Análise de aminas biogénicas por HPLC em hambúrguer de salmão (*Salmo salar*) e de pescada (*Merluccius merluccius*) com adição de salicórnia (*Salicornia ramosissima*)

Ana Gabriela Barbosa Ramos
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Química e Bioquímica – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Departamento de Engenharia Biológica – Universidade do Minho

2022

Orientadora

Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira, Professora Associada, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, REQUIMTE – LAQV

Coorientadores

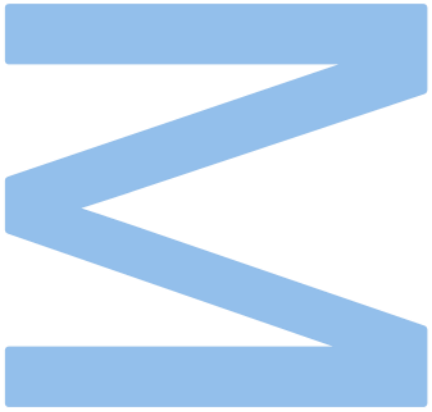
Professora Doutora Olga Maria da Silva Viegas, Investigadora, REQUIMTE – LAQV, Professora auxiliar, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

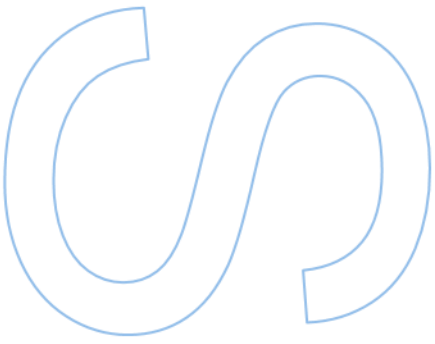
Prof. Dr Edgar Augusto Costa Pinto, Professor Adjunto, Politécnico do Porto. Escola Superior de Saúde, REQUIMTE – LAQV





Universidade do Minho
Escola de Engenharia







O trabalho experimental apresentado nesta tese, foi realizado no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP) e foi financiado pelo projeto NORTE-01-0145-FEDER-000052, intitulado: Healthy&ValorFOOD. Adicionalmente este trabalho recebeu apoio e ajuda do projeto DIETxPOSOME project (PTDC/SAU-NUT/6061/2020).

Dedicado aos meus pais, cujo incentivo permitiu a realização deste curso.

Declaração de Honra

Eu, Ana Gabriela Barbosa Ramos, inscrito(a) no Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo da presente dissertação reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar esta dissertação, declaro, ainda, que a mesma é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados na presente dissertação quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Ana Gabriela Barbosa Ramos

Porto, 30 de setembro de 2022

Agradecimentos

À professora Isabel Ferreira agradeço o apoio na pesquisa que escolhi e pela atenção que sempre me dedicou como orientadora. À professora Olga Viegas agradeço a paciência, auxílio e a dedicação que me dedicou, sua ajuda como orientadora foi essencial para a conclusão deste trabalho. Ao professor Edgar agradeço a atenção que me dedicou durante este período. Aos meus colegas de laboratório agradeço o companheirismo do dia a dia.

Aos professores e colegas do curso de Mestrado em Tecnologia Alimentar, tanto da Universidade do Minho quanto da Universidade do Porto agradeço o acolhimento que recebi, o companheirismo e toda a ajuda de que precisei nestes dois anos de curso.

Aos meus pais, Marco Antonio e Renata, pelo amor incondicional, pelo apoio que sempre esteve presente e pelo eterno incentivo, eu agradeço todos os dias. Sem vocês essa trajetória não teria sido possível. Obrigada por serem meus maiores exemplos de vida.

À minha avó, Silvaneide e tios, Antonio e Claudio, agradeço por sempre me apoiarem e pelo amor dedicado a mim. Ao meu querido primo Thiago, sua chegada trouxe muita alegria para toda a família e, mesmo distante, para mim também.

Àqueles que já partiram, meus avós Milton e Maria de Lourdes e meu avô Antonio Renato, meus mais sinceros agradecimentos por serem parte de mim e um grande exemplo na minha vida. Espero que onde estejam tenham orgulho de mim.

Aos meus amigos, da escola e da graduação, agradeço as risadas, as lágrimas, o apoio e todas as experiências que tivemos juntos. Aos professores da graduação, agradeço o apoio e incentivo que me dedicaram. A todos aqueles que me apoiaram durante todo esse percurso acadêmico, muito obrigada.

Resumo

As aminas biogénicas (AB) são um dos grupos de compostos indesejáveis encontrados em alimentos, inclusive nos peixes. Ao serem consumidas podem levar a intoxicações, principalmente a histamina, que é a única que possui limites máximos de concentração de acordo com diferentes legislações mundiais. Por serem termoestáveis o controlo deve ser direcionado para evitar sua formação. Algumas espécies vegetais e seus extratos já foram testados quanto a sua eficiência neste controlo. Neste trabalho o objetivo foi avaliar o efeito da *Salicornia ramosissima*, planta halófita, na formação de aminas biogénicas em hambúrgueres de peixe.

Após preparo dos hambúrgueres (controlo – sem adição de temperos; sal 1% - para avaliar a contribuição do NaCl e salicórnia – quantidade correspondente à 1% de NaCl), estes foram analisados em dias diferentes (dias 0, 2, 5 e 8) e armazenadas sob refrigeração (4ºC). A análise foi feita em HPLC de fase reversa com detetor de fluorescência, após extração ácida e derivatização com cloreto de dansilo. As aminas analisadas foram: histamina (HIS), cadaverina (CAD), putrescina (PUT), 2-feniletilamina (2-FEN), triptamina (TRIP) e tiramina (TIR). O método utilizado foi validado e os resultados analisados estatisticamente.

No dia de aquisição dos peixes (dia 0), o salmão apresentou 5,0, 1,7 e 1,2 mg/kg de HIS, PUT e CAD, respetivamente e a pescada apresentou 8,3, 0,6 e 0,3 mg/kg de HIS, PUT e CAD, respetivamente. Em ambos os peixes a triptamina foi detetada, mas não quantificada (< 0,487 mg/kg) e a 2-FEN e a TIR não foram detetadas.

