



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

ADEQUAÇÃO DA FASE MÓVEL PARA SEPARAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR UPLC-MS/MS

Patrícia Erika **Jojima**¹; Amanda Maria Silva **Reis**²; Mary Ângela Fávaro **Perez**³; Marcia Regina Cucatti **Alves**⁴; Regina Prado Zanes **Furlani**⁵

Nº 16217

RESUMO – *A presença de aminas biogênicas em alimentos tem sido um assunto preocupante devido ao seu efeito fisiológico indesejável em humanos. Adicionalmente, esses compostos podem ser usados como indicadores químicos das condições de higiene de carnes e peixes in natura bem como das práticas de processamento. Métodos de análise eficientes e validados para monitorar contaminantes em alimentos, com o propósito de garantir a qualidade e segurança alimentar, é de suma importância. Diferentes condições cromatográficas para separação e detecção de 5 aminas biogênicas (histamina, espermina, espermidina, putrescina e cadaverina) foram testadas. Também avaliou se a necessidade de derivatização das aminas. Aminas biogênicas derivatizadas apresentaram melhores resultados na separação cromatográfica e a fase móvel composta por acetronitrila e acetato de amônio 20mM contendo 0,1% de ácido fórmico foi a mais adequada para a separação.*

Palavras-chaves: UPLC, aminas biogênicas, espectrometria de massas.

1 Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FZEA-USP, Pirassununga-SP; patriciajojima.usp@gmail.com
2 Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP;
3 Colaborador, Assistente, ITAL, Campinas-SP
4 Colaborador, Mestranda, ITAL, Campinas-SP
5 Orientador: Pesquisador ITAL, Campinas-SP



ABSTRACT - *The presence of biogenic amines in foods has been a matter of concern since these substances provide undesirable physiological effect in humans. Additionally these compounds can be used as chemical indicators of the hygienic condition of fresh meat and fish as well as of the processing practices. Efficient and validated methods of analysis to monitor contaminants in food are very important to guarantee food quality and safety. Different chromatographic conditions for separation and detection of 5 biogenic amines (histamine, spermine, spermidine, putrescine and cadaverine) were tested. The need for derivatization of amines was also evaluated. Derivatized biogenic amines showed better results in chromatographic separation and the mobile phase composed of acetonitrile and ammonium acetate 20 mM containing 0.1 % formic acid was the most suitable for separation.*

Keywords: *UPLC, biogenic amines, mass spectrometry.*

1 INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas são consideradas como potencialmente perigosas, pois possuem propriedades vasoativas, psicoativas e toxicológicas. São bases de baixo peso molecular, comumente oriundas da descarboxilação bacteriana de aminoácidos livres que compõem os alimentos (GIROTO e MASSON, 2010). Dessa forma, alimentos que possuem em sua microbiota microrganismos com atividade descarboxilante sobre aminoácidos e com alto teor de proteínas são os mais susceptíveis à produção desses compostos (CUNHA *et al.*, 2013). As aminas podem estar presentes naturalmente em alimentos ou após processos fermentativos, desde que haja precursores para sua formação (Önal, 2007). Quando ingeridas em elevadas concentrações, podem causar efeitos toxicológicos e carcinogênicos àquele que consome o alimento (LADERO *et al.*, 2010).

A análise das aminas biogênicas é pautada de um alto grau de dificuldade devido a fatores como, por exemplo, a grande polaridade dos compostos e à falta de propriedades que permitam a sua detecção diretamente por técnicas comuns, além da extrema complexidade das matrizes onde elas possam estar presentes e em baixas concentrações (CUNHA *et al.*, 2013).

Cromatografia líquida com derivatização e detecção por ultravioleta e fluorescência é a técnica mais utilizada para análises de aminas biogênicas em alimentos (ÖNAL; TEKKELI; ÖNAL,



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

2013). Recentemente a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tem sido utilizada. Essa técnica é capaz de detectar as aminas biogênicas não derivatizadas, mas muitas vezes esse processo é utilizado com o intuito de melhorar a resolução nas colunas de fase reversa (ERIM, 2013). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer condições cromatográficas para separação simultânea de 5 aminas biogênicas e detecção por espectrometria de massas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo de ultraeficiência, modelo Acquity TM acoplado a um espectrômetro de massas tipo triploquadropolo e interface por eletrospray (UPLC-ESI-MS/MS) modelo Xevo TQD, Waters. Foi utilizada uma coluna Acquity UPLC® BEH C-18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura de 40 °C. A vazão da fase móvel foi 0,2 mL min⁻¹.

2.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e os solventes orgânicos foram de grau cromatográfico.

Foram utilizados padrões analíticos de cadaverina, espermina, espermidina, histamina e putrescina da empresa Sigma-Aldrich, todos com pureza superior a 98%. As soluções padrões foram preparadas individualmente na concentração 1mg L⁻¹ em HCl 0,1N. Os padrões foram derivatizados com cloreto de dansila segundo a IN 25 (Brasil, 2011). A partir das soluções de cada amina já derivatizada foi preparado um mix contendo os 5 compostos na concentração 0,2 mg L⁻¹.

2.3 Otimização das condições do espectrofotômetro de massas

A fim de otimizar os parâmetros de ionização de cada composto foram realizadas infusões individuais dos padrões (com e sem derivatização) no espectrômetro de massas. Foi utilizado monitoramento de reação selecionada (*SRM – Select Reaction Monitoring*) para se obter as massas dos íons precursores e dos produtos, bem como as melhores energias de colisão.

A voltagem do capilar foi otimizada a 3,5 kV. Foi utilizado nitrogênio como gás de dessolvatação à 600 °C, fluxo de 695 L h⁻¹, e argônio como gás de colisão com pressão de 3,13. 10⁻³ mbar.



2.4 Fases móveis testadas

Foram testadas fases móveis compostas por metanol + água (50:50) e acetonitrila + água (50:50) em condições isocráticas. Também foram testados gradientes contendo acetonitrila + acetato de amônio 20 mM acidificado com 0,1 % de ácido fórmico com pH 3,5 ajustado com ácido acético.

3 RESULTADO E DISCUSSÕES

3.1 Otimização das condições do espectrofotômetro de massas

Os dados obtidos durante a otimização no espectrômetro de massas foram satisfatórios apenas para histamina e espermidina sem derivatizar e esses resultados não condizem com os obtidos por SIROCCHI et al. (2014), que obtiveram íons precursores e produtos para todas as aminas.

Os dados de aquisição obtidos para as aminas derivatizadas, apresentados na Tabela 1, se mostraram adequados, pois apresentam critérios suficientes para a confirmação de uma possível contaminação: um íon precursor, dois íons produtos e o tempo de retenção.

Os cromatogramas das aminas derivatizadas e os espectros de massas estão apresentados na Figura 1.

Tabela 1. Condições selecionadas para os compostos em SRM

Amina Biogênica	t_R (min)	Íon precursor m/z	Energia Capilar kV	Íon produto 1 m/z	Energia cone V	Energia Colisão V	Íon produto 2 m/z	Energia Cone V	Energia Colisão V
Putrescina	3,49	555,50	3,50	170,10	50,00	40	234,10	50,00	30,00
Cadaverina	3,50	569,50	3,50	170,20	50,00	37	234,20	50,00	31,00
Histamina	3,56	578,50	3,50	170,10	50,00	30	234,10	50,00	30,00
Espermidina	4,09	845,70	3,50	170,10	50,00	50	360,30	55,00	45,00
Espermina	4,54	1135,90	3,50	170,10	80,00	100	360,40	80,00	90,00

t_R : tempo de retenção; m/z: massa/carga; V: volt

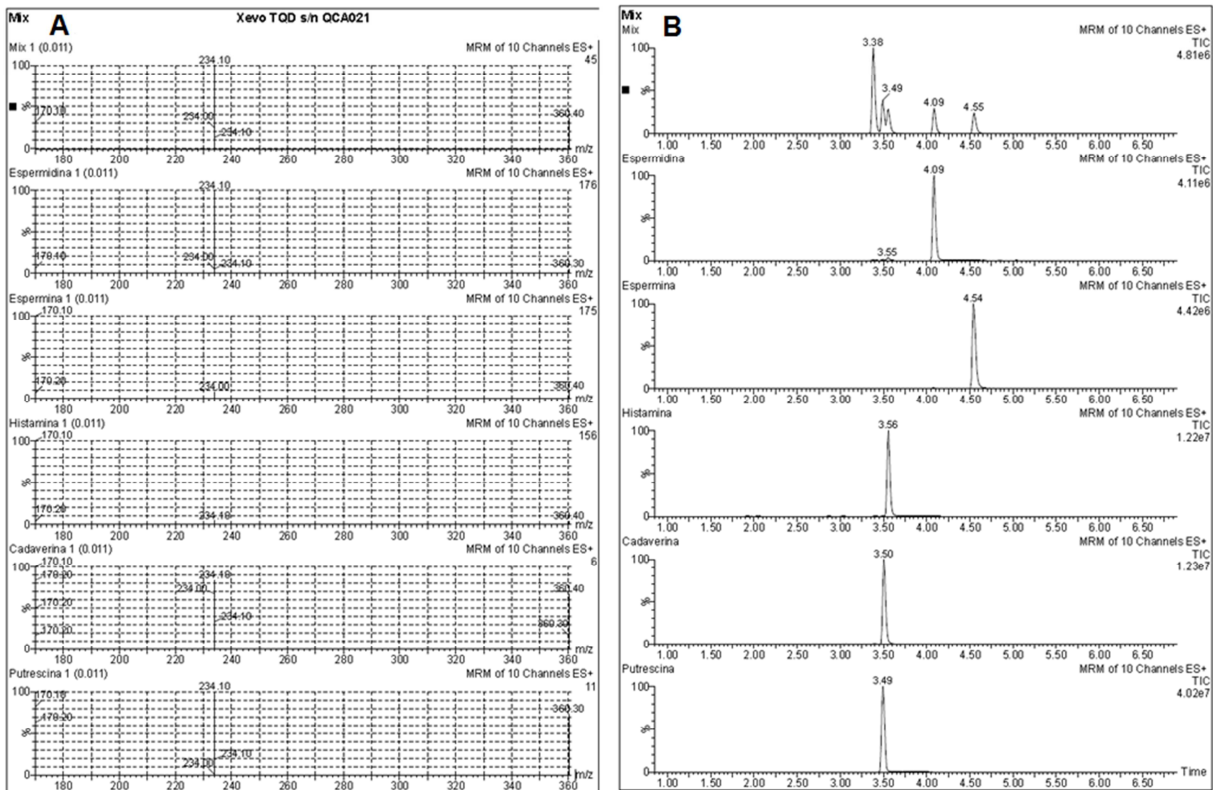


Figura 1. - A) Espectro de massas dos padrões das aminas biogênicas estudadas, B) Cromatogramas dos padrões de aminas biogênicas.

3.2 Fases móveis testadas

As fases móveis contendo acetonitrila + água (50:50) e metanol + água (50:50) em sistema isocrático não foram adequadas para a separação, havendo sobreposições de picos e não sendo apropriadas para uma possível identificação.

Gradientes de fase móvel compostos por acetonitrila e acetato de amônio 20 mM baseados na literatura (LEE et. al, 2011) foram testados. O melhor resultado obtido para a separação das aminas, com tempos de retenção distintos, está apresentado na Tabela 2 e essa separação possibilita uma identificação apropriada como pode ser observado na Figura 1.

Tabela 2. Gradiente da fase móvel para a separação das aminas biogênicas.

Tempo (minuto)	Acetato de amônio 20mM	Acetonitrila
0	70	30
3,5	0	100
5,0	0	100
5,5	70	30



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

4 CONCLUSÃO

Embora a separação das aminas sem derivatização não tenha sido adequada, os resultados obtidos com derivatização indicam uma boa separação e identificação para se detectar as aminas biogênicas estudadas. A metodologia proposta poderá ser utilizada como base para futuros estudos da presença desses compostos em alimentos.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/PIBIC pela bolsa concedida, aos colaboradores Fernanda Moralez Lemes Gomes e Dra. Silvia Amélia Verdiani Tfouni, ao quadro de funcionários do CCQA/ITAL bem como ao ITAL pelo estágio oferecido e à orientadora Dra Regina Prado Zanes Furlani pelo apoio, compreensão e confiança.

6 REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Pescado e seus Derivados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 de junho de 2011.

CALBIANI, F. et al. Rapid assay for analyzing biogenic amines in cheese: Matrix solid-phase dispersion followed by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3779-3783, 2005.

CUNHA, Fernanda Lima et al. Determinação e monitoramento de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) resfriados embalados em atmosfera modificada e irradiados. **Rev. Bras. de Med. Vet.**, v. 35, p. 275-282, 2013.

ERIM, F. Bedia. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 239-247, 2013.

GIROTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, SMC. Aminas biogênicas em embutidos cárneos e outros alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 1-10, 2010.

LADERO, Victor et al. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 2, p. 145-156, 2010.

LATORRE-MORATALLA, M. L. et al. Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. **Journal of chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7715-7720, 2009.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

LEE, Sanghee et al. Determination of biogenic amines in Cheonggukjang using ultra high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 123-129, 2011.

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

ÖNAL, Armağan; TEKKELI, Serife Evrim Kepekci; ÖNAL, Cem. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food chemistry**, v. 138, n. 1, p. 509-515, 2013.

RIBEIRO, Inês Mafalda Oliveira Castro. Desenvolvimento de um Método Multi-Resíduo Para a Determinação de Poluentes Emergentes por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com Detecção de Massa, Após Extração em Fase Sólida. 2014.

SIROCCHI, Veronica et al. Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 9, p. 819-825, 2014.