; 7- Tiramina.

Os tempos de retenção obtidos para os padrões, tanto neste método como no método 1, onde apenas se estudaram os padrões putrescina, cadaverina, histamina e padrão interno (PI), são apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9: Tempos de retenção obtidos para cada padrão.

Amina	Tempo de retenção (min)
Triptamina	8,23
Feniletilamina	9,09
Putrescina	9,70
Cadaverina	10,10
Histamina	10,54
PI	10,98
Tiramina	11,95

3.2.2 Quantificação de aminas biogénicas nas amostras

Neste método foi medido o pH durante a derivatização e no final em todas as amostras. O pH não variou para as diferentes amostras, sendo o valor final de pH=5 (Apêndice E).

Todas as amostras foram analisadas em duplicado, sendo calculado o conteúdo de ABs nos três produtos em ambos os batches, utilizando as áreas obtidas dos cromatogramas. Os resultados obtidos foram expressos na forma de média \pm desvio-padrão, sendo as unidades mg AB/kg amostra.

No Apêndice F, tal como no método 1, estão apresentados exemplos de cromatogramas obtidos em HPLC das análises aos três produtos em ambos os batches para o t=0. Nestas figuras são apresentados os cromatogramas completos para cada amostra e os cromatogramas ampliados na zona onde se encontram os picos das seis aminas estudadas e do PI. Os cromatogramas apresentados na parte de cima das figuras, correspondem aos cromatogramas das amostras controlo e os apresentados na parte de baixo correspondem às amostras LAB.

Relativamente aos resultados, no Apêndice G estão apresentados as áreas obtidas nos cromatogramas para as aminas nas amostras estudadas (Tabela G1) e os resultados obtidos para a concentração de ABs na alheira (Tabela G2), no salpicão (Tabela G3) e no lombo (Tabela G4) expressas em mg/kg de cada amina quantificada.

As figuras apresentadas abaixo são representações gráficas dos resultados obtidos ao longo do período de armazenamento. Estas figuras mostram a evolução do conteúdo de ABs ao longo do

tempo de armazenamento, comparando lado a lado a concentração das aminas para o mesmo produto nos dois batchs, pertencendo a cor mais escura às amostras controlo e a cor mais clara às amostras LAB. Nos gráficos também são apresentados os desvios-padrão obtidos para cada amostra.

Na Figura 3.14 está apresentada a evolução ao longo do tempo da concentração de triptamina nas amostras analisadas.

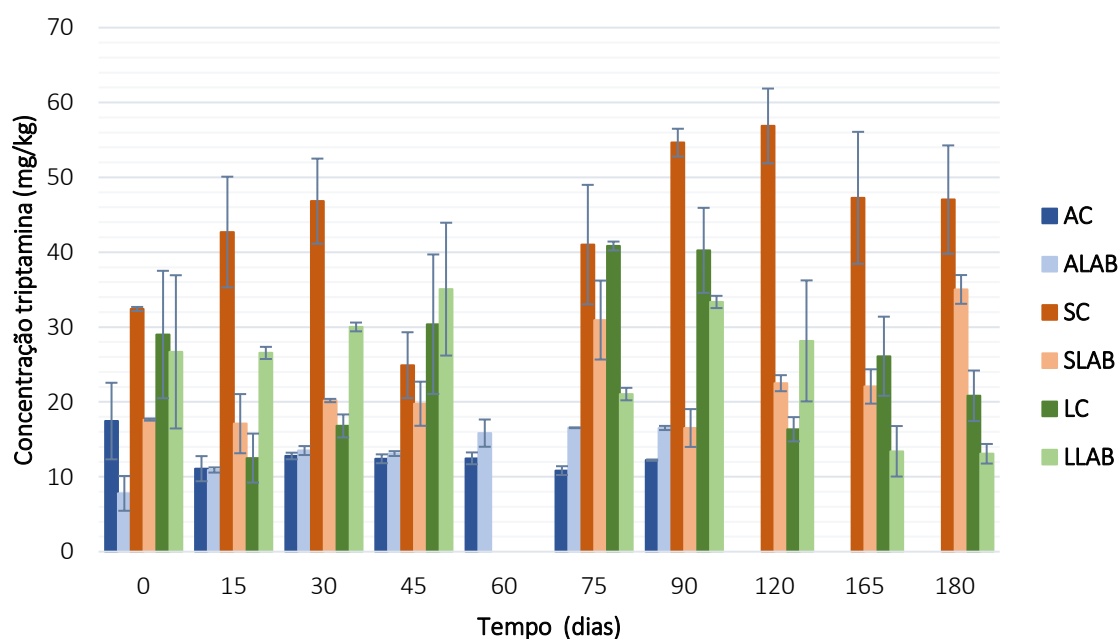


Figura 3.14: Concentração de triptamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,44).

Os valores mais elevados observados para a triptamina foram encontrados principalmente nas amostras de SC (57 mg/kg; t=120) e os mais baixos nas amostras de ALAB (8 mg/kg; t=0). Na AC os valores iniciais foram superiores aos finais atingindo um máximo de 17 mg/kg no t=0 e um mínimo de 11 mg/kg no t=75. Já nas amostras ALAB o valor máximo atingido foi nos tempos t=75 e t=90 com 17 mg/kg e o valor mínimo no t=0 com 8 mg/kg. Nas amostras de salpicão as concentrações finais foram superiores às concentrações iniciais, como seria esperado, sendo a concentração máxima encontrada no t=120 para as amostras SC com 57 mg/kg e no t=180 nas amostras SLAB com 35 mg/kg. As concentrações mínimas encontradas para os dois batchs de salpicão foram de 25 mg/kg para as amostras SC e 17 mg/kg para as amostras SLAB, nos tempos t=45 e t=90, respetivamente.

Relativamente as amostras de lombo, as concentrações finais de triptamina foram maiores nas amostras controlo do que nas LAB (t=180: C=21 mg/kg; LAB=13 mg/kg), contudo nos tempos iniciais a sua concentração nas amostras LAB foi superior (t=15: C=13 mg/kg; LAB=27 mg/kg), à exceção da data de início do armazenamento, ou seja, do t=0 (C=29 mg/kg; LAB=27 mg/kg).

De uma forma geral, no salpicão e no lombo existiu uma maior concentração de triptamina nas amostras controlo. Na alheira não foi claro em que amostras existiu maior concentração desta amina biogénica, porém a concentração nas amostras LAB aumentou ao longo do tempo e nas amostras controlo diminuiu.

Nos resultados obtidos para a amina feniletilamina (Figura 3.15) foi observada uma homogeneidade na tendência dos resultados, sendo possível separar os resultados LAB dos C.

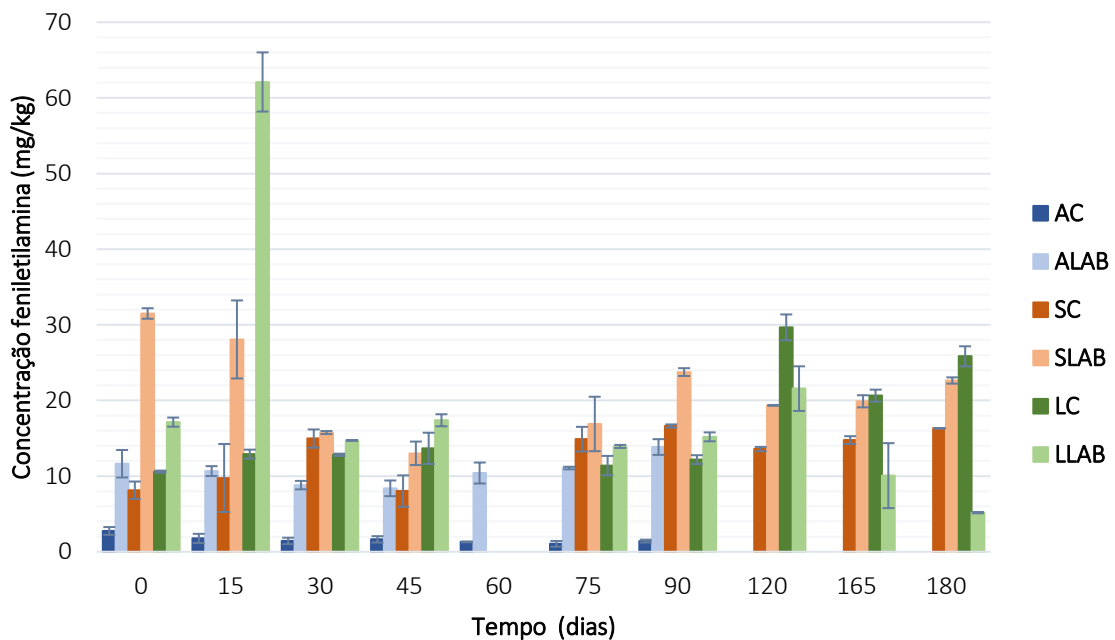


Figura 3.15: Concentração de feniletilamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batches (n=2) (Rf=0,56).

Ao longo do tempo de armazenamento, as amostras ALAB e SLAB apresentaram concentrações superiores de feniletilamina quando comparadas com as amostras AC e SC, respetivamente. As concentrações mais elevadas desta amina foram registadas para as amostras SLAB no início do tempo de armazenamento (t=0 e t=15), e para as amostras de ALAB no fim desse período. Assim, as amostras AC apresentaram uma tendência de diminuição de concentração ao

longo de tempo (t=0: 2,8 mg/kg; t=90: 1,4 mg/kg) e as ALAB de aumento (t=0: 12 mg/kg; t=90: 14 mg/kg). Já as amostras SC e SLAB apresentaram concentrações de 8 mg/kg e 32 mg/kg no t=0, e no t=180 apresentaram 16 mg/kg e 23 mg/kg, respetivamente. Relativamente às amostras de lombo, a concentração no t=180 de feniletilamina foi superior nas amostras C do que nas LAB, 26 mg/kg e 5,2 mg/kg, respetivamente. Contudo, inicialmente as amostras LLAB atingiram um pico de 62 mg/kg no t=15, diminuindo nos tempos seguintes.

Relativamente à putrescina, as amostras de salpicao apresentaram concentrações mais elevadas do que as observadas nos outros produtos (Figura 3.16 e 3.17).

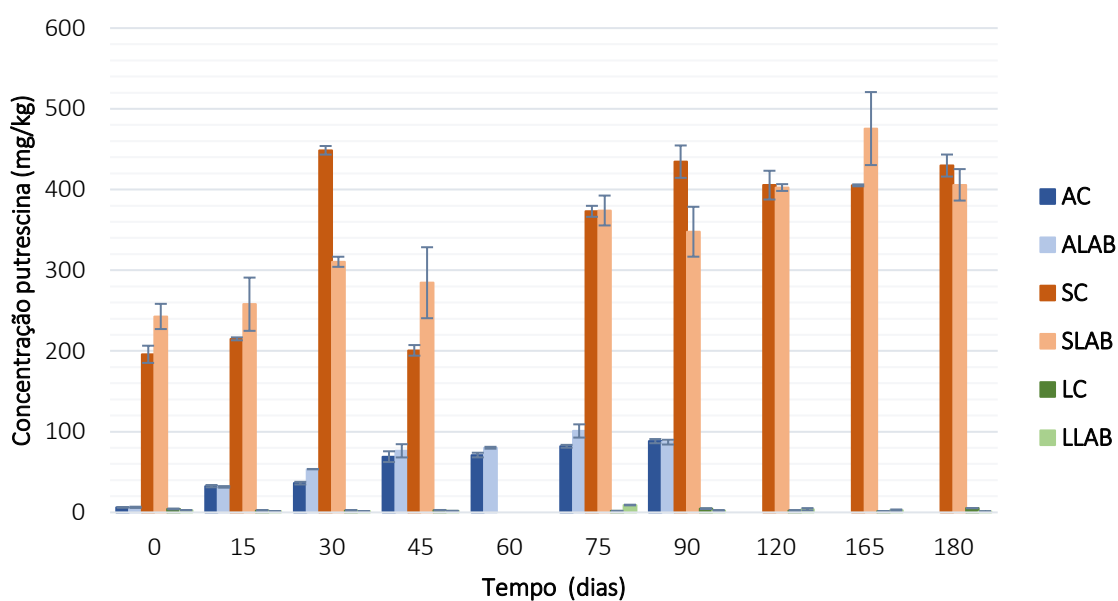


Figura 3.16: Concentração de putrescina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicao e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=1,38).

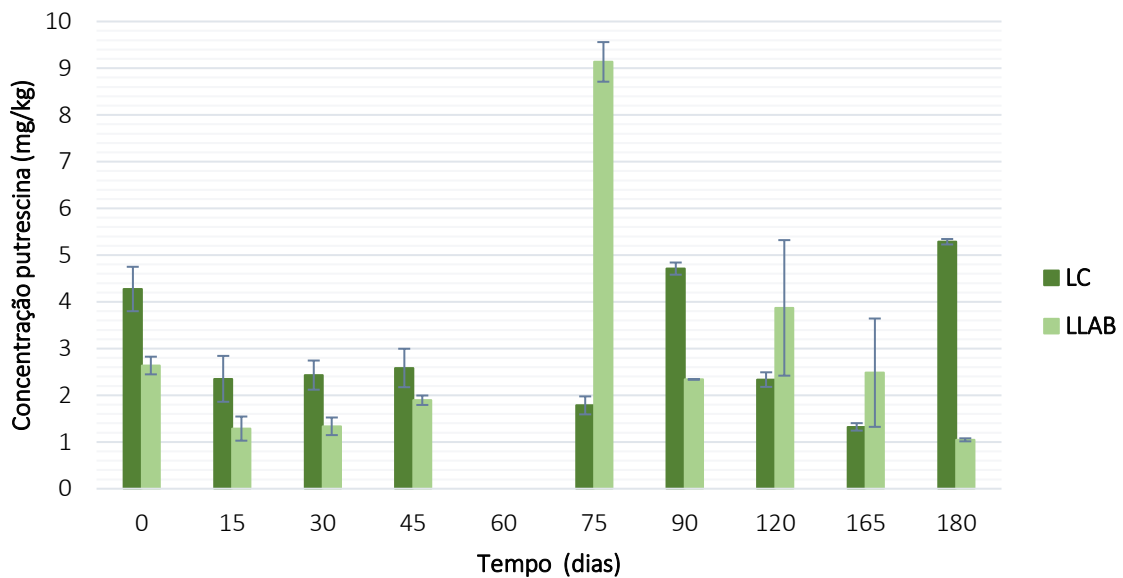


Figura 3.17: Concentração de putrescina durante o tempo de armazenamento para as amostras de lombo fatiado em ambos os batchs (n=2) (Rf=1,38).

Os resultados obtidos mostram um aumento de putrescina para as amostras de salpicão e alheira em ambos os batchs. No salpicão, inicialmente (t=0) as concentrações desta amina obtidas para as amostras SC e SLAB foram de 196 mg/kg e 243 mg/kg, enquanto que no fim do tempo de armazenamento (t=180) foram de 430 mg/kg e 406 mg/kg, respetivamente. Em relação as amostras AC e ALAB, estas apresentaram uma evolução linear ao longo do tempo de armazenamento, com valores de 6,2 mg/kg e 6,3 mg/kg no t=0 e de 88 mg/kg e 87 mg/kg no t=180, respetivamente. No lombo (Figura 3.17) os resultados obtidos foram muito baixos, sendo os valores máximos de 5,3 mg/kg no t=180 nas amostras controlo e de 9,1 mg/kg no t=75 nas amostras LAB. Este produto não apresentou uma tendência clara de aumento ou diminuição da concentração de putrescina ao longo do tempo, e nenhum dos batchs se evidenciou com maior conteúdo da mesma.

Tal como reportado para a putrescina, o produto que apresentou concentrações mais elevadas de cadaverina foi o salpicão (Figura 3.18).

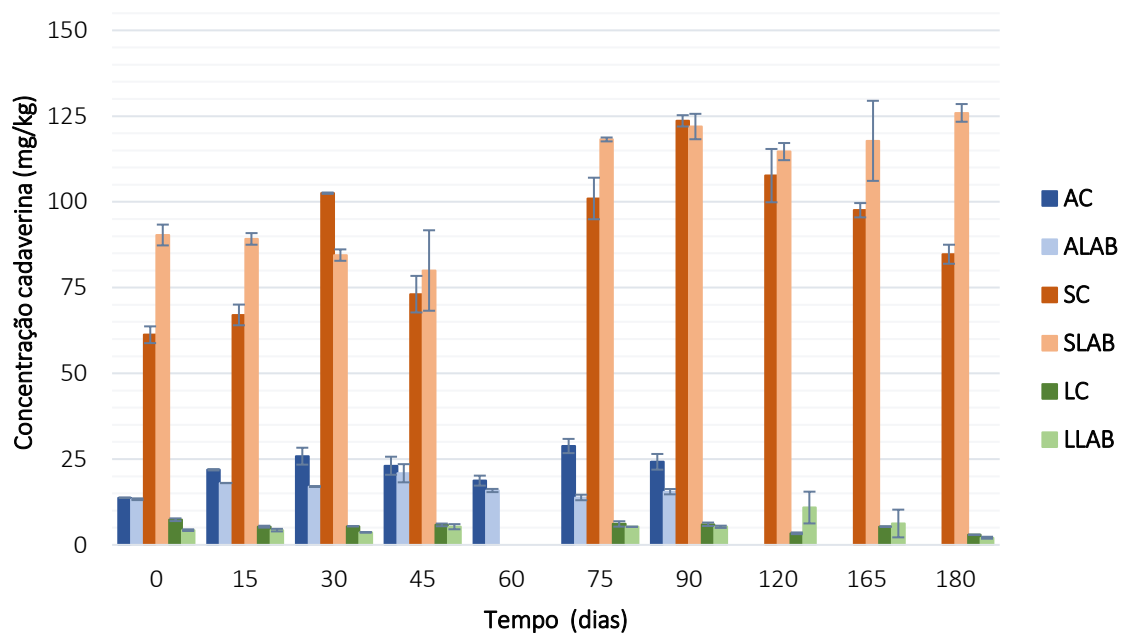


Figura 3.18: Concentração de cadaverina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=1,28).

Tanto no salpicão como no lombo, no final do tempo de armazenamento as amostras LAB foram as que apresentam maior concentração de cadaverina. Relativamente ao salpicão, este mostrou uma concentração máxima de 126 mg/kg no t=180 para as amostras SLAB, sendo os valores mais baixos registados no t=0 com 61 mg/kg nas amostras SC. No lombo existiu uma diminuição da concentração ao longo do tempo de armazenamento para as amostras LC, no entanto as amostras LLAB mostraram um aumento desta amina, sendo exceção o t=180 onde as amostras LLAB apresentaram o seu valor mínimo de 2,1 mg/kg. Nas amostras de ALAB o aumento de concentração ao longo do tempo é mínimo, apresentando no t=0 uma concentração de 13 mg/kg e no t=90 de 16 mg/kg. Já nas amostras C deste produto houve um aumento, apresentando valores no t=0 de 14 mg/kg e no t=90 de 24 mg/kg.

Na histamina (Figura 3.19 e 3.20) o salpicão também mostrou ser o produto que apresentou valores mais elevados por kg de amostra.

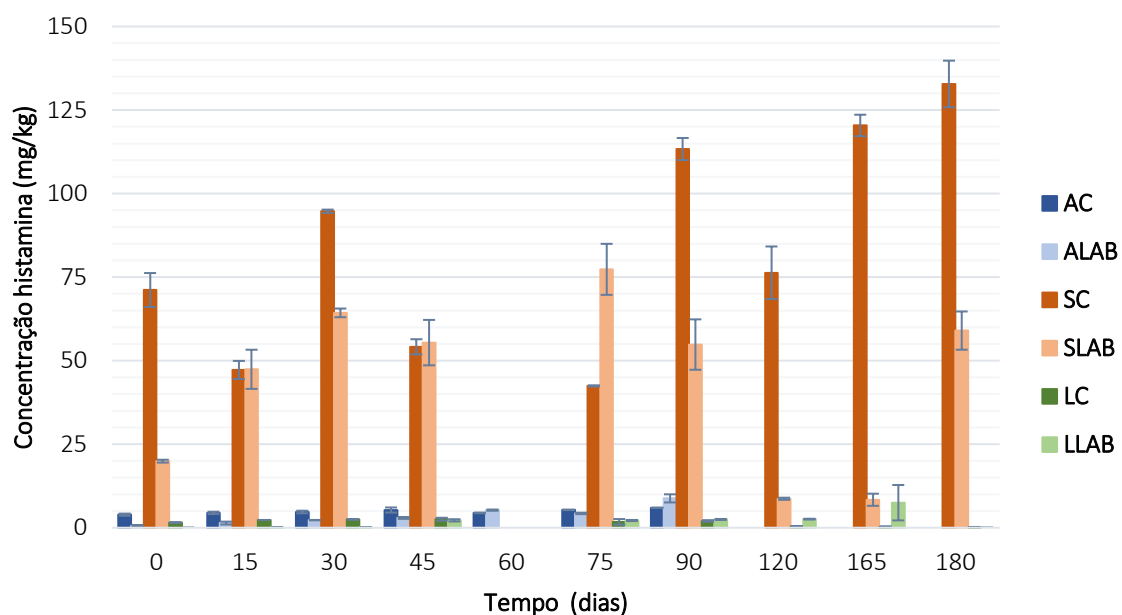


Figura 3.19: Concentração de histamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batches (n=2) (Rf=0,98).

As amostras SC apresentaram maior concentração desta amina biogénica em relação as amostras SLAB ao longo do tempo, tendo sido registados os seus valores mais elevados no final do tempo de armazenamento (133 mg/kg; t=180). A evolução ao longo do tempo da concentração de histamina das amostras SLAB não seguiu uma tendência clara apesar da concentração inicial (20 mg/kg) ter sido inferior à registada no final do tempo de armazenamento (59 mg/kg).

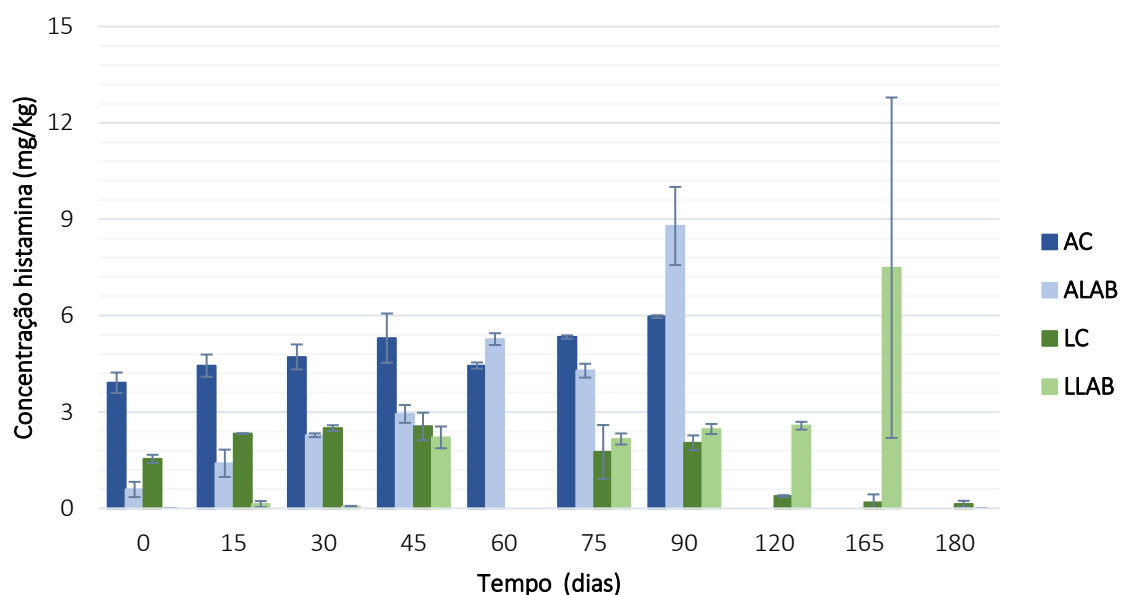


Figura 3.20: Concentração de histamina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,98).

Relativamente aos produtos alheira e lombo, as concentrações foram muito mais baixas, existindo mesmo algumas amostras de LLAB (t=0 e t=180) em que histamina não foi detetada pelo equipamento, ou seja, amostras com concentrações de histamina abaixo do limite de deteção. As amostras de alheira apresentaram um ligeiro aumento de concentração de histamina ao longo do tempo, registando para o t=0 concentrações de 3,9 mg/kg e de 0,59 mg/kg e para o t=90 concentrações de 6,0 mg/kg e 9,8 mg/kg, para as amostras de AC e ALAB, respetivamente.

Relativamente aos resultados obtidos para a tiramina, apresentados na Figura 3.21, foi possível observar que, no final do tempo de armazenamento as concentrações das amostras C foram superiores às das amostras LAB em todos os produtos.

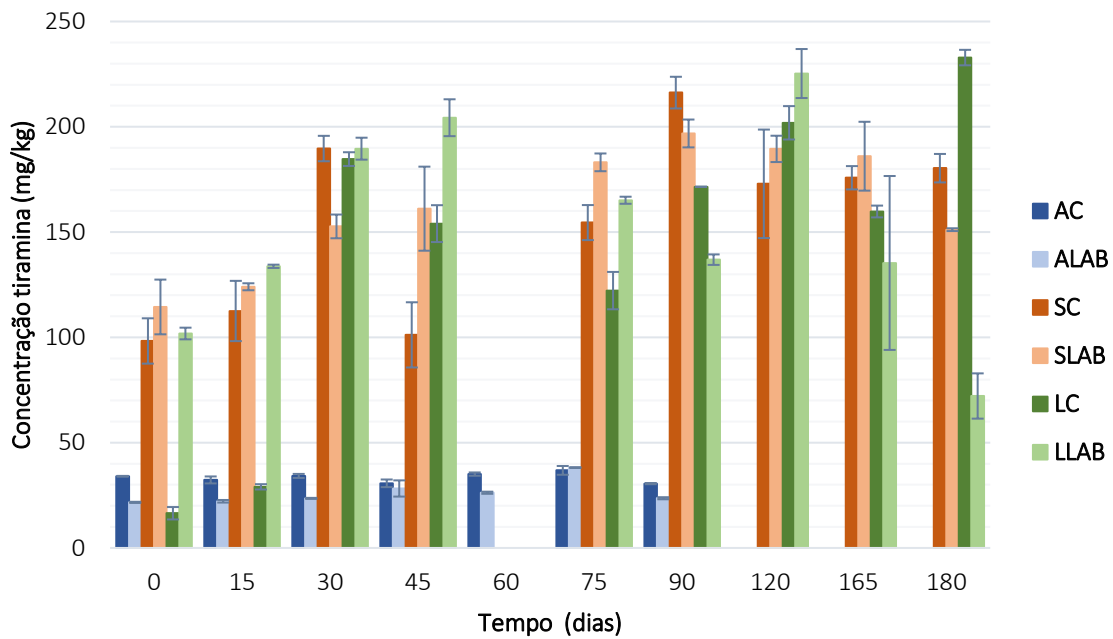


Figura 3.21: Concentração de tiramina durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batchs (n=2) (Rf=0,95).

De um modo geral, as concentrações máximas para esta amina foram atingidas no final do tempo de armazenamento, à exceção da alheira. A alheira no início do tempo de armazenamento apresentou valores para as amostras AC e ALAB de 34 mg/kg e 22 mg/kg e no final valores de 31 mg/kg e 24 mg/kg. No salpicão, os valores iniciais nas amostras SC e SLAB foram de 98 mg/kg e 114 mg/kg e os valores finais de 180 mg/kg e 151 mg/kg. Relativamente ao lombo, este produto, no período inicial do armazenamento, apresentou valores de tiramina nas amostras C mais baixos que nas amostras LAB, que foram aumentando ao longo do tempo (amostras C, t=0: 17 mg/kg; t=180: 233 mg/kg), verificando-se o inverso nas amostras LLAB, ou seja, as amostras apresentaram valores mais elevados que os valores do controlo no início, tendo no entanto, apresentado valores inferiores aos do controlo no fim do período de armazenamento (t=0: 102 mg/kg; t=180: 72 mg/kg).