Nos hambúrgueres de salmão, no dia 2, observou-se um aumento considerável de todas as AB (∑AB salmão controlo: 257 mg/kg: CAD (125 mg/kg)> HIS (80 mg/kg) > TIR (40 mg/kg)> PUT (7,9 mg/kg)> 2-FEN (2,7 mg/kg) > TRIP (1,5 mg/kg). O tratamento com salicórnia, levou a uma inibição ligeira, sem significado estatístico, na formação das AB (∑AB 226 mg/kg). Nos dias 5 e 8, continuou a observar-se aumento considerável de AB, mantendo o perfil do dia 2, não havendo capacidade inibitória quer do sal quer da salicórnia sobre a formação das mesmas: ∑AB controlo, sal e salicórnia do dia 5: 411, 437, 421 mg/kg, respetivamente e ∑AB controlo, sal e salicórnia do dia 8: 630, 657, 627 mg/kg, respetivamente.

No entanto na pescada, no dia 2, o aumento de AB foi pouco expressivo (∑AB controlo: 12,6 mg/kg), logo não foi possível observar efeitos significativos pela adição do sal (16,2 mg/kg) ou da salicórnia (7,9 mg/kg). No entanto, no dia 5 (∑AB controlo = 56,0 mg/kg), foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$), do teor total de AB nos hambúrgueres com adição de salicórnia (∑AB = 42,6 mg/kg), especialmente pela inibição da formação da cadaverina (38,2 mg/kg nos hambúrgueres sem tempero vs 30,4 mg/kg nos hambúrgueres com 1% sal vs 18,0 mg/kg nos hambúrgueres com salicórnia). Ao dia 8, o ∑AB dos hambúrgueres controlo aumentou para 117 mg/kg, e observou-se uma inibição significativa do total de AB nos hambúrgueres com 1% sal ($\sum AB_{Sal}$ =92,2 mg/kg). No entanto o ∑AB dos hambúrgueres com salicórnia (42,9 mg/kg) foi semelhante ao observado ao dia 5, sendo significativamente inferior ($p < 0,05$), aos hambúrgueres controlo e adicionados de sal. No dia 8, à cadaverina (controlo, sal e salicórnia: 91,2, 65,2 e 16,3 mg/kg, respetivamente) junta-se também o efeito inibitório significativo ($p<0,05$) sobre a putrescina (controlo, sal e salicórnia: 10,7, 6,7 e 5,7 mg/kg, respetivamente) e tiramina (controlo, sal e salicórnia: 4,6, 2,4 e 1,6 mg/kg, respetivamente), apesar de um aumento da histamina (controlo, sal e salicórnia: 10,2, 16,9 e 17,9 mg/kg, respetivamente).

Após a análise dos dados concluiu-se que o hambúrguer de salmão, nas condições de conservação utilizadas, revelou teores muito altos de aminas biogénicas a partir do dia 2, e que o sal de salicórnia não contrariou de forma significativa a formação das mesmas. Contrariamente aos hambúrgueres de pescada, em que se observou uma forte inibição do total de AB nos dias 5 (~ 50%) e 8 (~ 80%), sendo este efeito superior ao observado pela adição de sal (~ 20% no dia 8), e especialmente observado na cadaverina.

Palavras-chave: Aminas biogénicas; hambúrguer de peixe; *Salmo salar*; *Merluccius merluccius;* HPLC; *Salicornia ramosissima*

Abstract

Biogenic amines (BA) are one of the groups of undesirable compounds found in food, including fish. When consumed they can lead to poisoning, especially histamine, which even has maximum concentration limits according to different world legislations. Since they are thermostable, the control should be aimed at avoiding their formation. Some plant species and their extracts have already been tested for their efficiency in this control. In this work, the objective was to evaluate the effect of *Salicornia ramosissima,* a halophytic plant, as a seasoning in the formulation of fish burgers on the formation of biogenic amines.

After preparation of the burgers (control - no seasoning added; salt 1% - to assess the contribution of NaCl and samphire - amount corresponding to 1% of NaCl), they were analyzed on different days (days 0, 2, 5 and 8) and stored under refrigeration (4ºC). The analysis was done in reverse phase HPLC with fluorescence detector, after acid extraction and derivatization with dansyl chloride. The amines analyzed were: histamine (HIS), cadaverine (CAD), putrescine (PUT), 2-phenylethylamine (2-FEN), tryptamine (TRIP) and tyramine (TIR). The method used was validated and the results were statistically analyzed.

On the day of the fish acquisition (day 0), salmon presented 5.0, 1.7 and 1.2 mg/kg of HIS, PUT and CAD, respectively and hake presented 8.3, 0.6 and 0.3 mg/kg of HIS, PUT and CAD, respectively. In both fish tryptamine was detected but not quantified (< 0.487 mg/kg) and 2-FEN and TIR were not detected.

In salmon burgers, on day 2, a considerable increase of all BA was observed (∑BA control salmon: 257 mg/kg: CAD (125 mg/kg)> HIS (80 mg/kg) > TIR (40 mg/kg)> PUT (7.9 mg/kg)> 2-FEN (2.7 mg/kg) > TRIP (1.5 mg/kg). The salicornia treatment, led to a mild inhibition, without statistical significance, in BA formation (∑BA 226 mg/kg). On days 5 and 8, a considerable increase in BA continued to be observed, maintaining the profile of day 2, with no inhibitory ability of either salt or salicornia on their formation: ∑BA control, salt and salicornia on day 5: 411, 437, 421 mg/kg, respectively and ∑BA control, salt and salicornia on day 8: 630, 657, 627 mg/kg, respectively.

However in hake, on day 2, the increase in AB was negligible (∑BA control: 12.6 mg/kg), so no significant effects could be observed by the addition of salt (16.2 mg/kg) or salicornia (7.9 mg/kg). However, on day 5 (∑BA control = 56.0 mg/kg), a

significant reduction ($p < 0.05$), of the total BA content could be observed in the burgers with added salicornia (∑BA = 42.6 mg/kg), especially by inhibition of cadaverine formation (38.2 mg/kg in the burgers without seasoning vs 30.4 mg/kg in the burgers with 1% salt vs 18.0 mg/kg in the burgers with salicornia). By day 8, the ∑BA of the control burgers increased to 117 mg/kg, and a significant inhibition of total BA was observed in the 1% salt burgers (∑ABSal =92.2 mg/kg). However the ∑BA of the burgers with salicornia (42.9 mg/kg) was similar to that observed on day 5, and was significantly lower ($p < 0.05$), than the control and salt added burgers. On day 8, the cadaverine (control, salt and salicornia: 91.2, 65.2 and 16.3 mg/kg, respectively) was joined by a significant inhibitory Effect ($p<0.05$) on putrescine (control, salt and salicornia: 10.7, 6.7 and 5.7 mg/kg, respectively) and tyramine (control, salt and salicornia: 4.6, 2.4 and 1.6 mg/kg, respectively), despite an increase in histamine (control, salt and salicornia: 10.2, 16.9 and 17.9 mg/kg, respectively).

After analysis of the data it was concluded that salmon hamburger, under the preservation conditions used, showed very high levels of biogenic amines from day 2, and that salicornia salt was not able to prevent significantly its formation. Contrary to hake burgers, in which a strong inhibition of total BA was observed on days 5 (~ 50%) and 8 (~ 80%), this effect being greater than that observed by the addition of salt (~ 20% on day 8), and especially observed in cadaverine.

Keywords: Biogenic amines, fishburger, *Salmo salar*, *Merluccius merluccius,* HPLC, *Salicornia ramosissima*

Índice

Agradecimentos……...ii

Resumo ……..iii

Abstract……v

Lista de Tabelas x

Lista de Figuras xi

Lista de Abreviaturas xiii

Introdução 1

1. Aminas biogénicas.....1

1.1 Classificação das ABs……..……3

1.2 Fatores para formação das ABs……..……..5

1.3 Função fisiológica……...……..……5

1.4 Problema de Saúde Pública…….……6

1.4.1 Sintomas……..……...7

1.4.1.1 Histamina……..……..8

1.4.1.2 Tiramina…….……10

1.4.1.3 Putrescina e cadaverina……....11

1.4.1.4 Agmatina……..……11

1.4.1.5 Triptamina……..……11

1.4.1.6 2 - feniletilamina……..……12

1.5 Indicador de deterioração do pescado……..……..12

1.6 Prevenção da formação de ABs……..……13

1.6.1 Métodos de conservação de alimentos……..……13

1.7 Casos de intoxicação……..15

1.8 RASFF……..……16

1.9 Métodos de análise para aminas biogénicas……16

1.9.1 HPLC……17

1.10 Limite de aminas biogénicas no pescado……18

1.11 Impacto das ABs em alimentos para os países……20

1.12 Espécies, géneros e famílias de peixes e sua relação com ABs……21

2. Salicórnia……23

2.1 Taxonomia e características morfológicas 23

2.2 Distribuição geográfica……25

2.3 Cultivo em Portugal……26

2.4 Consumo e composição……26

2.5 Teor de sódio……27

2.6 Substituto do sal de cozinha……28

3. Salmão-do-Atlântico e Pescada Europeia……30

3.1 Taxonomia e características gerais……31

3.1.1 Salmão-do-Atlântico……31

3.1.2 Pescada europeia……33

3.2 Produção de aminas biogénicas……34

3.2.1 Salmão-do-Atlântico……34

3.2.2 Pescada europeia……36

4. Consumo de peixe……39

4.1 Recomendação da OMS e outras agências de saúde……39

4.2 Limitações do consumo……40

5. Objetivos do trabalho……42

6. Materiais e métodos……43

6.1 Reagentes e outros materiais……43

6.2 Preparo das soluções ……..……..……..43

6.3 Preparo das amostras……..…….44

6.3.1 Peixes……..…….…….…..…..44

6.3.2 Sal de salicórnia…….. ……...…45

6.3.3 Preparo dos hambúrgueres…….……..……..……....46

6.3.4 Identificação das amostras…..……..47

6.4 Determinação das Aminas Biogénicas……..……49

6.4.1 Extração das Aminas Biogénicas ……...……49

6.4.2 Derivatização……..……49

6.4.3 Análise das Aminas Biogénicas por HPLC-FLD……...….51

6.4.3.1 Controlo de Qualidade Analítico……..……52

6.5 Análise estatística……..53

7. Resultados e discussão……..……54

7.1 Controlo de Qualidade Analítico…….……...……..54

7.2 Resultados das Aminas Biogénicas nas amostras.……...59

7.2.1 Aminas biogénicas no salmão-do-Atlântico e na pescada europeia....60

7.2.2 Formação de Aminas Biogénicas no salmão ao longo do período de armazenamento……...60

7.2.3 Formação de Aminas Biogénicas na pescada ao longo do armazenamento e efeito da salicórnia……..64

7.3 Efeito do sal de salicórnia……..……...73

Conclusão……..……..77

Referências Bibliográficas 79

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aminas biogénicas e aminoácidos precursores……..……..…..1

Tabela 2 - Estrutura química das aminas biogénicas e sua classificação……..…..…4

Tabela 3 - Classificação dos sintomas possíveis em Intoxicação por Histamina…..…..9

Tabela 4 – Código das amostras de salmão……..…….48

Tabela 5 - Códigos das amostras de pescada…….……...48

Tabela 6 - Programa do gradiente de eluição para separação das aminas biogénicas……..51

Tabela 7 - Equação de regressão e R^2 das aminas biogénicas……..……..…55

Tabela 8 - LOD e LOQ das aminas biogénicas expressos em mg/kg…….……56

Tabela 9 - Recuperação do método a três níveis (3, 8, 20 mg/kg) aplicado em amostra de salmão, expressa em %.....57

Tabela 10 - Repetibilidade e precisão intermédia do método (CV %)…...……..58

Tabela 11 - Resultados das ABs em hambúrgueres de salmão de pescada em mg/kg…….…59

Lista de Figuras

Figura 1 - Formação das aminas biogénicas……..……....2

Figura 2 - *Salicornia ramosíssima* com coloração arroxeada……...……24

Figura 3 - *Salicornia ramosíssima* com coloração esverdeada…….……24

Figura 4 - Distribuição geográfica da *Salicornia ramosissima* em Portugal Continental…….25

Figura 5 - Salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*)……...……...……32

Figura 6 - Pescada europeia (*Merluccius merluccius*)...…….34

Figura 7 - Sal de salicórnia……..……45

Figura 8 - Reação entre cloreto de dansilo e aminas biogénicas……..…….…..50

Figura 9 – Cromatograma característico de uma mistura de padrões de aminas biogénicas a 20 µg/mL obtido após derivatização e HPLC-FDL …..……..……..54

Figura 10 - Cromatograma das recuperações (sem padrões e com mix de padrões a 20 mg/kg). ……..……57

Figura 11 - Gráficos representativos da concentração das aminas biogénicas (expressos em mg/kg, n = 3 × 3, três hambúrgueres independentes analisados em triplicata) nos hambúrgueres de salmão ao longo do armazenamento (dia 2 a dia 8). * indica diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p<0,05$). As amostras codificadas são: CS (controlo sem aditivos), CSS (controlo com sal) e SS (amostra com salicórnia), sendo os números 2, 5 e 8 correspondente ao dia de armazenamento.

.....……62

Figura 12 - Gráficos representativos da concentração das aminas biogénicas (expressos em mg/kg, n = 3 × 3, três hambúrgueres independentes analisados em triplicata) nos hambúrgueres de pescada ao longo do armazenamento (dia 2 a dia 8). * indica diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p<0,05$). As amostras codificadas são: CP (controlo sem aditivos), CPS (controlo com sal) e PS (amostra com salicórnia), com os números 2, 5 e 8 representando os dias de armazenamento……..……..……...66

Figura 13 – Gráficos representativos do somatório da concentração de aminas biogénicas nas três condições estudadas. Sendo A: salmão e B: pescada, em mg/kg. * indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05). As amostras codificadas do salmão são: CS (controlo sem aditivos), CSS (controlo com sal) e SS (amostra com salicórnia), sendo os números 2, 5 e 8 correspondente ao dia de armazenamento. As amostras codificadas de pescada são: CP (controlo sem aditivos), CPS (controlo com sal) e PS (amostra com salicórnia), com os números também representando os dias de armazenamento……...74

Figura 14 – Gráficos representativos do somatório de cada grupo de aminas biogénicas classificadas de acordo com sua estrutura química: aminas alifáticas (cadaverina e putrescina), aminas aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e aminas heterocíclicas (histamina e triptamina) nos três tratamentos analisados em amostras de salmão em mg/kg. * indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05). As amostras codificadas do salmão são: CS (controlo sem aditivos), CSS (controlo com sal) e SS (amostra com salicórnia), sendo os números 2, 5 e 8 correspondente ao dia de armazenamento……..……75

Figura 15 - Gráficos representativos do somatório de cada grupo de aminas biogénicas classificadas de acordo com sua estrutura química: aminas alifáticas (cadaverina e putrescina), aminas aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e aminas heterocíclicas (histamina e triptamina) nos três tratamentos analisados em amostras de pescada em mg/kg. * indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05). As amostras codificadas de pescada são: CP (controlo sem aditivos), CPS (controlo com sal) e PS (amostra com salicórnia), com os números representando os dias de armazenamento (dias 2, 5 e 8)..……..76

Lista de Abreviaturas

2-FEN: 2-feniletilamina

AB: amina biogénica

AGM: agmatina

CAD: cadaverina

CV: Coeficiente de Variação

DAO: diamino oxidase

DGS: direção Geral da Saúde

Dns-Cl: cloreto de dansilo

DP: desvio padrão

EFSA: *European Food Safety Authority*/Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organização para Agricultura e Alimentação)

FDA: *Food and Drug Administration*

HIS: histamina

HMT: histamina-N-metiltransferase

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IPMA : Instituto Português do Mar e da Atmosfera

IQ: Índice de Qualidade

LOD: Limite de Deteção

LOQ: Limite de Quantificação

MAO: monoamina oxidase

Nd: não detetado

Nq: não quantificável

PI: padrão interno

ppm: partes por milhão

PUT: putrescina

RASFF: *Rapid Alert System for Food and Feed* (Sistema de Alerta Rápido para alimentos para Consumo Humano e Animal)

REQUIMTE: Rede de Química e Tecnologia

RSD: desvio padrão relativo

TCA: ácido tricloroacético

TIR: tiramina

Tr: tempo de retenção

TRIP: triptamina

UV: ultravioleta

WHO/OMS: *World Health Organization*/Organização Mundial da Saúde

Introdução

1. Aminas biogênicas

As aminas biogénicas (AB) são compostos nitrogenados, de baixo peso molecular e não-voláteis, que podem estar presentes em diferentes alimentos como peixes e seus derivados, queijos, carnes e seus derivados, vinho, vegetais, castanhas, chocolate, entre outros [1]. São formadas a partir da descarboxilação de certos aminoácidos livres ou da aminação de compostos contendo carbonil, como cetonas e aldeídos [2–4].

As principais aminas biogénicas encontradas nos alimentos e estudadas são: histamina, cadaverina, putrescina, espermina, espermidina tiramina, agmatina, feniletilamina e triptamina. Cada uma delas é originada a partir de um aminoácido específico, exceto a espermina e espermidina que são formadas a partir da putrescina através de enzimas específicas [5]. Na Tabela 1, é possível observar cada uma das aminas e seu aminoácido precursor ao lado.

Aminas biogénicas	Aminoácidos
Agmatina	Arginina
Cadaverina	Lisina
Feniletilamina	Fenilalanina
Histamina	Histidina
Putrescina	Ornitina
Tiramina	Tirosina
Triptamina	Triptofano

Tabela 1. Aminas biogénicas e aminoácidos precursores.

Sua formação é proporcionada, principalmente, pela presença de bactérias descarboxilase positivas, ou seja, microrganismos que possuem a capacidade de

produzir a enzima que é necessária para transformar os aminoácidos livres em aminas biogénicas, além de uma exposição a temperaturas inadequadas [3], acima de 4º C [6] e a presença de aminoácidos livres precursores das aminas. Na Figura 1 é possível visualizar o processo de formação das aminas biogénicas a partir dos seus aminoácidos precursores e, no caso da putrescina, uma das vias alternativas de formação.

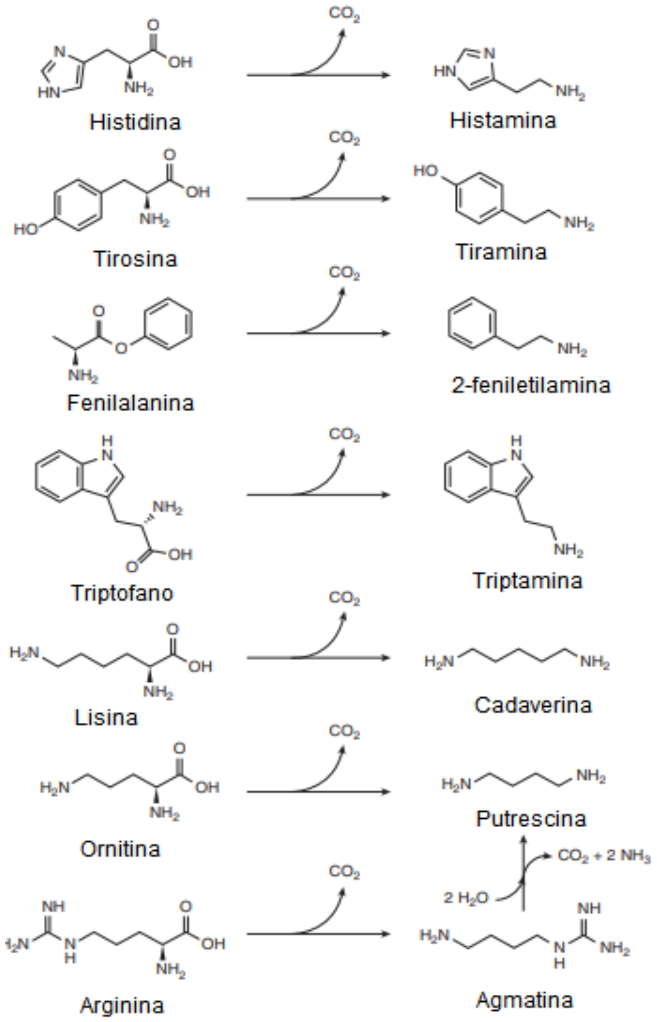


Figura 1 - Formação das aminas biogénicas.

Adaptado de: Tabanelli, et al [7]

Logo, para formação das ABs é preciso existir aminoácidos livres na musculatura, mais bactérias produtoras de descarboxilase e temperaturas inadequadas. No entanto,

outros fatores (pH, atividade de água, oxigénio disponível, presença de outros microrganismos, entre outros) influenciam tanto a atividade enzimática quanto a composição da microbiota, o que causa variação na concentração de aminas biogénicas em diferentes espécimes, mesmo que sejam da mesma espécie e até do mesmo lote [3].

Existem diferentes tipos de bactérias que possuem a enzima descarboxilase, podendo ser Gram + ou Gram -. São elas bactérias dos géneros *Morganella (Morganella morganii* e *Morganella psychrotolerans)*, Aeromonas (*Aeromonas hydrophila*), *Enterobacter* (*Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*), *Hafnia* (*Hafnia alvei*), Klebsiella (*Klebsiella pneumoniae*), *Proteus* (*Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilie*), *Photobacterium (Photobacterium damselae e Photobacterium phosphoreum)*, *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas cepaceae*) [3,8], *Lactobacillus spp*, *Enterococcus spp, Vibrio spp* e *Raoutella* (*Raoutella planticola*), entre outros [2,3,6,9–11]. Muitos desses microrganismos fazem parte da microbiota normal destes peixes, sendo encontrados na pele, brânquias e trato gastro-intestinal, mas podem chegar até a musculatura através da evisceração, filetagem e outros manuseios, produzindo enzimas e tendo contato com os aminoácidos livres, que são precursores das ABs, o que pode levar à formação destes compostos [3,12].

1.1 Classificação das ABs

Podem ser classificadas pela sua estrutura química em aminas aromáticas (tiramina e feniletilamina), alifáticas (cadaverina, putrescina, espermina e espermidina) e heterocíclicas (histamina e triptamina) [3,5]. Também podem ser classificados pela quantidade de aminas: monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (cadaverina e putrescina) e poliaminas (agmatina, espermina e espermidina) [3,13,14]. As monoaminas são produzidas, a partir dos seus respectivos aminoácidos precursores, diretamente em uma etapa de descarboxilação. As diaminas podem ter variações na sua formação: a cadaverina é produzida diretamente através da descarboxilação da lisina, já a putrescina pode ser formada pela descarboxilação direta da ornitina ou indiretamente, após hidrólise do aminoácido arginina [13]. A agmatina é gerada após a

descarboxilação da arginina e pode ser precursora da putrescina, através de diferentes vias [14]. Na Tabela 2 é possível visualizar as principais aminas biogénicas, sua estrutura química e sua classificação em relação a esta estruturação.

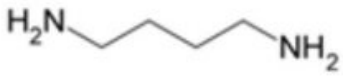
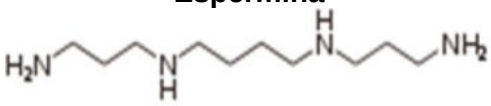
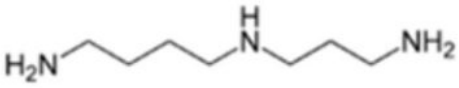
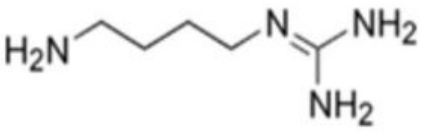
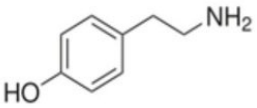
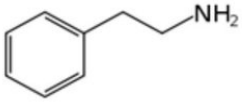
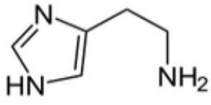
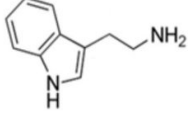
AMINAS ALIFÁTICAS	
Putrescina 	**Cadaverina** 
Espermina 	**Espermidina** 
Agmatina 	
AMINAS AROMÁTICAS	
Tiramina 	**Feniletilamina** 
AMINAS HETEROCÍCLICAS	
Histamina 	**Triptamina** 

Tabela 2. Estrutura química das aminas biogénicas e sua classificação

Fonte: Adaptado de Schumacher, R. L. *et al* [15]

1.2 Fatores para formação de ABs

Vários fatores podem auxiliar a formação das aminas biogénicas, sendo eles intrínsecos (inerentes a matriz alimentar) ou extrínsecos. Dentre os fatores da matriz estão a composição da musculatura do peixe, ou seja, os tipos de aminoácidos e suas quantidades, além da taxa de humidade e atividade de água, características do tecido conjuntivo e pH. São fatores que não se pode influenciar, são características próprias deste tipo de alimento. Dentre os fatores extrínsecos está a temperatura, humidade relativa, condições de manipulação e de armazenamento, entre outros.

A concentração de aminas biogénicas encontradas depende da espécie de peixe e, por conseguinte, da sua composição no que se refere aos aminoácidos e da quantidade de bactérias descarboxilase positiva que chegaram na musculatura além das temperaturas a que o alimento foi submetido [12].

Algumas aminas já estão presentes no peixe mesmo antes da pesca/abate, pois fazem parte da fisiologia do animal. Outras só começam a serem formadas no *post-mortem*. A histamina, por exemplo, não está presente no peixe vivo e nem logo após a pesca. Esse composto só começa a ser produzido pelas bactérias descarboxilase positiva se os fatores ambientais permitirem (temperatura, atividade de água, pH, etc.) e se houver histidina livre [16].

1.3 Função fisiológica

As aminas também possuem função fisiológica nos peixes e em outros animais, incluindo o ser humano. No entanto, a sua presença, em concentrações elevadas, pode trazer malefícios para a saúde, humana ou animal [14,17]. A histamina é um neurotransmissor e se encontra envolvida no sistema imunológico. Pode ser produzida em diferentes tipos de células e é armazenada em basófilos. A espermina, putrescina, espermidina e cadaverina têm capacidade de se associar com componentes ácidos como DNA, RNA e proteínas e influenciar a expressão de certos genes, como aqueles envolvidos no sistema imune, além de possuírem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e de estimularem o olfato. [2]

A própria histidina, aminoácido precursor da histamina, possui função importante na musculatura dos peixes. Tem a função de agir como substância tampão, de modo a controlar o pH no tecido, principalmente em momentos de maior esforço, quando há a produção de grandes quantidades de ácido láctico [16].

A espermina tem a função de proteger o DNA do estresse oxidativo [2] e, juntamente com a agmatina, espermidina e putrescina podem agir nas células de diferentes modos, desde atuações em certos processos celulares (crescimento, diferenciação e divisão), além de sinalização intracelular e regulação de algumas enzimas específicas [14]. A espermidina e putrescina, que são consideradas aminas fisiológicas, possuem diferentes funções como regulação de ácidos nucleicos, estabilização de membranas plasmáticas e auxílio na síntese de proteínas [18].

A agmatina, assim como a histamina possui função de neurotransmissor, porém, além desta, também possui diferentes atribuições. Em mamíferos, sabe-se que essa amina influencia o comportamento de alimentação, mas é preciso mais estudos para saber se essa mesma influência ocorre nos peixes [19]. Pode atuar aumentando a liberação de catecolaminas (estimula adrenalina e noradrenalina), pode influenciar secreção de insulina [14,19] e outros compostos, entre outras funções.

1.4 Problema de Saúde Pública

O organismo humano possui um sistema de detoxificação, concentrado principalmente no trato gastrointestinal, sendo composto por certas enzimas que tem a função de agir sobre essas aminas, diminuindo sua toxicidade. No entanto, certos fatores podem influenciar negativamente este sistema, como o consumo de álcool, uma deficiência enzimática [3], além do uso de certos medicamentos como a isoniazida (tratamento de tuberculose) [12], que podem comprometer a detoxificação e permitir a ação das aminas biogénicas no organismo. Também existem medicamentos que têm a capacidade de inibir enzimas envolvidas no sistema de detoxificação como a diamino oxidase (DAO) e monoamina oxidase (MAO), responsáveis pela degradação das aminas biogénicas [6]. A histamina possui uma enzima específica responsável pela sua metabolização: histamina-N-metiltransferase (HMT), que juntamente da DAO, produzem metabólitos que são excretados na urina [12].

Mesmo que esses fatores não estejam presentes o fato da concentração de ABs estar acima do recomendado, isto é, estar em concentrações consideradas altas, já pode ser o suficiente para causar intoxicação e provocar sintomas, pois o sistema de detoxificação acaba por não conseguir suprir a necessidade do organismo [4]. Isto quer dizer que, mesmo em indivíduos saudáveis, uma concentração elevada de aminas biogénicas pode levar ao desenvolvimento de uma intoxicação e causar sintomas, cuja gravidade pode variar.

As aminas podem levar ao aparecimento de sintomas distintos quando causam quadros de intoxicação onde é possível perceber uma sintomatologia clara [3]. A histamina é considerada a AB mais tóxica e é aquela que está mais associada com surtos envolvendo esses compostos. É um neurotransmissor [20], além de ter uma função vasodilatadora, podendo ter origem endógena. Quando é de origem exógena pode causar um quadro de intoxicação. A intoxicação por histamina, é também chamada de histaminose, intoxicação escombróide, escombrotoxicose e, em inglês, *Scombroid Poisoning* ou *Scombroid Fish Poisoning*. Na Europa e EUA, cerca de 40% dos casos de intoxicação alimentar estão associados com a histamina [3]. Sua sintomatologia é variada e sua gravidade depende da quantidade de histamina consumida; sensibilidade individual [21]; concentração de outras aminas como putrescina e cadaverina, que podem intensificar a toxicidade da histamina; entre outros fatores. Os sintomas geralmente surgem logo após o consumo, em cerca de poucos minutos, podendo chegar a três horas [22]. A recuperação tende a ser rápida, em cerca de 24 horas [13] e raramente provoca casos fatais. Ainda assim, indivíduos mais sensíveis podem desenvolver quadros mais graves, que quando não são tratados, podem levar a consequências consideráveis, logo o controlo desta substância em alimentos é de suma importância.

1.4.1 Sintomas

As aminas biogénicas podem causar diferentes sintomas quando provocam um quadro de intoxicação. A gravidade desses sintomas também depende do tipo de amina, da sua concentração e de características de cada indivíduo. No decorrer do processo de deterioração dos peixes, várias aminas biogénicas podem ser formadas,

como histamina, putrescina, cadaverina, agmatina, entre outras. Cada uma delas pode trazer prejuízos à saúde humana [23] com maior ou menor gravidade dependendo do tipo de amina, concentração, interação entre aminas presentes e sensibilidade individual.

O consumo de baixas concentração de aminas biogénicas pode não causar qualquer malefício para um indivíduo saudável. Porém, em uma pessoa que faça parte do grupo de risco, isto é, aqueles que possuem alguma deficiência de enzimas do sistema de detoxificação (DAO e MAO, por exemplo) seja por fatores genéticos ou uso de certos medicamentos, seja pelo consumo de álcool, ou por outros motivos, o consumo de peixes com baixas doses de ABs já pode ser o suficiente para causar um quadro de intoxicação [24].

1.4.1.1 Histamina

A histamina é a amina que apresenta maior preocupação e um dos motivos é sua capacidade de provocar um quadro de intoxicação grave e com sintomatologia variada. Os possíveis sintomas da histaminose são: cefaleia; hipotensão; arritmia cardíaca; asma; edema facial; broncoespasmo; êmese; diarreia; dispneia; disfagia [3]; sensação de queimação na cavidade oral; tonturas; dor no estômago [22,25]; etc. Também pode causar quadros graves de anafilaxia, sinais neurológicos e até provocar óbito [13]. Esses sintomas ocorrem devido às diferentes ações que a histamina pode ter, por exemplo, sua capacidade de levar a dilatação de vasos sanguíneos periféricos pode provocar sintomas como hipotensão, rubor da face e cefaleia; como pode levar a um aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos, pode gerar edema na face e pescoço; possui efeito estimulatório na musculatura cardíaca, que pode provocar alterações no ritmo cardíaco como palpitações e taquicardia; tem efeito estimulatório em neurônios sensoriais o que pode causar dores e sensação de queimação na cavidade oral e/ou na face [26] e pode levar a contração dos músculos do epitélio intestinal, o que pode levar a dores abdominais, náusea, êmese e diarreia [6].

Os sintomas também podem ser classificados de acordo com o(s) tecido(s) mais acometido(s) [20]. Podendo estar um ou mais dos sintomas presentes

acometendo diferentes regiões do organismo. Na Tabela 3 é possível visualizar os sintomas da intoxicação por histamina de acordo com a região em que se apresentam.

Sintomas de Intoxicação por Histamina
Cutâneos
Prurido, erupção cutânea, edema de face e pescoço, rubor facial
Hemodinâmicos
Palpitações, taquicardia, hipotensão
Gastrointestinais
Náusea, êmese, dores abdominais, diarreia
Neurológicos
Cefaleia, formigamento, dor, sensação de queimação na cavidade oral
Respiratórios
Broncoespasmo, dispneia, asma

Tabela 3. Classificação dos sintomas possíveis em Intoxicação por Histamina

Fonte: Adaptado de Hariri, Bouchriti e Bengueddour [20].

O tratamento tende a ser semelhante àquele utilizado para alergias alimentares, com o uso de anti-histamínicos, principalmente os antagonistas do receptor H1 [6] como a difenidramina e antagonistas do receptor H2, como a cimetidina [12] .

Estudos indicam que baixas concentrações desta amina podem ou não causar quadros de intoxicação, com sintomatologia podendo ser aparente dependendo de características individuais como sensibilidade maior a histamina; consumo de bebidas

alcóolicas; deficiência das enzimas DAO e MAO, seja por predisposição genética, utilização de medicamentos inibidores dessas enzimas do sistema de detoxificação ou alguma patologia específica onde haja comprometimento do trato gastro-intestinal. Já a presença de altas concentrações pode gerar quadros de intoxicação em qualquer indivíduo, saudável ou não [26].

A intoxicação é também chamada de intoxicação escombróide por causa da sua relação com certas famílias de peixe, cujas espécies possuem muita histidina livre na musculatura, que é o precursor da histamina. Essas famílias são Scombridae e Scomberesocidae e, além destas, outras famílias também estão envolvidas em vários casos de intoxicação. Diferentes géneros e espécies já foram descritas como causa de casos de intoxicação como: *Thunnus* spp. (atum), *Sardinella* spp. (sardinha), etc.

A histamina é considerada a amina biogénica com maior periculosidade. Seu risco se deve ao fato de ser não-volátil, ser termoestável e não alterar características sensoriais dos alimentos, isto é, mesmo se encontrando em altas concentrações e com capacidade de causar quadros de intoxicação, não gera sinais que determinam uma não aceitação da matriz alimentar por parte do consumidor, devido a alterações na cor, textura ou aroma [5,22,27,28]. Essa capacidade de não ser detetada por alterações sensoriais presentes no alimento também ocorre com as outras aminas biogénicas, o que pode levar a um risco elevado para o consumidor [29].

Pela sua capacidade de causar uma desordem muitas vezes confundida com quadros de alergia alimentar, a histamina é descrita como possuindo um potencial alergênico [6]. No entanto, não pode ser chamada de alérgeno, apenas a sua sintomatologia que pode ser confundida com casos alérgicos. Também pode ser confundida com infecção por Salmonella spp., devido à possibilidade de desenvolvimento de sintomas do trato gastro-intestinal [10,14,30].

1.4.1.2 Tiramina

A tiramina geralmente não é encontrada em peixes frescos ou se encontra em concentrações muito baixas. Sua concentração só aumenta em peixes fermentados e em peixes com maior índice de deterioração. Tem a capacidade de potencializar a

histamina [12]. Pode causar o aparecimento de desordens respiratórias; êmese; náusea e aumento da frequência cardíaca [3] e está mais associada com o consumo de queijos [31]. Em altas concentrações também pode causar enxaquecas e crises hipertensivas [24].

1.4.1.3 Putrescina e cadaverina

A putrescina e cadaverina não são consideradas tóxicas, mas podem potencializar a toxicidade da histamina [11,16,26] e demais aminas, uma vez que quando presentes no trato gastro-intestinal interferem no sistema de detoxificação, podendo inibir enzimas responsáveis pela degradação destes compostos, como DAO, o que favorece a absorção das demais aminas. [3,4,12,32]. Essas aminas também podem reagir com nitrito e formar nitrosaminas, substâncias que tem potencial carcinogénico. [4,29,33]. Já existem estudos que associam essas aminas com casos de cancro gástrico, devido a sua capacidade de formar compostos carcinogênicos [13].

1.4.1.4 Agmatina

A agmatina também pode potencializar a toxicidade da histamina, pois assim como a cadaverina e putrescina, interfere no sistema de detoxificação [14].

1.4.1.5 Triptamina

A triptamina pode causar sintomatologia em algumas pessoas, que podem apresentar quadros de hipertensão [32].

1.4.1.6 2-feniletilamina

Assim como a tiramina, pode levar a um aumento na pressão sanguínea, além de ter ação inibitória em DAO e HMT. Logo prejudica o funcionamento do sistema de detoxificação, assim como a cadaverina e putrescina, o que pode levar ao aumento da toxicidade da histamina, mesmo quando esta se encontra em menores concentrações [34]. A feniletilamina também pode induzir o desenvolvimento de enxaquecas [3].

1.5 Indicador de deterioração do pescado

O acúmulo dessas aminas é usado como um parâmetro de qualidade nos alimentos, incluindo os peixes e derivados [3,16,33,35]. Em peixes frescos a concentração de ABs é muito baixa ou inexistente, dependendo do tipo de amina, mas, à medida que a deterioração da matriz alimentar ocorre, seja por autólise e/ou por atividade bacteriana, esses níveis tendem a aumentar [24,36]. Logo é possível correlacionar a qualidade do peixe, que considera as boas práticas relacionadas à pesca, manuseio, transporte e armazenamento no que concerne, principalmente, às condições higiênicas com a presença e, especialmente, a concentração de aminas biogénicas [18,32]. Um dos métodos utilizados que aparecem em vários estudos é o desenvolvimento do Índice de Qualidade (IQ) que é determinada a partir da concentração de certas aminas (histamina, cadaverina putrescina, espermina e espermidina) no peixe [37].

A qualidade do peixe começa a decair logo após a captura, já que no *post-mortem* alterações na carcaça já ocorrem, devido a ação de microrganismos e da ação de enzimas endógenas [38]. Dentre elas, pode haver a formação de aminas biogénicas devido a ação de bactérias descarboxilase positiva que podem estar presentes [39]. Logo a determinação da concentração de aminas biogénicas nos peixes é de extrema importância e tem função relevante no que diz respeito à Saúde Pública [28].

1.6 Prevenção da formação de ABs

As aminas biogénicas tendem a ser termoestáveis, isto é, uma vez formadas torna-se muito complexo a sua eliminação. Por isso, o ideal é prevenir a sua formação com ações envolvendo os fatores extrínsecos, pois estes podem ser controlados. Deve-se respeitar as temperaturas adequadas tanto no transporte quanto no momento da manipulação e armazenamento; realizar o descongelamento de modo adequado, evitando a exposição do peixe a temperaturas e outras condições que sejam propícias ao desenvolvimento de bactérias; boas práticas de manipulação, para que não haja introdução de outros microrganismos à microbiota existente [9]; congelamento/resfriamento rápido logo após a pesca, de modo a não fornecer condições para proliferação bacteriana e a possibilidade de formação de aminas biogénicas, utilizando gelo com água potável, para que não haja introdução de novos microrganismos [16]; entre outros.

É importante salientar que as Boas Práticas de Fabricação devem ser mantidas sempre, evitando-se sempre a recontaminação ou aumento da microbiota existente no alimento. Pois mesmo que um alimento seja exposto a tratamento térmico como apertização/esterilização comercial, se houver recontaminação com bactérias descarboxilase positiva e, se existir condições ambientais adequadas, poderá existir produção de aminas biogénicas [22].

1.6.1 Métodos de conservação de alimentos

Mesmo que os microrganismos tenham sido destruídos ou estejam inativados, a enzima descarboxilase pode estar presente e agindo. Isso significa que mesmo que o peixe sofra tratamento térmico como cocção e até apertização (esterilização comercial) as aminas biogénicas permanecerão no alimento, ou seja, são termoestáveis. Isso significa um maior risco para o consumidor, já que uma vez formadas esses compostos não são destruídos. É preciso evitar a sua formação e não tentar diminuí-los quando já estão presentes [3,36].

A cadeia de frio com refrigeração e congelamento são muito importantes para conservar o peixe e diminuir a formação de ABs. Esses compostos, geralmente, possuem uma maior taxa de formação entre cerca de 20º e 37ºC, pois nestas temperaturas ocorre aceleração do metabolismo enzimático microbiano, por isso a importância de serem mantidas as temperaturas mais frias. O frio não destrói os microrganismos nem as enzimas, mas diminui a velocidade da atividade enzimática, seja ela de origem bacteriana ou endógena [3]

O uso de alta pressão também pode ser empregado, pois conseguem diminuir a população bacteriana e, por conseguinte, a produção de ABs. No entanto, esse método deve ser realizado com matéria-prima de qualidade, onde não exista altas concentração das aminas, pois depois de formados não serão destruídas por esse método de conservação [3]. A histamina, por exemplo, em conservas de peixe, é parcialmente destruída apenas em certas situações: a 102ºC após três horas ou a 116ºC após noventa minutos, que são condições muito superiores àquelas usadas na esterilização comercial [6].

A secagem no sol leva a um aumento da temperatura, que é um dos fatores que favorece a formação das aminas, mas a concentração tende a diminuir depois de certo período, pois existem bactérias presentes, que sobrevivem as condições ambientais e que têm capacidade de decompor as aminas, como: *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. [2]

Certos trabalhos demonstram que o uso de certos tipos de embalagens, como embalagens à vácuo podem ter algum efeito no acúmulo destes compostos. Esse efeito está relacionado à temperatura de armazenamento e pode ter efeito positivo ou negativo na concentração das aminas [2].

Existem plantas (como tomilho, orégãos, alecrim, canela, entre outros) utilizadas como condimentos que possuem compostos que exercem ação inibitória, diminuindo a população bacteriana; também podem agir como antioxidantes e na retenção da humidade, entre outros [37]. No entanto, outros vegetais também têm potencial para as mesmas ações ou outras atividades que podem auxiliar seja na conservação, seja ao impedir desenvolvimento de compostos nocivos para a saúde, ou seja para proporcionar a produção de substâncias benéficas [3]. Sendo preciso mais estudos sobre estas possibilidades.

Em relação as aminas biogénicas, existem trabalhos que provam a ação inibitória que certos condimentos possuem, como no artigo de Özogul, Kuley e Kenar [40], onde os autores identificaram a ação de extratos de alecrim e de sálvia na diminuição da concentração de certas aminas (histamina, cadaverina e putrescina) em filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*).

Outra forma de conservação tradicional utilizada é a salga, uma vez que o cloreto de sódio utilizado no processo, tem ação inibitória e até deletéria para certas bactérias. Além disso, durante esse processamento ocorre perda de água, essa diminuição na humidade também auxilia nesta inibição. Porém os melhores resultados ocorrem quando mais de um método de conservação é usado, deste modo as desvantagens de um método podem ser compensadas pelas vantagens do outro [3].

No geral, as aminas biogénicas são consideradas termoestáveis e não são destruídas pela maior parte dos métodos de conservação como tratamento térmico com calor (cocção, apertização), salga, congelamento, fumagem, entre outros [2].

1.7 Casos de intoxicação

Existe histórico de casos de intoxicação por histamina em vários países. Em 2017, ocorreu um surto de intoxicação por histamina na Espanha, onde mais de 150 pessoas desenvolveram sintomas após o consumo de atum contaminado e na Itália também existiram casos de intoxicação pelo consumo de atum [11].

O maior número de casos registados envolve países como EUA, Japão e Reino Unido [41], sendo que, em certos países, a intoxicação por histamina representa a maior causa de enfermidades relacionadas com alimentos [12]. Porém isso não quer dizer que outros locais não tenham casos de intoxicação. O que acontece é uma subnotificação, seja porque a intoxicação é confundida com um quadro de alergia alimentar, por conta da semelhança dos sintomas [6,42], e/ou porque a sintomatologia do caso foi leve e o paciente acometido não procurou auxílio médico [30]. Na Ásia também existem muitos casos de intoxicação relatados, principalmente nos países onde existe um maior consumo de peixes e derivados [6].

1.8 RASFF

O RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) é uma ferramenta utilizada para o compartilhamento de dados oriundas de autoridades dos países europeus, sejam eles pertencentes ou não à UE, referentes a segurança dos alimentos. Nela é possível pesquisar os casos relacionadas a histamina em peixes, em diferentes anos e com os resultados destas investigações. Para este trabalho foi realizada uma pesquisa no sistema, do dia 15/11/2005, data em que entrou em vigor o Regulamento (CE) nº 2073/2005 [43] , que determina os limites permitidos para histamina em peixes e seus produtos, além das famílias que requerem uma maior atenção, até a data de 20/09/2022. