

VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO (CLAE-UV) PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

Lana Flávia Baron¹, Francisco Noé da Fonseca², Gizelle Cristina Bedendo² e Everton Luís Krabbe³

¹Graduanda em Farmácia pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Estagiária da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC, lanaflaviabaron@hotmail.com.

²Analistas da Embrapa Suínos e Aves.

³Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves.

Palavras-chave: aminas biogênicas, cromatografia, derivatização.

INTRODUÇÃO

As aminas biogênicas são substâncias de baixo peso molecular que possuem importância biológica em animais, vegetais e células microbianas com funções fisiológicas variadas. São geradas a partir da descarboxilação enzimática ou microbiana de aminoácidos e da transaminação de aldeídos e cetonas (1, 2). A avaliação desses compostos é de extrema importância, pois em concentrações elevadas nos alimentos possuem efeitos tóxicos. Segundo a forma de ação, as aminas são divididas em psicoativas (histamina, putrescina, cadaverina) que tem ação nos neurotransmissores, e quando ocorre intoxicação, causam vômito, diarreia, hipotensão e cefaleia. Outra divisão, são as aminas vasoativas (tiramina, triptamina, feniletilamina) que atuam no sistema vascular, causando crises hipertensivas, enxaquecas, dificuldade de respirar e palpitações (2). Em animais, dietas com altas concentrações de aminas acarretam queda no desempenho (3). Diversas metodologias estão descritas na literatura para a determinação de aminas biogênicas em produtos alimentícios, tais como embutidos, laticínios, peixes, etc, (2,4); dentre elas, merece destaque a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV). Neste contexto, o presente trabalho objetivou validar um método por CLAE-UV para quantificação de aminas biogênicas em alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

O método de quantificação das aminas biogênicas foi validado em termos de seletividade, linearidade e precisão. Foram utilizadas como marcadores as seguintes aminas biogênicas: histamina, tiramina, 2-feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina. Foram preparados estoque individuais com concentração de 1 mg/mL em HCl 0,1M em balão volumétrico, as quais foram diluídas em mesmo balão (mix de padrões) na faixa de concentração de 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20, 25 µg/mL. Estas soluções foram derivatizadas utilizando cloreto de dansila como agente derivatizante e 1,7-diaminoheptano como padrão interno conforme descrito previamente por Smela et al. (4) com modificações. Em um tubo, foram adicionados 1 mL do mix, 0,5 mL de tampão NaOH:NaHCO₃ (2:3, pH 14) e 2 mL de cloreto de dansila na concentração de 5 mg/mL solubilizado em acetonitrila. O sistema foi agitado em vórtex por 1 min e deixado em repouso protegido da claridade por 1 h. Após este período, foram adicionados 0,1 mL de NH₄OH e o sistema foi agitado (vórtex, 30 s) e deixado em repouso (30 min) para finalizar a reação. Aos tubos, foi adicionado 1 mL de NaCl saturado e em seguida foi realizado a extração das aminas biogênicas derivatizadas com éter etílico (3x0,5 mL). As fases orgânicas foram unidas em um tubo e o solvente foi evaporado com aquecimento (50 °C) e N₂. O resíduo, por fim, foi ressuscitado em 1 mL de acetonitrila, seguido de filtração (0,22 µm) e análise cromatográfica. Para tal, foi utilizado um cromatógrafo líquido (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fischer) composto por detector de arranjo de diodos (UV-Vis), bomba multicanal e injetor automático. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5µm) acoplada a pré-coluna C18 (10 x 4,6 mm, 5µm), gradiente eluição utilizando água e acetonitrila e λ= 254 nm. A partir dos resultados das áreas, foi calculado o fator de relação (FR) das aminas biogênicas em relação ao padrão interno e os dados foram plotados em software adequado (Excel 2007, Microsoft) para obtenção das curvas de calibração (n=5). A precisão foi determinada a partir do coeficiente de variação das injeções (em triplicata) na concentração mais baixa, média e mais alta da curva. A seletividade foi obtida com a análise do perfil cromatográfico de eluição da mistura de padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método cromatográfico para quantificação de aminas biogênicas mostrou-se seletivo para os compostos de interesse (Figura 1), sendo possível a identificação de todos os compostos. A concentração de 0,2 não gerou sinal satisfatório para a maioria das aminas, o que dificultava a integração dos picos, sendo, então, excluída da análise da linearidade. Após a regressão linear dos FR (razão entre área do pico do padrão e do padrão interno) dos diferentes padrões, foram obtidos coeficientes de correlação (r) de 0,998 para a espermidina e espermina e 0,999 para as demais aminas biogênicas (Tabela 1), indicando que a resposta dos analitos variou linearmente na faixa estudada (0,5 – 25 µg/mL). Por fim, determinou-se o coeficiente de variação (CV) (tabela 2) da concentração baixa, média e alta da curva de calibração e os valores foram abaixo de 5%, com exceção da tiramina no menor nível (6%), porém considerando que o método envolve diferentes etapas de reação seguida de extração orgânica, os valores de CV obtidos podem ser considerados satisfatórios.

CONCLUSÕES

O método proposto mostrou-se seletivo, linear e preciso nas faixas de concentração de 0,5 – 25 µg/mL. Ainda, estudos adicionais são necessários para verificar a adequabilidade do método estabelecido na análise das aminas biogênicas em produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

- CARDOZO, M. et al. Biogenic Amines: A Public Health Problem. *Revista Virtual de Química*, [s.l.], v. 5, n. 2, p.149-168, mar. 2013. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- CUNHA, F. L. et al. Determinação de aminas biogênicas em diferentes tipos de queijos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Instituto Adolf Lutz*, São Paulo, v. 71, n. 1, p.69-75, 2012.
- REGINA, R. et al. **Nutrição animal, principais ingredientes e manejo de aves e suínos**. São Paulo: Fundação Cargill, 2010.
- SMELA, D. et al. Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in a Meat Product during Fermentation and Long-term Storage. *Czech J. Food Sci.*, Brno, República Tcheca, v. 21, n. 5, p.167-175, 2003.



Figura 1. Perfil cromatográfico das aminas biogênicas derivatizadas com cloreto de dansila. Padrão interno: 1,7-diaminoheptano.

Tabela 1. Coeficiente de correlação das curvas de calibração das aminas biogênicas.

Amina Biogênica	Coeficiente de correlação (r)
Triptamina	0,999
2-feniletilamina	0,999
Putrescina	0,999
Cadaverina	0,999
Histamina	0,999
Tiramina	0,999
Espermidina	0,998
Espermina	0,998

Tabela 2. Coeficiente de variação do baixo, médio e alto nível da curva calibração das aminas biogênicas.

Amina Biogênica	Coeficiente de Variação (%)		
	0,5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL
Triptamina	2,19	2,55	1,38
2-feniletilamina	3,29	1,87	1,34
Putrescina	2,80	2,66	1,54
Cadaverina	3,29	2,45	0,87
Histamina	5,16	2,51	0,88
Tiramina	6,09	2,57	0,78
Espermidina	2,37	4,04	3,20
Espermina	1,66	4,87	5,30