Tendo em conta os resultados obtidos para as aminas, verificou-se que o lombo apresentou normalmente valores elevados de coeficiente de variação (CV) em todas as ABs. Este facto pode ter sido causado por este produto apresentar para as aminas concentrações pequenas, e assim qualquer variação de concentração entre réplicas (desvio-padrão), por mais pequena que fosse resultar em CV elevados. Relativamente aos outros produtos, normalmente este parâmetro estatístico apresentou valores relativamente baixos (maioritariamente abaixo de 10 %).

De uma forma geral, observando os resultados obtidos, as culturas LAB nem sempre foram capazes de controlar as estirpes de descarboxilase-positiva, como reportado em outros estudos (Suzzi & Gardini, 2003).

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 3.22) mostra separação de amostras dos diferentes produtos, não se verificando, no entanto, separação entre batch de cada produto.

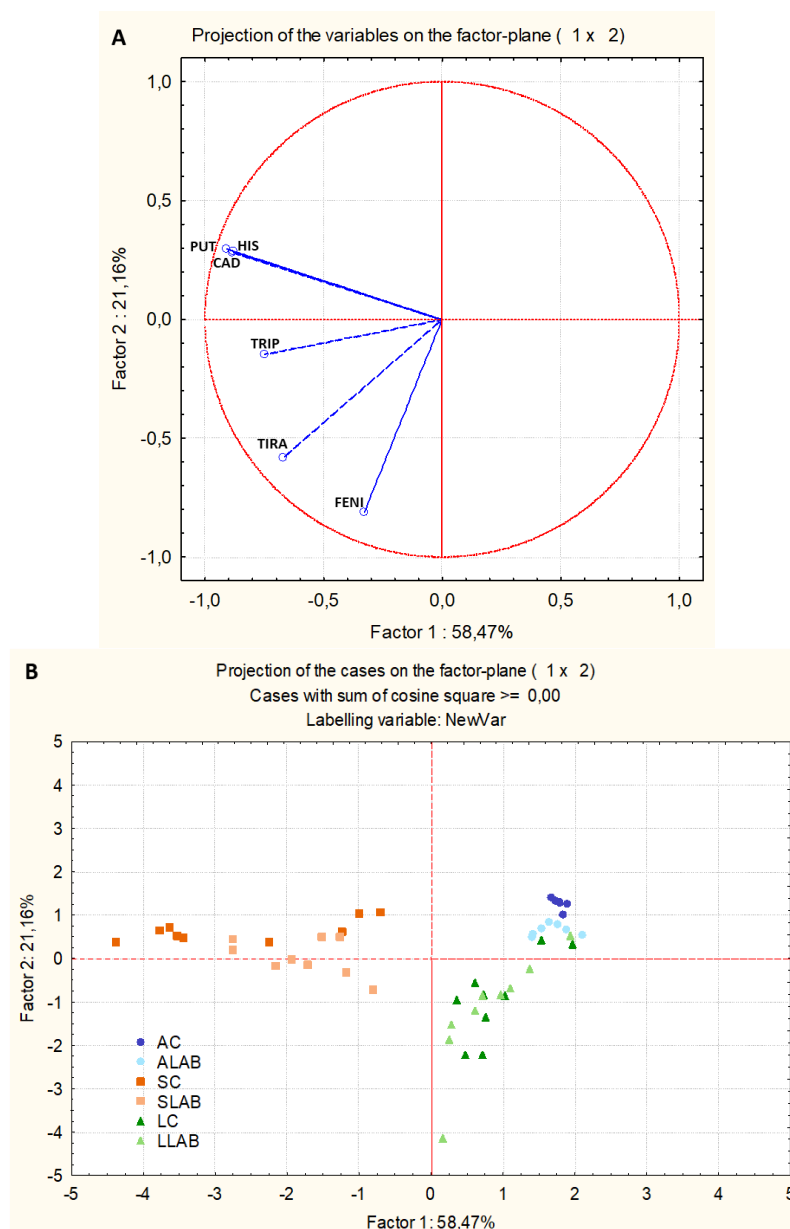


Figura 3.22: Análise de componentes principais com a projeção das ABs analisadas (A) e a projeção das amostras (B).

A maioria das amostras do salpicão está projetada no quadrante do PCA associado à histamina, putrescina e cadaverina, estando também associadas à triptamina. Relativamente, ao lombo, a sua projeção da maioria das suas amostras indica como aminas associadas a este produto a tiramina, a feniletilamina e a triptamina. Em relação às amostras alheira, elas não aparecem associadas em nenhuma amina em particular.

Realizou-se também o teste *t-student* nos três produtos para comparar os resultados obtidos nas amostras controlo com os obtidos nos LAB. Os resultados do teste *t-student* estão apresentados no Apêndice H (Tabela H1). Na alheira existiram diferenças significativas entre os dois batchs nas aminas: feniletilamina ($p<0,001$) que apresentou valores mais baixos nas amostras C; e cadaverina ($p=0,021$) e tiramina ($p=0,008$) que mostraram valores mais baixos nas amostras LAB. O salpicão apresentou diferenças significativas nas aminas triptamina ($p<0,001$) e histamina ($p=0,031$), com registo de valores mais baixos nas amostras LAB. Este produto apresentou ainda diferenças nas aminas feniletilamina ($p=0,012$) e cadaverina ($p=0,046$) com valores mais baixos nas amostras C.

As amostras de lombo não apresentam diferenças significativas no estudo das aminas nas amostras C e LAB.

3.2.3 Repetibilidade do método

Com o objetivo de verificar a repetibilidade do método calculou-se o *recovery* e o coeficiente de variação (Tabela 3.10). Sendo o coeficiente de variação uma medida para avaliar a precisão do método, e apresentando valores baixos, tal parece indicar que o método é fiável e apresenta robustez nos resultados. O *recovery* foi sempre elevado já que os valores observados estão dentro de um intervalo de 100 ± 4 %.

Tabela 3.10: Teste de repetibilidade e % *recovery* (mg/kg; n=2).

Amina	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Recovery (%)	CV (%)
Triptamina	17,74	0,25	17,57	17,92	99	1,4
Feniletilamina	16,45	0,44	16,14	16,76	102	2,7
Putrescina	12,94	0,50	12,59	13,30	103	3,9
Cadaverina	13,56	0,45	13,25	13,88	102	3,3
Histamina	12,69	0,61	12,26	13,12	104	4,8
Tiramina	18,675	0,043	18,645	18,705	100	0,23

3.3 Aminas biogénicas como índice de qualidade

Para se aferir a qualidade dos produtos cárneos em estudo foram calculados alguns índices cujos valores são apresentados na Tabela 3.11.

Tabela 3.11: Total de aminas vasoativas (VAT), índice de ABs (BAI) e total da soma das ABs (BAT) em cada produto analisado ao longo do tempo (mg/kg).

Dias	Batch	Alheira			Salpicão			Lombo		
		VAT	BAI	BAT	VAT	BAI	BAT	VAT	BAI	BAT
0	C	58,1	57,9	78,1	200	427	467	57,6	29,6	69,2
	LAB	41,7	41,9	61,3	254	467	517	146	109	153
15	C	49,6	91,2	104	232	442	497	56,8	39,0	64,4
	LAB	45,1	73,2	94,8	258	519	564	223	139	228
30	C	53,1	101	115	354	836	897	217	195	225
	LAB	48,1	96,4	119	273	612	648	234	195	239
45	C	50,0	128	142	207	429	462	201	165	209
	LAB	52,7	128	150	274	581	614	259	214	266
60	C	53,3	129	143						
	LAB	57,7	127	154						
75	C	54,0	153	165	311	671	727	176	132	184
	LAB	70,1	157	185	349	753	800	202	182	217
90	C	50,2	149	163	411	888	959	226	184	237
	LAB	62,8	135	165	359	721	762	188	147	196
120	C				351	762	833	248	208	254
	LAB				346	715	757	278	243	292
165	C				335	799	861	207	167	213
	LAB				346	788	830	166	152	175
180	C				328	828	891	280	241	288
	LAB				335	742	800	90,4	75,3	93,5

A soma das ABs vasoativas (triptamina, feniletilamina, histamina e a tiramina) foi proposta como um possível indicador das condições higiénicas e boas praticas de fabrico em enchidos (Suzzi & Gardini, 2003). Da observação dos valores obtidos para o VAT (Tabela 3.11) verificou-se que o salpicão apresentou sempre os valores mais elevados e a alheira os mais baixos (Figura 3.23).

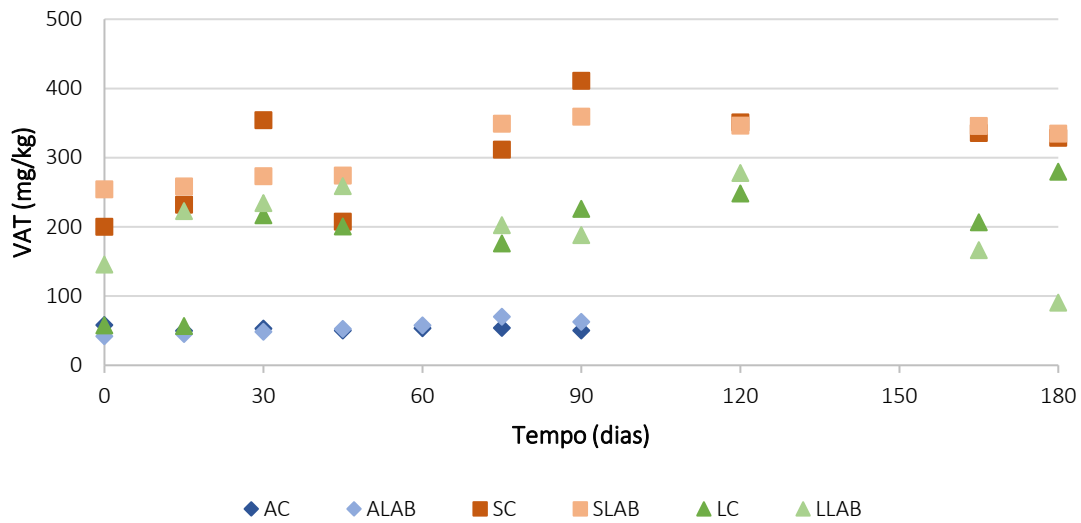


Figura 3.23: Total de aminas vasoativas (VAT) durante o tempo de armazenamento para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batches.

Pela análise do índice de qualidade de ABs (BAI) e da soma de todas as ABs, verificou-se que existiu um gradiente nos três produtos de ABs (Tabela 3.11). Hernández-Jover *et al.* (1996) e Özogul & Özogul (2020) sugeriram como limites BAI, os valores de <5 mg/kg para boa qualidade de carne fresca, entre 5 e 20 mg/kg para carne aceitável, entre 20 e 50 mg/kg para baixa qualidade de carne e >50 mg/kg para carne estragada. Comparando os resultados obtidos com estes limites, verificou-se que apenas as amostras ALAB0, LCO e LC15 se encontravam dentro do limite para baixa qualidade de carne fresca, com valores de 41,9 mg/kg, 29,6 mg/kg e 39,0 mg/kg, respectivamente.

Estes resultados são apresentados em forma de gráfico juntamente com os limites sugeridos pelos autores acima referidos (Figura 3.24). Assim, os valores apresentados abaixo da linha verde - correspondem a amostras em que a matéria prima apresentava boa qualidade, entre a linha verde e a amarela - a amostras em que matéria prima apresentava qualidade aceitável, da linha amarela à vermelha - a amostras em que a matéria prima apresentava baixa qualidade e os resultados apresentados acima da linha vermelha - corresponde a amostras em que a matéria prima não apresentava qualidade.

Comparando as Figuras 3.23 e 3.24 verificou-se que a tendência mostrada pelos diferentes produtos ao longo do tempo foi semelhante para estes dois indicadores. Assim, parece existir uma relação entre o conteúdo de aminas vasoativas e a qualidade dos produtos cárneos.

Amostras com valores elevados de total de aminas vasoativas mostravam normalmente valores de BAI elevados, sendo as aminas deste último grupo potencializadores da toxicidade das aminas vasoativas (Eerola, Sagués & Hirvi, 1998). A formação de aminas pode estar relacionada com problemas das condições de higiene da matéria prima e das boas praticas de fabrico.

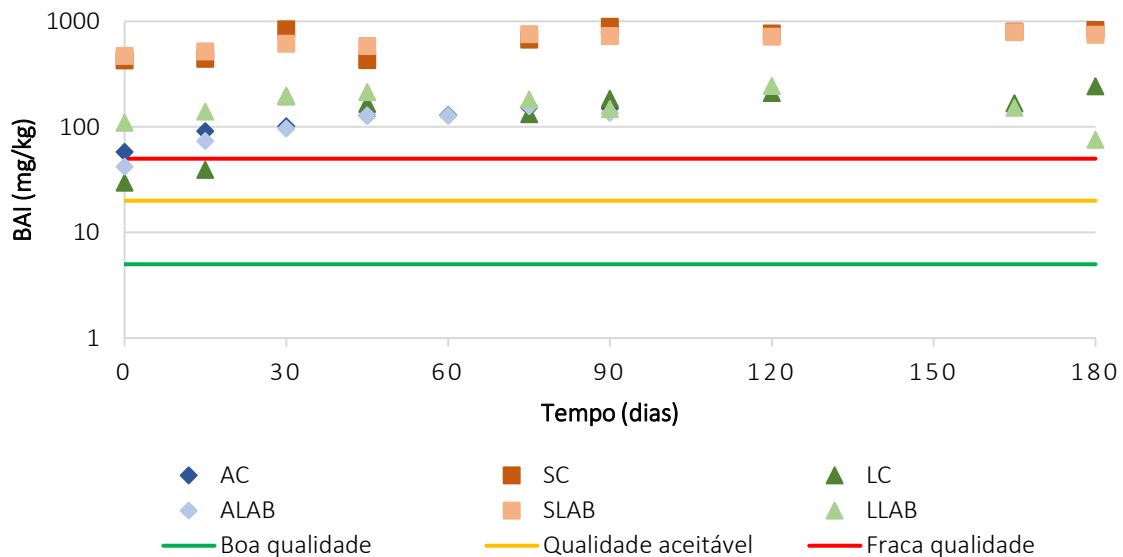


Figura 3.24: Índice de AB (BAI) ao longo do tempo para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batches, com os limites sugeridos por Hernández-Jover *et al.* (1996) e Özogul & Özogul (2020).

Como indicador da perda de qualidade, o estudo das ABs, individuais ou em combinação, é muito relevante visto que o aumento significativo de ABs ocorre antes do aparecimento dos sinais sensoriais de deterioração (Vidal-Carou *et al.*, 2009).

Na união Europeia apenas existe limites para a histamina em produtos de pescado, no entanto vários autores propõem limites para outras ABs em vários tipos de alimentos. Um exemplo, são os limites máximos tolerados em enchidos fermentados de 360 mg/kg para a putrescina e de 1080 mg/kg para a cadaverina propostos por Rauscher-Gabernig *et al.* (2012). Os níveis aceitáveis de tiramina num alimento são entre 100-800 mg/kg, mas segundo Shalaby (1996) e Özogul & Özogul (2020), concentrações de tiramina superiores a 1080 mg/kg podem apresentar um potencial risco de toxicidade para os humanos. Assim, segundo a opinião científica da EFSA (2011) no controlo do risco da formação de ABs em produtos fermentados, de todas as aminas, a tiramina e a histamina são as ABs que apresentam maior toxicidade.

Pelos resultados obtidos, apenas o salpicão apresenta níveis superiores a 360 mg/kg para a putrescina. Em relação aos limites propostos para a cadaverina e a tiramina, tanto a alheira como o salpicão e o lombo apresentam concentrações dessas aminas inferiores a estes limites.

Como anteriormente referido, as ABs podem ser potencialmente prejudiciais para a saúde humana. Isto acontece quando o total da concentração de todas as aminas presentes num alimento é superior a 1000 mg/kg (Santos, 1996). Relativamente, ao estudo efetuado, como se pode verificar pela análise da Figura 3.25 as amostras analisadas não apresentavam potencial risco para a saúde humana.

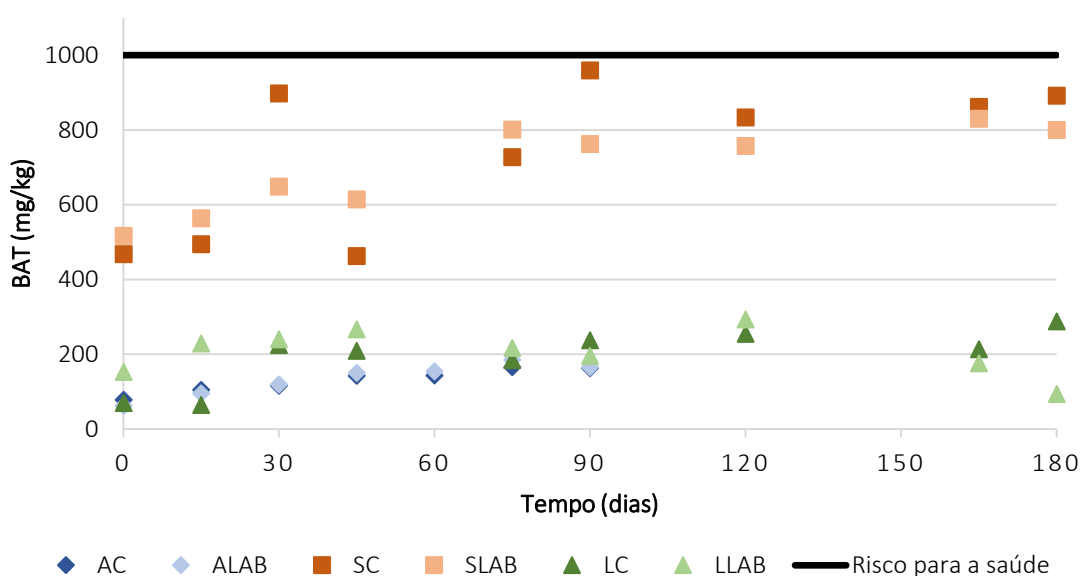


Figura 3.25: Total de AB (BAT) ao longo do tempo para as amostras de alheira, salpicão e lombo em ambos os batches, obtidos com o limite máximo quando estas, possivelmente, apresentam risco para a saúde humana.

Como o nível toxicológico das ABs é muito difícil de definir já que depende das características individuais assim como da presença de outras aminas, existem autores, como Özogul & Özogul (2020) que sugerem para conteúdo total de ABs num produto, valores máximos compreendidos entre 750 e 900 mg/kg.

As ABs quando presentes em concentrações elevadas podem ter efeitos toxicológicos causando problemas de saúde especialmente em indivíduos já com problemas associados. Assim um conhecimento mais efetivo das ABs é importante para se poder aumentar a qualidade e segurança dos produtos alimentares.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

O método inicialmente adotado neste estudo (método 1) deu resultados muito dispersos (CV próximos de 100 %) e com valores de concentração considerados à partida muito elevados, por exemplo 23487 mg/kg de histamina na amostra de LLAB (t=165 dias), sendo o valor de referência, segundo o regulamento da Comissão Europeia nº 2073/2005 de 15 de novembro para a histamina, de 200 mg/kg para peixe. Este método foi modificado e comparado com um método de quantificação de aminas (AOAC) e os resultados são, em geral, não significativamente diferentes: na análise de variâncias não há diferenças significativas e na análise de médias não há diferenças significativas na quantificação da putrescina e da histamina, mas há diferenças na quantificação da cadaverina. Apesar da proximidade de resultados entre o método 1 modificado e o método 2, passou-se a usar o método da AOAC (método 2) porque este é muito mais produtivo. Para o mesmo tempo de trabalho, com o método 2 faziam-se 18 análises e com o método 1 modificado faziam-se 4 análises.

A adição de culturas lácticas neste tipo de produtos prolonga o seu prazo de validade e garante a segurança alimentar dos consumidores. As amostras de alheira foram analisadas até aos 90 dias de armazenamento, sendo o tempo de vida útil normal dos produtos deste tipo de 60 dias. No caso do salpicão e do lombo fatiados as amostras foram analisadas até aos 180 dias, já que para este tipo de produtos o tempo de vida útil é normalmente de 120 dias. De um modo geral, as culturas LAB não influenciaram a formação das ABs nos produtos analisados. Contudo, as culturas LAB contribuíram para a diminuição do conteúdo de cadaverina e tiramina nas amostras de alheira e do conteúdo de triptamina e histamina nas de salpicão.

Os valores apresentados pelo método 2 para as ABs não apresentam potencial risco para a saúde pública. No entanto, o salpicão foi o produto que apresentou maior conteúdo total de ABs.

No método 2, apesar de apresentar repetibilidade nos resultados, é necessário fazer ajustes nomeadamente, nas condições do HPLC, de modo a obter-se tempos de retenção para as ABs mais distanciados entre si. Assim, os cromatogramas obtidos terão os picos referentes às aminas mais distanciados, resultando numa melhor integração dos mesmos, e consequentemente uma quantificação mais fiável das ABs. Para tal, será necessário verificar as condições do HPLC relacionando o tempo de duração da determinação, com a temperatura da coluna e o fluxo dos eluentes. Deveriam também serem efetuados mais testes de repetibilidade com padrões de diferentes ABs, amostras e com matrizes padronizadas de amostras de produtos cárneos. Deste modo, seria possível determinar o desvio-padrão, assim como o erro associado às determinações das diferentes aminas. O estudo das curvas de calibração para cada ABs também poderá ser efetuado

de modo a determinar a equação de reta para quantificar as amins, os limites de detecção e de quantificação (LOD e LOQ) assim como a gama de trabalho.

Para uma melhor compreensão dos valores obtidos para as ABs neste estudo, seria interessante determinar o conteúdo proteico dos produtos e avaliar o tipo de degradação proteica que estes produtos sofrem ao longo do tempo de armazenamento. Outro parâmetro a analisar seria o azoto básico volátil total (ABVT) para estudos comparativos com o BAI obtido.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, W., Mohammed, G. I., Al-Eryani, D. A., Saigl, Z. M., Alyoubi, A. O., Alwael, H., . . . El-Shahawi, M. S. (2019). Biogenic Amines Formation Mechanism and Determination Strategies: Future Challenges and Limitations. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1-16. doi:10.1080/10408347.2019.1657793
- Ancín-Azpilicueta, C., González-Marco, A., & Jiménez-Moreno, N. (2008). Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(3), 257-275. doi:10.1080/10408390701289441
- Ansorena, D., Montel, M. C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., . . . Demeyer, D. (2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61(2), 141-147. doi:https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00174-7
- AOAC International (1999), *Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products*, 82, 1097-1101.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista De Sousa, J. M., Villa, T. G., & Barros-Velazquez, J. (1998). Changes in Biogenic Amines and Microbiological Analysis in Albacore (*Thunnus alalunga*) Muscle during Frozen Storage. *Journal of Food Protection*, 61(5), 608-615. doi:10.4315/0362-028x-61.5.608
- Bozkurt, H., & Erkmen, O. (2004). Effects of Temperature, Humidity and Additives on the Formation of Biogenic Amines in Sucuk during Ripening and Storage Periods. *Food Science and Technology International*, 10(1), 21-28. doi:10.1177/1082013204041992
- Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis in 't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11(1), 73-84. doi:https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90040-C
- Cellini, B., Montioli, R., Oppici, E., Astegno, A., & Voltattorni, C. (2013). The chaperone role of the pyridoxal 5'-phosphate and its implications for rare diseases involving B6-dependent enzymes. *Clinical biochemistry*, 47. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.11.021
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., ten Brink, B., . . . Eerola, S. (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International*, 33(3), 171-180. doi:https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00031-4
- Doeun, D., Davaatseren, M., & Chung, M.-S. (2017). Biogenic amines in foods. *Food science and biotechnology*, 26(6), 1463-1474. doi:10.1007/s10068-017-0239-3

- Du, W. X., Lin, C. M., Phu, A. T., Cornell, J. A., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (2002). Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Journal of Food Science*, 67(1), 292-301. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb11400.x
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., & Bouquelet, S. (1999). Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*) (Vol. 82).
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., & Hirvi, T. (1993). Liquid-Chromatographic Determination of Biogenic-Amines in Dry Sausages. *Journal of AOAC International*, 76(3), 575-577. doi:10.1093/jaoac/76.3.575
- Eerola, S., Maijala, R., Sagués, A.-X. R., Salminen, M., & Hirvi, T. (1996). Biogenic Amines in Dry Sausages as Affected by Starter Culture and Contaminant Amine-Positive *Lactobacillus*. *Journal of Food Science*, 61(6), 1243-1246. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb10970.x
- Eerola, H. S., Sagués, A. X. R., & Hirvi, T. K. (1998). Biogenic Amines in Finnish Dry Sausages. *Journal of Food Safety*, 18(2), 127-138. doi:10.1111/j.1745-4565.1998.tb00208.x
- Erdag, D., Merhan, O., & Yildiz, B. (2018). Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. In C. Proestos (Ed.), *Biogenic Amines*. Turkey.
- Erim, F. B. (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52, 239-247. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.018
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA J.* 9, 2393 (2011)
- Feddern, V., Mazzuco, H., Fonseca, F. N., & de Lima, G. J. M. M. (2019). A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures. *Animal Production Science*, 59(4), 608-618. doi:10.1071/AN18076
- Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization. (2013). *Joint FAO/WHO expert meeting on the public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products: meeting report*. World Health Organization.
- Franson, M. A. H., Greenberg, A. E., Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Association, A. W. W., & Federation, W. E. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (A. E. G. Lenore S. Clesceri, Andrew D. Eaton Ed. 20th). Washington, DC: American Public Health Association.

- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., . . . Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1), 105-117. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00445-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00445-1)
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., & Özogul, F. (2016). Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1218-1218. doi:10.3389/fmicb.2016.01218
- Glória, M. B. A. (2003). AMINES. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition) (pp. 173-181). Oxford: Academic Press.
- Greif, G., Greifová, M., & Karovicova, J. (2006). Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter spp.* bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 21-29.
- Guerrini, S., Mangani, S., Franci, O., & Vincenzini, M. (2007). Biogenic amine producing capability of bacterial populations isolated during processing of different types of dry fermented sausages. *Italian Journal of Animal Science*, 6(sup1), 688-690. doi:10.4081/ijas.2007.1s.688
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Biogenic Amine Sources in Cooked Cured Shoulder Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3097-3101. doi:10.1021/jf960250s
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Chicago, USA: Blackwell Publishing
- Ionescu, A., Zara, M., Aprodu, I., Vasile, A., & Istrate, R. (2007). The Effect of Starter Cultures on The Physical and Biochemical Characteristics of Dried Sausages. *Scientific Study & Research*, VIII(3), 329-342.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. (2007). Histidine Decarboxylases and Their Role in Accumulation of Histamine in Tuna and Dried Saury. *Applied and environmental microbiology*, 73, 1467-1473. doi:10.1128/AEM.01907-06
- Karovicova, J., & Kohajdova, Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *ChemInform*, 36. doi:10.1002/chin.200534338
- Kim, J. H., Ahn, H. J., Lee, J. W., Park, H. J., Ryu, G. H., Kang, I. J., & Byun, M. W. (2005). Effects of gamma irradiation on the biogenic amines in pepperoni with different packaging conditions. *Food Chemistry*, 89(2), 199-205. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.026

- Komprda, T., Sládková, P., & Dohnal, V. (2009). Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat Science*, 83(3), 534-542. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.07.002>
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Aymerich, T., Marcos, B., Vidal-Carou, M. C., & Garriga, M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*, 75(3), 460-469. doi:10.1016/j.meatsci.2006.07.020
- Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., . . . Vidal-Carou, M. C. (2008). Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*, 107(2), 912-921. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.046>
- Lázaro, C., & Junior, C. C. (2014). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50, 430-446. doi:<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v50i6p430-446>
- Leuschner, R. G., Heidel, M., & Hammes, W. P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1), 1-10. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00109-8)
- Liu, S.-J., Xu, J.-J., Ma, C.-L., & Guo, C.-F. (2018). A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC. *Food Chemistry*, 266, 275-283. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.001>
- Mah, J. H., & Hwang, H. J. (2009a). Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). *Food Chemistry*, 114(1), 168-173. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.035
- Mah, J. H., & Hwang, H. J. (2009b). Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosum* as a protective culture. *Food Control*, 20(9), 796-801. doi:10.1016/j.foodcont.2008.10.005
- Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P., & Hirvi, T. (2006). Formation of Biogenic Amines during Ripening of Dry Sausages as Affected by Starter Culture and Thawing Time of Raw Materials. *Journal of Food Science*, 60, 1187-1190. doi:10.1111/j.1365-2621.1995.tb04552.x
- Mey, E. D., Drabik-Markiewicz, G., De Maere, H., Peeters, M. C., Derdelinckx, G., Paelinck, H., & Kowalska, T. (2012). Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 130(4), 1017-1023. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.124>

- Mohammed, G. I., Bashammakh, A. S., Alsibaai, A. A., Alwael, H., & El-Shahawi, M. S. (2016). A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 84-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.007>
- Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R. (1999). Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sciences des aliments*, 19(2), 247-254.
- Moret, S., & Conte, L. S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J Chromatogr A*, 729(1-2), 363-369. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00961-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00961-2)
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75(7), R139-R150. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x
- Neofotistos, A.-D., Tsagkaris, A., Danezis, G., & Proestos, C. (2019). *Emerging Trends in Biogenic Amines Analysis*.
- Ohtsubo, Y., Kurooka, H., Tada, H., & Manabe, N. (2014). Method for determination of histamine in food by LC-MS/MS. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 55(2), 103-109. doi:10.3358/shokueishi.55.103
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4), 1475-1486. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>
- Özogul, Y., & Özogul, F. (2020). Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food. In R. T. Bahrudin Saad (Ed.), *Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity* (pp. 1-17): The Royal Society of Chemistry.
- Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M. A., & Suzzi, G. (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6), 882-891. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01322.x
- Pedrol, N., & Tiburcio, A. F. (2001). Polyamines Determination by TLC and HPLC. In M. J. Reigosa Roger (Ed.), *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques* (pp. 335-363). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Rabie, M. A., Siliha, H., el-Saidy, S., el-Badawy, A. A., & Malcata, F. X. (2011). Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 129(4), 1778-1782. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.106>
- Rauscher-Gabernig, E., Gabernig, R., Brueller, W., Grossgut, R., Bauer, F., & Paulsen, P. (2012). Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria. *European Food Research and Technology*, 235(2), 209-220. doi:10.1007/s00217-012-1748-1
- Regulamento (CE) n. o 2073/2005 da Comissão Europeia de 15 de novembro de 2005. Jornal Oficial da União Europeia - L 338.
- Regulamento (UE) nº 1019/2013 da Comissão Europeia de 23 de outubro de 2013. Jornal Oficial da União Europeia – L 282.
- Ruiz-Capillas, C., & Colmenero, J. F. (2005). Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), 489-599. doi:10.1080/10408690490489341
- Santos, M. H. S. (1996). *Biogenic amines: their importance in foods*. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2), 213-231. doi:[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
- Shahid, M., Tripathi, T., Sobia, F., Moin, S., Siddiqui, M., & Khan, R. (2009). Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review. *The Open Immunology Journal*, 9-41. doi:10.2174/1874226200902010009
- Shalaby, A. R. (1993). Survey on biogenic amines in Egyptian foods: Sausage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(3), 291-293. doi:10.1002/jsfa.2740620313
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690. doi:[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., . . . Lolkema, J. S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S95. doi:10.1038/ejcn.2010.218
- Stadnik, J., & Zbigniew, J. D. (2010). *Biogenic amines in meat and fermented meat products* (Vol. 9).
- Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41-54. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00080-1)
- Tateno, T., Okada, Y., Tsuchidate, T., Tanaka, T., Fukuda, H., & Kondo, A. (2008). Direct production of cadaverine from soluble starch using *Corynebacterium glutamicum* coexpressing α -amylase

- and lysine decarboxylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 115. doi:10.1007/s00253-008-1751-4
- Taylor, S. (1986). Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. *Critical reviews in toxicology*, 17, 91-128. doi:10.3109/10408448609023767
- Toldrá, F. (2008a). Principles of Dry-Fermented Sausage-Making. *Dry-Cured Meat Products*, (pp. 63-88). Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc.
- Toldrá, F. (2008b). Fermentation and Starter Cultures. *Dry-Cured Meat Products*. Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc.
- Torrens-Spence, M. P., Liu, P., Ding, H., Harich, K., Gillaspay, G., & Li, J. (2013). Biochemical evaluation of the decarboxylation and decarboxylation-deamination activities of plant aromatic amino acid decarboxylases. *The Journal of biological chemistry*, 288(4), 2376-2387. doi:10.1074/jbc.M112.401752
- Vandekerckhove, P. (1977). Amines in Dry Fermented Sausage. *Journal of Food Science*, 42(1), 283-285. doi:10.1111/j.1365-2621.1977.tb01275.x
- Verma, A. K., Singh, V. P., & Vikas, P. (2012). Application of Nanotechnology as a Tool in Animal Products Processing and Marketing: An Overview. *American Journal of Food Technology*, 7(8), 445-451. doi:10.3923/ajft.2012.445.451
- Vidal-Carou, M. C., Latorre-Moratalla, M. L., & Bover-Cid, S. (2009). Biogenic Amines. In L. M. L. Nollet & F. Toldra, *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis* (pp. 22). Florida, USA: CRC Press.
- Vinci, G., & Antonelli, M. L. (2002). Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control*, 13(8), 519-524. doi:https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00031-2
- Sun, X., Zhou, K., Gong, Y., Zhang, N., Yang, M., Qing, D., . . . Yang, Y. (2016). Determination of Biogenic Amines in Sichuan-Style Spontaneously Fermented Sausages. *Food Analytical Methods*, 9(8), 2299-2307. doi:10.1007/s12161-016-0417-6
- Yoon, H., Park, J. H., Choi, A., Hwang, H.-J., & Mah, J.-H. (2015). Validation of an HPLC Analytical Method for Determination of Biogenic Amines in Agricultural Products and Monitoring of Biogenic Amines in Korean Fermented Agricultural Products. *Toxicological research*, 31(3), 299-305. doi:10.5487/tr.2015.31.3.299

APÊNDICES

Apêndice A

Poster apresentado na vigésima conferência EuroFoodChem nos dias 17-19 de junho de 2019.



EFFECT OF STARTER CULTURES IN SIX BIOGENIC AMINE CONTENT OF TRADITIONAL PORTUGUESE SAUSAGES



PRECIOSA PIRES^{1,2}, RAFAELA DIAS¹, MÁRIO BARROS^{1,2}, ÉLIA FERNANDES¹, MANUELA VAZ-VELHO^{1,2}

¹Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, Portugal
² Centro de Investigação e Desenvolvimento em Sistemas Agroalimentares e Sustentabilidade - CISAS, Viana do Castelo, Portugal
 *pires@estg.ipv.pt



INTRODUCTION

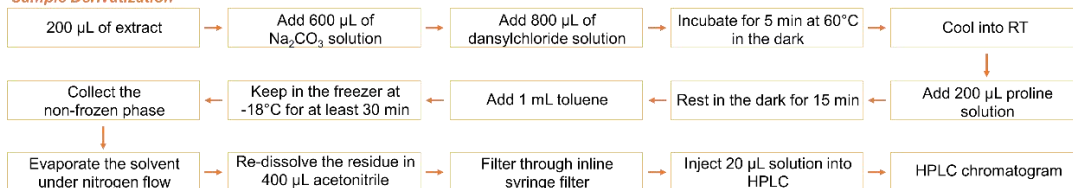
This work aims to study the effect of the addition of a LAB strain, known to be active against some pathogens that can be found in cured meat products, on the levels of six biogenic amines in traditional Portuguese sausages during storage. The biogenic amines were determined during storage time of 90 days for "Alheira" and 180 days for "Salpicão" at intervals of 15 days. Similar products were produced with the addition of starter culture (LAB samples) and without, here called control samples. All samples were vacuum packed and stored at 4 °C. Amines were extracted and derivatized according to J. AOAC International method (AOAC, 1999). Quantification was obtained by HPLC.

METHODS

Sample Extraction



Sample Derivatization



RESULTS AND DISCUSSION

The study of "Alheira" product showed significant differences in 2-phenylethylamine concentration ($p < 0.001$) with lower value in control samples, and in cadaverine ($p = 0.021$) and tyramine ($p = 0.008$) with lower values in LAB samples.

The study of "Salpicão" product showed significant differences in tryptamine concentration ($p < 0.001$) and histamine ($p = 0.031$) with lower values in LAB samples; 2-phenylethylamine ($p = 0.012$) and cadaverine ($p = 0.046$) with lower values in control samples.

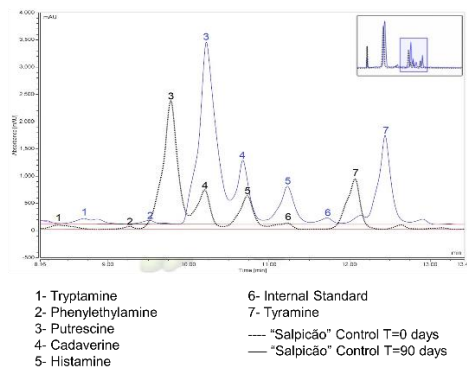


Fig.1. Two chromatograms of six amines in "Salpicão" control samples in zero and 90 days storage.

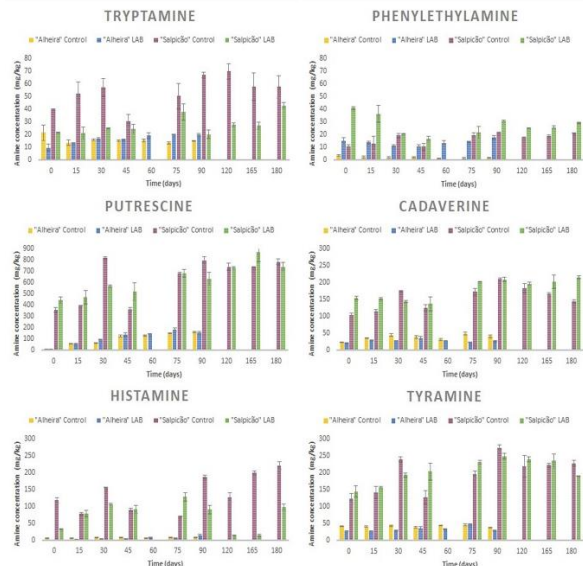


Fig.2. Tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine and tyramine concentrations during storage time for "Alheira" and "Salpicão" for the LAB and control samples.

CONCLUSION

It can be concluded that the inclusion of the LAB starter does not affect the intrinsic quality features of the studied samples, the determined biogenic amine values in all samples being according to literature values found in this type of products.

References

[1] AOAC International, Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products, 82 (1999) 1097-1101.

Acknowledgement

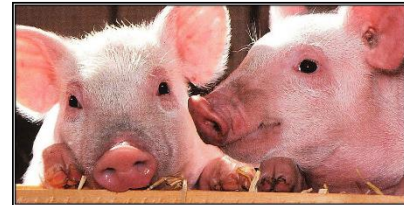
The project DEM@BIOFUMADO (Norte-01-0247-FEDER-017634) is funded by Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER),



Under Programa Operacional Regional do Norte (PO Norte).



Cadaverine and putrescine contents in traditional Portuguese pork sausages linked to the addition of starter cultures



Dias R.¹, Barros, M.^{1,2}, Vaz Velho M.^{1,2}, Pinto R.^{1*}, Barros D.¹, Pires P.^{1,2}
¹Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, Portugal;
²CISAS - IPVC, Centro de Investigação e Desenvolvimento em Sistemas Agroalimentares e Sustentabilidade
 *corresponding author: rpinto@ipvc.pt

Introduction

Starter cultures are used in meat sausages production mainly for technological reasons but, depending on the species, an added effect against other bacteria, including pathogens, can occur. Lactic acid bacteria (LAB), usually considered non-pathogenic and non-toxic are the main fermenting microorganisms in starter cultures, but some LAB species can produce biogenic amines (BAs). The formation and increase of the content of BAs is related to food degradation processes, reason why it is important to control the contents of these amines over product lifetime. This study aims to ascertain the effect of the addition of a LAB strain, known to be active against some pathogens that can be found in cured meat products, on cadaverine and putrescine production in cured-smoked sausage-like pork products during storage.

Material and Methods

The LAB strain *Lactobacillus plantarum* ST153ch was applied to three cured-smoked products. In "Alheira" it was added together with meat and other ingredients before the curing process and in "Salpicão" and "Lombo" it was included in finished products after slicing. Similar products were produced without the addition of starter culture, here called control samples. BAs levels were determined by HPLC with an analytical Thermo Ultimate 3000 system. Amines were extracted with perchloric acid solution and derivatized with dansyl chloride following J. AOAC International method (AOAC, 1999) with some modifications.

Results

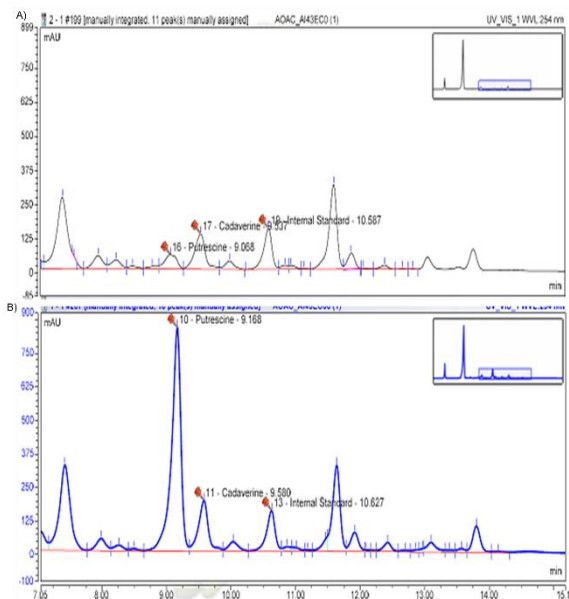


Figure 1. HPLC chromatograms of biogenic amines in "Alheira" control sample (A: 0 days, B: 60 days).

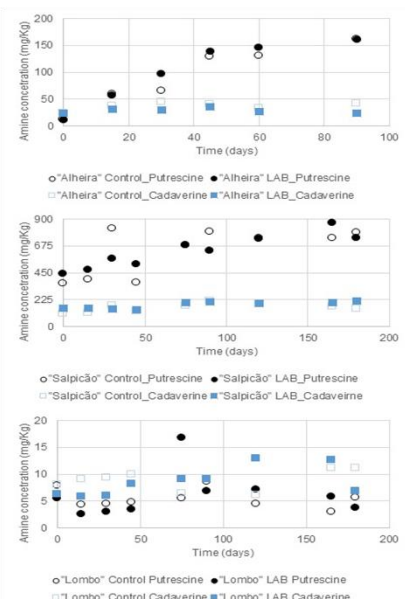


Figure 2. Biogenic amines content for "Alheira", "Salpicão" and "Lombo" in LAB and Control groups.

Discussion & Conclusion

The tendency observed is that the starter culture addition did not influence the putrescine contents in "Alheira", "Salpicão" and "Lombo" cured products; it did not influence the level of cadaverine in "Lombo"; In "Salpicão", the effect of starter culture is in the limit with $p=0.057$. However in "Alheira" product the starter culture addition influences the concentration of cadaverine, with a lower concentration in the LAB group.

In this study it can be concluded that the inclusion of LAB starter cultures did not influence the putrescine and cadaverine contents along the storage of all the tested products, except for "Alheira" with a positive effect in cadaverine.

References

AOAC Int. (1999): Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products, 82, 1097-1101.

Acknowledgement

The project DEM@BIOFUMADOS-Demonstrador do Biofumados Tradição vs Qualidade-Produção de Enchidos e Fumados Tradicionais Portugueses (NORTE-01-0247-FEDER-017634), co-funded by Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), under Programa Operacional Regional do Norte (PO Norte).



Apêndice B

A curva de calibração efetuada para a amina biogénica histamina pelo método 1 está apresentada na Figura B1.

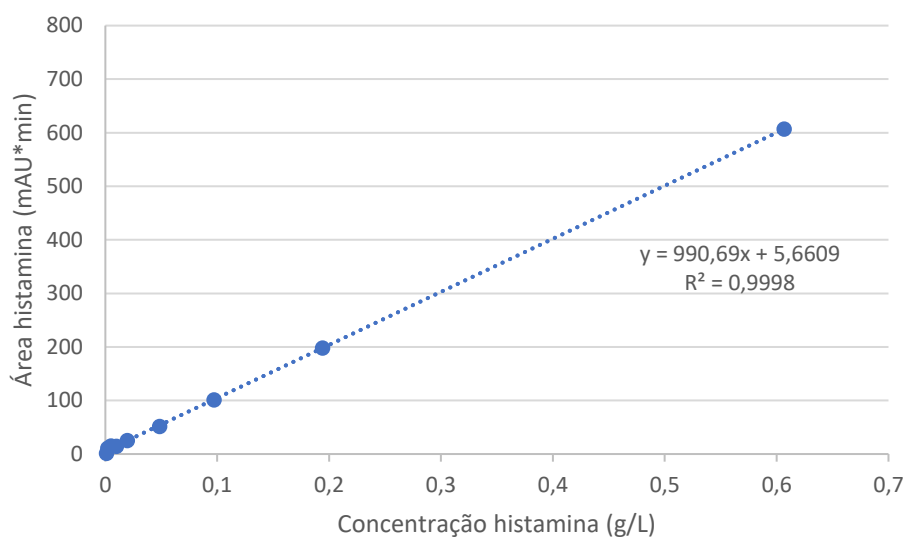


Figura B1: Retas de calibração para a amina biogénica histamina realizada no método 1.

Apêndice C

Nas Figuras C1, C2 e C3 estão apresentados exemplos de cromatogramas obtidos, no método 1, nas várias injeções no HPLC das análises aos três produtos nos dois batches para o t=0. Os cromatogramas apresentados em cima e em baixo de cada figura representam as amostras controlo e amostras LAB, respetivamente.

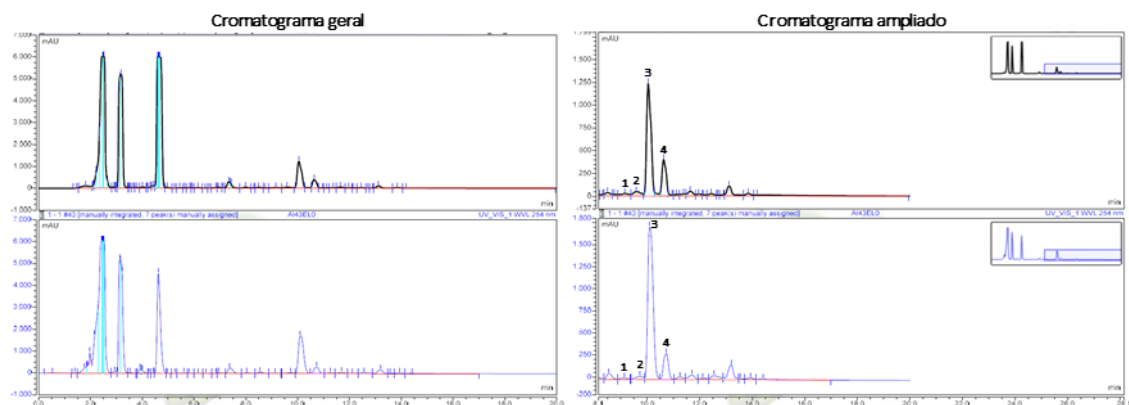


Figura C1: Cromatograma exemplo das amostras de alheira controlo e LAB no t=0 dias. Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Histamina; 4- Padrão interno.

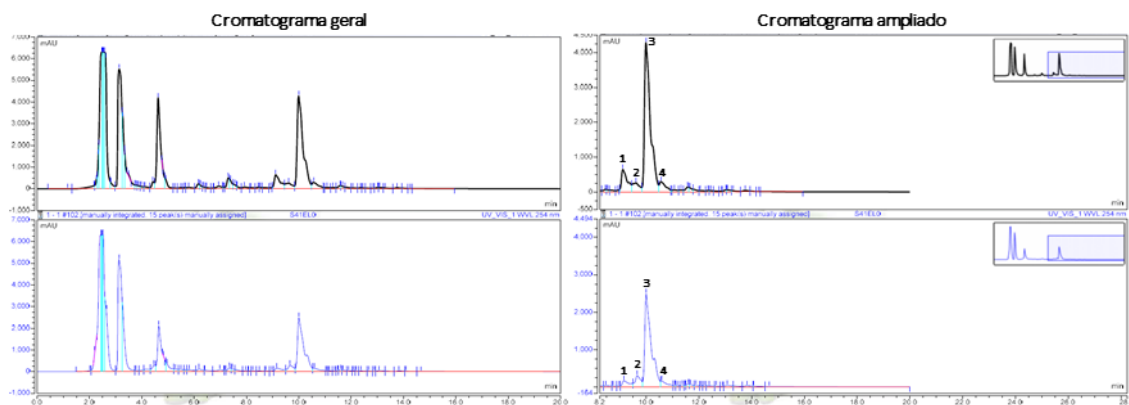


Figura C2: Cromatograma exemplo das amostras de salpicão fatiado controlo e LAB no t=0 dias. Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Histamina; 4- Padrão interno.

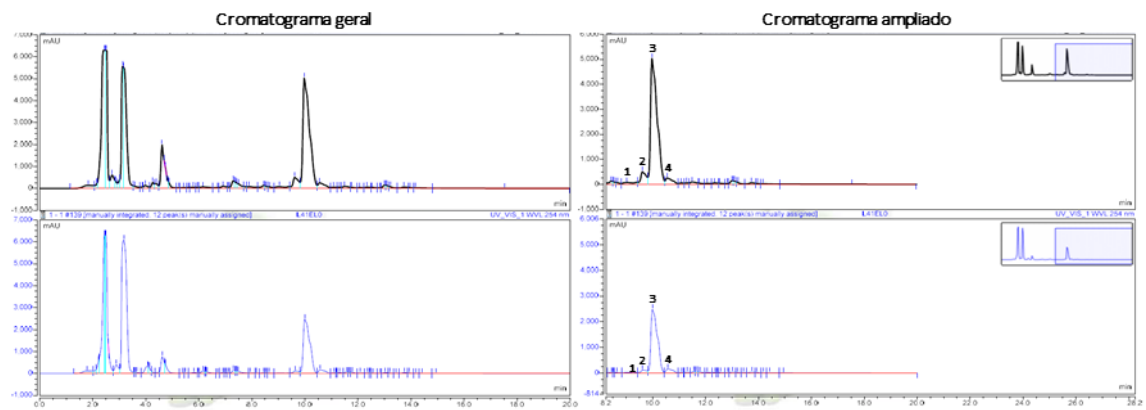


Figura C3: Cromatograma exemplo das amostras de lombo fatiado controlo e LAB no t=0 dias. Identificação dos picos: 1- Putrescina; 2- Cadaverina; 3- Histamina; 4- Padrão interno.

Apêndice D

Na Tabela D1 são apresentados os valores das áreas obtidas nos cromatogramas para cada amina em cada amostra estudada. Nas Tabelas D2, D3 e D4 estão apresentados os resultados obtidos da determinação do conteúdo de ABs na alheira, salpicão e lombo fatiado pelo método 1. Nas tabelas apresentadas neste apêndice os valores são apresentados com 4 algarismos significativos com exceção de números inteiros com maior número de algarismos.

Tabela D1: Áreas obtidas nos cromatogramas para cada amina em cada amostra estudada pelo método 1 (mAU*min).

Dia	Amina	Alheira		Salpicão		Lombo	
		LAB	Controlo	LAB	Controlo	LAB	Controlo
0	Putrescina	5,542	7,883	108,7	163,5	11,58	38,33
	Cadaverina	11,91	16,85	166,3	79,69	29,22	121,1
	Histamina	400,7	236,3	1656	1109	705,0	1452
	PI	65,38	72,24	68,20	80,83	47,59	77,38
15	Putrescina	23,04	21,98	88,29	179,3	8,830	37,53
	Cadaverina	16,09	19,71	135,9	86,92	17,53	38,06
	Histamina	179,0	11,04	200,4	444,7	403,8	1269
	PI	68,75	98,24	55,96	106,2	32,63	65,63
30	Putrescina	3,589	24,21	128,9	221,2	15,18	8,848
	Cadaverina	5,569	22,09	163,4	67,21	57,45	26,43
	Histamina	1149	2,686	1589	430,3	886,9	748,8
	PI	21,05	87,54	68,82	97,74	50,56	56,15
45	Putrescina	29,23	37,13	113,5	52,76	6,943	28,44
	Cadaverina	8,238	19,26	212,9	58,74	17,36	33,41
	Histamina	81,82	1141	1874	1824	387,1	1155
	PI	45,48	76,74	56,58	35,69	32,64	81,10
60	Putrescina	n.d. ^a	40,84	92,58	69,38	10,15	66,48
	Cadaverina	3,168	16,02	69,06	41,56	29,57	15,37
	Histamina	306,5	4,200	1318	1254	467,1	305,9
	PI	20,06	88,53	58,02	31,83	42,97	50,49
75	Putrescina	13,06	49,45	105,2	62,46	11,73	9,839
	Cadaverina	6,291	19,15	80,22	26,30	64,78	8,796
	Histamina	216,4	5,912	1167	408,3	1176	240,8
	PI	18,82	94,51	55,32	29,90	28,76	67,10

Continua

Tabela D1: Áreas obtidas nos cromatogramas para cada amina em cada amostra estudada pelo método 1 (mAU*min) (continuação).

Dia	Amina	Alheira		Salpicão		Lombo	
		LAB	Controlo	LAB	Controlo	LAB	Controlo
90	Putrescina	18,88	31,94	126,4	54,56	15,95	9,923
	Cadaverina	6,420	8,489	88,25	19,88	73,42	10,21
	Histamina	356,4	18,05	1037	101,2	1719	188,7
	PI	27,45	61,68	74,87	22,63	58,25	74,59
105	Putrescina			101,8	70,76	17,67	97,28
	Cadaverina			63,89	24,54	74,08	5,220
	Histamina			207,0	248,7	740,3	189,7
	PI			46,93	27,65	28,70	55,48
120	Putrescina			11,63	113,3	6,103	4,639
	Cadaverina			27,28	52,18	36,05	14,16
	Histamina			811,1	633,6	595,3	513,9
	PI			17,67	47,08	20,97	10,12
135	Putrescina			117,8	118,6	17,90	3,096
	Cadaverina			64,62	88,65	1124,7	2,777
	Histamina			475,7	1688	1787	61,77
	PI			43,70	20,47	24,90	39,30
150	Putrescina			178,0	157,7	21,32	9,540
	Cadaverina			118,3	77,48	141,4	34,83
	Histamina			807,7	1428	1929	823,4
	PI			77,83	64,28	28,14	45,95
165	Putrescina			110,2	88,20	15,43	13,94
	Cadaverina			129,3	36,05	89,96	42,05
	Histamina			1653	395,2	1700	719,0
	PI			59,70	43,62	16,16	47,91
180	Putrescina			76,38	104,5	32,02	12,13
	Cadaverina			87,28	36,32	167,1	61,37
	Histamina			1326	407,8	1690	902,6
	PI			39,25	36,65	29,96	37,67

^a n.d. – não detetado

Tabela D2: Conteúdo de ABs obtidas pelo método 1 na alheira durante o armazenamento (mg/kg).

Dias	Batch	Putrescina	Cadaverina	Histamina
0	Controlo	26,31	50,52	867,8
	LAB	17,03	32,88	1354
15	Controlo	53,95	43,46	29,80
	LAB	67,33	42,25	575,6
30	Controlo	66,67	54,65	8,138
	LAB	34,43	47,98	12128
45	Controlo	116,7	54,37	3946
	LAB	129,1	32,70	397,7
60	Controlo	111,3	39,19	12,59
	LAB	n.d. ^a	28,64	3394
75	Controlo	126,2	43,89	16,60
	LAB	139,4	60,33	2541
90	Controlo	124,9	29,81	77,64
	LAB	138,2	42,21	2870

^a n.d. – não detetado

Tabela D3: Conteúdo de ABs obtidas pelo método 1 no salpicão fatiado durante o armazenamento (mg/kg).

Dias	Batch	Putrescina	Cadaverina	Histamina
0	Controlo	406,5	177,9	3033
	LAB	320,2	440,3	5367
15	Controlo	339,2	147,7	925,6
	LAB	317,0	438,4	791,6
30	Controlo	454,7	124,1	973,0
	LAB	376,3	428,6	5104
45	Controlo	297,0	297,0	11297
	LAB	402,9	679,3	7322
60	Controlo	437,9	235,6	8707
	LAB	320,6	214,8	5023
75	Controlo	419,8	158,6	3019
	LAB	382,0	261,8	4665
90	Controlo	484,5	158,6	989,2
	LAB	339,2	212,8	3061
105	Controlo	514,2	160,2	1988
	LAB	435,7	245,7	974,8
120	Controlo	483,5	200,0	2975
	LAB	133,0	280,1	10200
135	Controlo	1164	781,7	18226
	LAB	541,6	266,9	2407
150	Controlo	492,9	217,5	4909
	LAB	459,5	274,3	2294
165	Controlo	406,3	149,2	2003
	LAB	371,0	390,8	6121
180	Controlo	572,8	178,8	2459
	LAB	390,9	401,3	7469

Tabela D4: Conteúdo de ABs obtidas pelo método 1 no lombo fatiado durante o armazenamento (mg/kg).

Dias	Batch	Putrescina	Cadaverina	Histamina
0	Controlo	99,51	282,5	4148
	LAB	49,40	111,9	3307
15	Controlo	114,9	104,7	4275
	LAB	54,92	97,98	2763
30	Controlo	31,97	85,81	2977
	LAB	60,93	207,1	3917
45	Controlo	71,17	75,10	3181
	LAB	43,17	96,97	2648
60	Controlo	264,5	54,93	1339
	LAB	47,95	125,4	2427
75	Controlo	29,76	23,90	801,2
	LAB	82,75	410,6	9131
90	Controlo	27,00	24,96	564,8
	LAB	55,57	229,8	6589
105	Controlo	355,8	17,115	763,4
	LAB	125,0	470,5	5760
120	Controlo	92,58	253,9	11285
	LAB	58,75	311,8	6305
135	Controlo	15,98	12,88	350,9
	LAB	145,7	912,7	16028
150	Controlo	42,13	138,2	4001
	LAB	153,7	916,3	15302
165	Controlo	59,04	160,0	3351
	LAB	193,8	1015	23487
180	Controlo	65,33	297,0	5349
	LAB	216,9	1017	12593

Apêndice E

Na Tabela E1 estão apresentados os valores de pH medidos durante a derivatização dos extratos das amostras, nomeadamente na etapa da incubação, e os valores de pH medidos no final da derivatização pelo método 2 antes de se proceder à sua quantificação das aminas em HPLC.

Tabela E1: Medição do pH durante a derivatização e o pH final no método 2.

Dia	pH	Alheira		Salpicão		Lombo	
		LAB	Controlo	LAB	Controlo	LAB	Controlo
0	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
15	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
30	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
45	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
60	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
75	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
90	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
105	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
120	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
135	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
150	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
165	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5
180	Derivatização	9	9	9	9	9	9
	Final	5	5	5	5	5	5

Apêndice F

Nas Figuras F1, F2 e F3, tal como no método 1, estão apresentados exemplos de cromatogramas obtidos em HPLC pelo método 2 das análises aos três produtos em ambos os batches para o t=0. Os cromatogramas apresentados em cima e em baixo de cada figura representam as amostras controlo e amostras LAB, respetivamente.

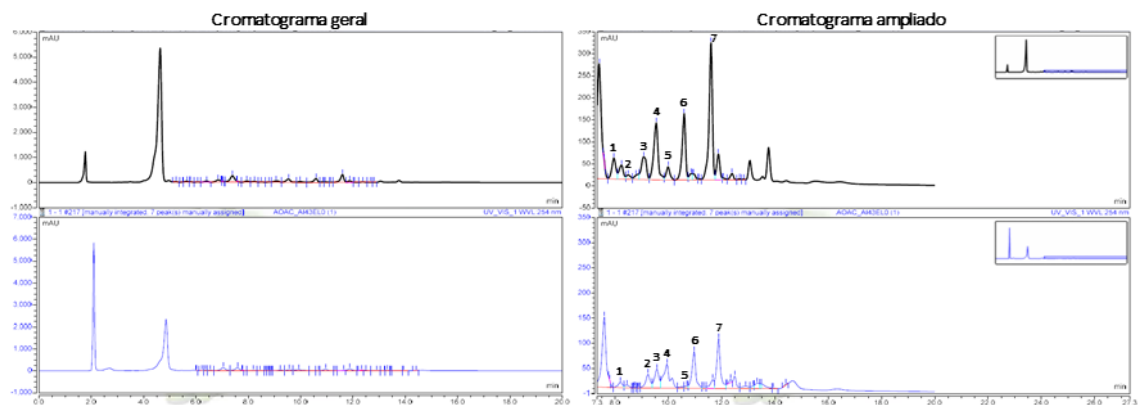


Figura F1: Cromatograma exemplo das amostras de alheira controlo e LAB no t=0 dias. Identificação dos picos: 1- Triptamina; 2- Feniletilamina; 3- Putrescina; 4- Cadaverina; 5- Histamina; 6- Padrão interno; 7- Tiramina.

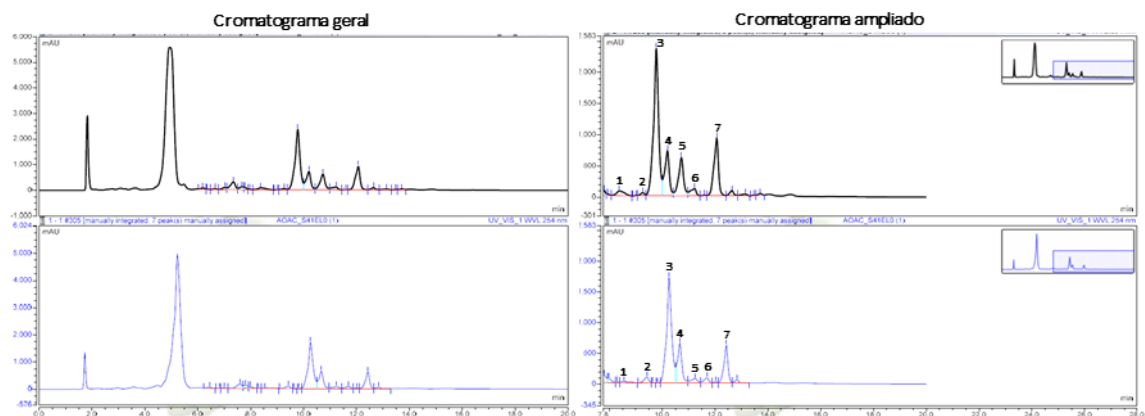


Figura F2: Cromatograma exemplo das amostras de salpicão fatiado controlo e LAB no t=0 dias. Identificação dos picos: 1- Triptamina; 2- Feniletilamina; 3- Putrescina; 4- Cadaverina; 5- Histamina; 6- Padrão interno; 7- Tiramina.

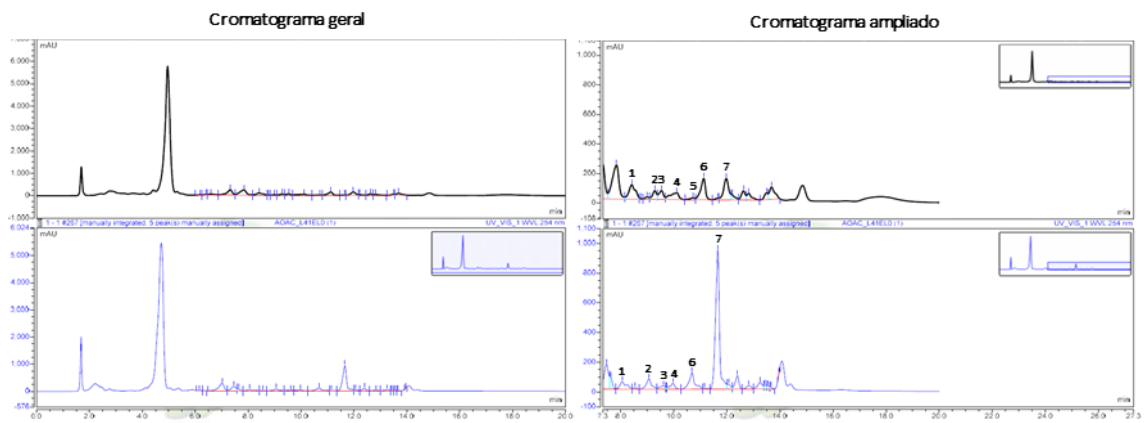


Figura F3: Cromatograma exemplo das amostras de lombo fatiado controlo e LAB no t=0 dias. Identificação dos picos: 1- Triptamina; 2- Feniletilamina; 3- Putrescina; 4- Cadaverina; 5- Histamina; 6- Padrão interno; 7- Tiramina.

Apêndice G

Na Tabela G1 são apresentados os valores médios das áreas obtidas nos cromatogramas. As Tabelas G2, G3 e G4 apresentam os resultados obtidos na determinação do conteúdo de ABs na alheira, salpicão fatiado e lombo fatiado, pelo método 2, sendo as determinações efetuadas em duplicado. Os resultados são apresentados em média \pm desvio-padrão. Nas tabelas apresentadas neste apêndice os resultados são apresentados com 3 algarismos significativos.

Tabela G1: Áreas obtidas nos cromatogramas para cada amina em cada amostra estudada pelo método 2 (mAU*min; n=2).

Dia	Amina	Alheira		Salpicão		Lombo	
		LAB	Controlo	LAB	Controlo	LAB	Controlo
0	Triptamina	3,91	10,7	9,12	27,2	19,7	22,4
	Feniletilamina	6,75	2,14	20,6	8,59	16,0	10,2
	Putrescina	9,17	12,1	394	516	6,14	10,3
	Cadaverina	18,3	24,7	136	150	9,28	16,4
	Histamina	0,575	5,39	23,1	133	n.d. ^a	2,63
	PI	17,4	22,6	19,3	31,2	27,5	28,5
	Tiramina	22,1	45,2	128	178	163	27,4
15	Triptamina	5,22	7,01	10,2	32,2	17,6	6,07
	Feniletilamina	6,54	1,41	21,2	9,17	51,8	8,03
	Putrescina	47,6	64,7	489	509	2,65	3,67
	Cadaverina	25,3	40,4	159	147	8,29	7,60
	Histamina	1,59	6,29	64,0	79,6	0,108	2,56
	PI	17,7	23,2	22,7	28,0	24,7	18,3
	Tiramina	23,1	44,1	163	183	191	30,7
30	Triptamina	8,04	8,30	14,6	28,0	25,1	11,1
	Feniletilamina	6,63	1,16	14,4	11,3	15,6	10,6
	Putrescina	100	74,1	706	849	3,55	5,06
	Cadaverina	29,6	49,0	178	180	8,95	10,4
	Histamina	3,04	6,90	104	128	0,111	3,67
	PI	21,9	23,9	27,0	22,4	31,2	24,4
	Tiramina	30,3	48,9	238	246	343	261
45	Triptamina	8,34	8,22	18,4	23,4	25,3	20,1
	Feniletilamina	6,69	1,37	15,3	9,54	15,8	11,4
	Putrescina	152	144	835	589	4,28	5,38
	Cadaverina	38,5	44,6	218	199	11,1	11,3
	Histamina	4,17	7,87	116	113	3,55	3,78
	PI	21,2	24,3	35,0	34,7	26,7	24,7
	Tiramina	38,5	43,9	325	205	316	220
60	Triptamina	10,8	7,68				
	Feniletilamina	8,96	1,01				
	Putrescina	172	138				
	Cadaverina	31,6	33,7				
	Histamina	8,05	6,24				
	PI	25,1	22,7				
	Tiramina	38,7	46,8				

^a n.d. – não detetado

Continua

Tabela G1: Áreas obtidas nos cromatogramas para cada amina em cada amostra estudada pelo método 2 (mAU*min; n=2) (continuação).

Dia	Amina	Alheira		Salpicão		Lombo	
		LAB	Controlo	LAB	Controlo	LAB	Controlo
75	Triptamina	9,29	6,87	21,0	27,1	15,7	33,0
	Feniletilamina	7,85	0,838	14,4	12,3	13,1	11,7
	Putrescina	177	164	818	769	21,4	4,55
	Cadaverina	22,6	53,4	242	193	11,5	14,4
	Histamina	5,37	7,58	119	62,3	3,60	3,22
	PI	20,7	23,3	26,1	24,4	27,7	30,1
	Tiramina	46,3	50,5	276	218	265	214
90	Triptamina	8,80	6,50	13,3	32,9	23,3	31,8
	Feniletilamina	9,32	0,946	24,4	12,6	13,4	12,2
	Putrescina	146	148	885	821	5,14	11,8
	Cadaverina	24,1	37,7	289	217	10,8	13,9
	Histamina	10,5	7,11	99,0	152	3,86	3,65
	PI	19,6	19,5	30,3	22,4	26,0	29,6
	Tiramina	27,2	35,1	344	281	206	294
120	Triptamina			13,2	37,7	19,1	12,5
	Feniletilamina			14,4	11,4	18,4	28,6
	Putrescina			746	848	8,06	5,58
	Cadaverina			197	209	21,0	7,49
	Histamina			11,4	113	3,88	0,646
	PI			21,9	24,7	25,0	28,4
	Tiramina			241	247	327	331
165	Triptamina			12,1	34,1	14,5	10,8
	Feniletilamina			13,8	13,6	13,3	10,7
	Putrescina			821	933	8,13	1,71
	Cadaverina			189	209	18,3	6,38
	Histamina			10,4	197	7,26	0,154
	PI			20,6	27,3	42,0	15,3
	Tiramina			220	278	313	141
180	Triptamina			20,7	33,0	24,5	15,0
	Feniletilamina			16,9	14,5	12,3	23,4
	Putrescina			757	953	6,19	11,9
	Cadaverina			218	174	11,4	6,17
	Histamina			78,3	209	n.d. ^a	0,214
	PI			22,1	26,2	69,9	26,7
	Tiramina			193	274	292	360

^a n.d. – não detetado

Tabela G2: Conteúdo de ABs determinado pelo método 2 na alheira durante o armazenamento (mg/kg, média \pm desvio padrão da média; n=2).

Dias	Batch	TRIP	FENI	PUT	CAD	HIS	TIRA
0	Controlo	17,4 \pm 5,1	2,75 \pm 0,52	6,23 \pm 0,36	13,743 \pm 0,048	3,91 \pm 0,32	34,03 \pm 0,19
		29 ^a	19	5,7	0,35	8,1	0,56
	LAB	7,8 \pm 2,3	11,6 \pm 1,8	6,30 \pm 0,76	13,31 \pm 0,25	0,59 \pm 0,24	21,65 \pm 0,28
		30	16	12	1,9	40	1,3
15	Controlo	11,1 \pm 1,7	1,77 \pm 0,60	32,5 \pm 1,4	21,90 \pm 0,19	4,44 \pm 0,35	32,3 \pm 1,7
		15	34	4,3	0,86	7,8	5,1
	LAB	10,91 \pm 0,35	10,66 \pm 0,65	31,60 \pm 0,99	18,038 \pm 0,036	1,40 \pm 0,43	22,17 \pm 0,62
		3,2	6,1	3,1	0,20	30	2,8
30	Controlo	12,78 \pm 0,44	1,43 \pm 0,43	36,2 \pm 1,6	25,9 \pm 2,5	4,71 \pm 0,39	34,21 \pm 0,96
		3,5	30	4,5	9,5	8,3	2,8
	LAB	13,51 \pm 0,60	8,81 \pm 0,56	53,58 \pm 0,20	17,017 \pm 0,069	2,278 \pm 0,059	23,54 \pm 0,25
		4,4	6,3	0,38	0,41	2,6	1,1
45	Controlo	12,41 \pm 0,59	1,64 \pm 0,42	69,0 \pm 6,7	23,1 \pm 2,6	5,30 \pm 0,77	30,7 \pm 1,8
		4,8	26	9,7	11	14	5,9
	LAB	13,10 \pm 0,32	8,4 \pm 1,0	76,3 \pm 8,2	20,9 \pm 2,6	2,94 \pm 0,28	28,2 \pm 3,9
		2,5	12	11	13	9,4	14
60	Controlo	12,47 \pm 0,79	1,301 \pm 0,047	71,1 \pm 2,9	18,7 \pm 1,5	4,445 \pm 0,097	35,07 \pm 0,78
		6,3	3,6	4,1	7,8	2,2	2,2
	LAB	15,8 \pm 1,8	10,4 \pm 1,4	80,1 \pm 1,2	15,85 \pm 0,47	5,27 \pm 0,18	26,22 \pm 0,50
		11	13	1,5	3,0	3,5	1,9
75	Controlo	10,83 \pm 0,59	1,04 \pm 0,38	81,9 \pm 1,8	28,8 \pm 2,1	5,333 \pm 0,053	36,8 \pm 2,1
		5,4	37	2,2	7,2	1,0	5,7
	LAB	16,549 \pm 0,050	11,07 \pm 0,17	100,9 \pm 8,2	13,83 \pm 0,81	4,29 \pm 0,22	38,16 \pm 0,10
		0,30	1,5	8,1	5,8	5,0	0,25
90	Controlo	12,225 \pm 0,088	1,41 \pm 0,19	88,3 \pm 2,6	24,2 \pm 2,3	5,970 \pm 0,042	30,56 \pm 0,28
		0,72	13	2,9	9,4	0,70	0,92
	LAB	16,52 \pm 0,28	13,8 \pm 1,0	87,0 \pm 2,9	15,52 \pm 0,77	8,8 \pm 1,2	23,61 \pm 0,49
		1,7	7,5	3,4	5,0	14	2,1

^a Coeficiente de variação (%)

Tabela G3: Conteúdo de ABs determinado pelo método 2 no salpicão fatiado durante o armazenamento (mg/kg, média \pm desvio padrão da média; n=2).

Dias	Batch	TRIP	FENI	PUT	CAD	HIS	TIRA
0	Controlo	32,42 \pm 0,27	8,1 \pm 1,2	196 \pm 11	61,3 \pm 2,4	71,2 \pm 5,1	98 \pm 11
		0,83 ^a	14	5,4	4,0	7,1	11
	LAB	17,65 \pm 0,14	31,50 \pm 0,70	243 \pm 16	90,3 \pm 3,0	19,92 \pm 0,43	114 \pm 13
		0,81	2,2	6,4	3,4	2,1	11
15	Controlo	42,7 \pm 7,4	9,8 \pm 4,5	215,0 \pm 1,8	67,0 \pm 3,0	47,2 \pm 2,7	113 \pm 14
		17	46	0,85	4,5	5,7	13
	LAB	17,1 \pm 4,0	28,1 \pm 5,2	258 \pm 33	89,2 \pm 1,7	47,4 \pm 5,9	124,0 \pm 1,7
		23	18	13	1,9	12	1,3
30	Controlo	46,8 \pm 5,7	15,0 \pm 1,2	448,6 \pm 5,3	102,54 \pm 0,20	94,71 \pm 0,49	189,7 \pm 6,0
		12	8,1	1,2	0,19	0,52	3,2
	LAB	20,19 \pm 0,22	15,76 \pm 0,20	310,5 \pm 6,2	84,5 \pm 1,7	64,3 \pm 1,3	152,7 \pm 5,6
		1,1	1,3	2,0	2,0	2,0	3,7
45	Controlo	24,9 \pm 4,4	8,0 \pm 2,1	200,7 \pm 6,6	73,1 \pm 5,3	54,1 \pm 2,3	101 \pm 15
		18	26	3,3	7,3	4,2	15
	LAB	19,8 \pm 2,9	13,0 \pm 1,6	285 \pm 44	80 \pm 12	55,4 \pm 6,8	161 \pm 20
		15	12	15	15	12	12
75	Controlo	41,0 \pm 8,0	14,9 \pm 1,6	373,0 \pm 6,8	101,0 \pm 6,1	42,44 \pm 0,17	154,5 \pm 8,3
		19	11	1,8	6,0	0,39	5,4
	LAB	30,9 \pm 5,3	16,9 \pm 3,6	374 \pm 19	118,20 \pm 0,57	77,3 \pm 7,6	183,1 \pm 4,2
		17	21	4,9	0,48	9,9	2,3
90	Controlo	54,6 \pm 1,9	16,62 \pm 0,21	435 \pm 20	123,6 \pm 1,7	113,3 \pm 3,3	216,2 \pm 7,5
		3,4	1,3	4,6	1,3	2,9	3,5
	LAB	16,5 \pm 2,5	23,75 \pm 0,52	348 \pm 31	122,0 \pm 3,7	54,8 \pm 7,5	196,8 \pm 6,6
		15	2,2	8,9	3,0	14	3,4
120	Controlo	56,9 \pm 5,0	13,57 \pm 0,28	405 \pm 18	107,7 \pm 7,8	76,3 \pm 7,9	173 \pm 26
		8,8	2,1	4,4	7,2	10,3	14,9
	LAB	22,5 \pm 1,1	19,350 \pm 0,055	402,5 \pm 4,2	114,7 \pm 2,5	8,67 \pm 0,32	189,5 \pm 6,3
		4,8	0,28	1,0	2,2	3,7	3,3
165	Controlo	47,3 \pm 8,8	14,76 \pm 0,52	405,2 \pm 1,2	97,6 \pm 2,1	120,4 \pm 3,2	175,8 \pm 5,5
		19	3,5	0,29	2,1	2,7	3,1
	LAB	22,1 \pm 2,3	19,89 \pm 0,80	476 \pm 45	118 \pm 12	8,4 \pm 1,8	186 \pm 16
		10	4,0	9,5	9,9	22	8,8
180	Controlo	47,0 \pm 7,2	16,314 \pm 0,032	430 \pm 14	84,7 \pm 2,8	132,8 \pm 7,0	180,3 \pm 6,8
		15	0,20	3,2	3,3	5,3	3,7
	LAB	35,0 \pm 1,9	22,64 \pm 0,41	406 \pm 20	125,9 \pm 2,6	59,0 \pm 5,7	151,14 \pm 0,66
		5,5	1,8	4,8	2,1	9,7	0,4

^a Coeficiente de variação (%)

Tabela G4: Conteúdo de ABs determinado pelo método 2 no lombo fatiado durante o armazenamento (mg/kg, média \pm desvio padrão da média; n=2).

Dias	Batch	TRIP	FENI	PUT	CAD	HIS	TIRA
0	Controlo	29,0 \pm 8,5	10,59 \pm 0,14	4,27 \pm 0,48	7,34 \pm 0,39	1,54 \pm 0,13	16,5 \pm 2,3
		29 ^a	1,3	11	5,4	8,3	18
	LAB	27 \pm 10	17,14 \pm 0,60	2,64 \pm 0,19	4,30 \pm 0,24	n.d. ^b	101,8 \pm 2,8
15	Controlo	38	3,5	7,2	5,6		2,7
		12,5 \pm 3,3	12,91 \pm 0,59	2,35 \pm 0,49	5,31 \pm 0,28	2,3281 \pm 0,0070	29,0 \pm 1,3
	LAB	26	4,6	21	5,2	0,30	4,3
30	Controlo	26,55 \pm 0,81	62,1 \pm 3,9	1,29 \pm 0,26	4,31 \pm 0,38	0,133 \pm 0,094	133,76 \pm 0,78
		3,1	6,3	20	8,7	0	0,6
	LAB	16,8 \pm 1,5	12,82 \pm 0,15	2,43 \pm 0,31	5,439 \pm 0,069	2,500 \pm 0,088	184,7 \pm 3,3
45	Controlo	9,1	1,2	13	1,3	3,5	1,8
		30,02 \pm 0,59	14,712 \pm 0,046	1,34 \pm 0,19	3,654 \pm 0,038	0,060 \pm 0,019	189,6 \pm 5,2
	LAB	2,0	0,31	14	1,0	31	2,7
75	Controlo	30,4 \pm 9,3	13,7 \pm 2,1	2,58 \pm 0,41	5,83 \pm 0,40	2,55 \pm 0,43	154,0 \pm 8,8
		31	15	16	6,9	17	5,7
	LAB	35,1 \pm 8,9	17,38 \pm 0,80	1,89 \pm 0,10	5,30 \pm 0,75	2,21 \pm 0,34	204,3 \pm 8,8
90	Controlo	25	4,6	5,3	14	15	4,3
		40,83 \pm 0,59	11,4 \pm 1,3	1,78 \pm 0,19	6,11 \pm 0,78	1,76 \pm 0,84	122,2 \pm 8,9
	LAB	1,4	11	11	12,8	48	7,3
120	Controlo	21,05 \pm 0,84	13,92 \pm 0,20	9,14 \pm 0,42	5,280 \pm 0,020	2,16 \pm 0,17	165,1 \pm 1,7
		4,0	1,4	4,6	0,38	8,0	1,0
	LAB	40,2 \pm 5,7	12,18 \pm 0,58	4,71 \pm 0,13	6,01 \pm 0,50	2,04 \pm 0,23	171,512 \pm 0,085
165	Controlo	14	4,8	2,8	8,3	11	0,050
		33,36 \pm 0,82	15,19 \pm 0,59	2,3396 \pm 0,0076	5,28 \pm 0,32	2,47 \pm 0,16	136,9 \pm 2,5
	LAB	2,4	3,9	0,33	6,1	6,4	1,8
180	Controlo	16,4 \pm 1,6	29,7 \pm 1,7	2,34 \pm 0,16	3,38 \pm 0,25	0,381 \pm 0,031	201,9 \pm 7,9
		9,9	5,8	6,7	7,4	8,1	3,9
	LAB	28,2 \pm 8,1	21,6 \pm 3,0	3,9 \pm 1,5	10,9 \pm 4,6	2,57 \pm 0,12	225 \pm 12
180	Controlo	29	14	37	43	4,7	5,2
		26,1 \pm 5,3	20,64 \pm 0,79	1,324 \pm 0,080	5,329 \pm 0,054	0,18 \pm 0,25	159,8 \pm 2,8
	LAB	20	3,8	6,0	1,0	0	1,8
180	Controlo	13,4 \pm 3,4	10,1 \pm 4,3	2,5 \pm 1,2	6,2 \pm 4,0	7,5 \pm 5,3	135 \pm 41
		25	43	47	65	71	31
	LAB	20,8 \pm 3,4	25,8 \pm 1,3	5,286 \pm 0,058	2,947 \pm 0,076	0,14 \pm 0,10	232,9 \pm 3,7
180	Controlo	16	5,1	1,1	2,6	0	1,6
		13,1 \pm 1,3	5,172 \pm 0,085	1,047 \pm 0,032	2,09 \pm 0,28	n.d.	72 \pm 11
	LAB	10	1,6	3,1	14		15

^a Coeficiente de variação (%)

^b n.d. – não detetado

Apêndice H

Na Tabela H1 são apresentados os resultados do teste *t-student* realizado às aminas em estudo, comparando os resultados obtidos no método 2 para cada batch nos três produtos analisados.

Tabela H1: Resultados do *t-student* realizados às aminas em estudo no método 2 nos produtos analisados.

	Trip	Feni	Put	Cad	His	Tira
Alheira	$p=0,723$	$p=0,000$	$p=0,066$	$p=0,021$	$p=0,205$	$p=0,008$
Salpicão	$p=0,000$	$p=0,012$	$p=0,976$	$p=0,046$	$p=0,031$	$p=0,547$
Lombo	$p=0,881$	$p=0,649$	$p=0,918$	$p=0,968$	$p=0,983$	$p=0,708$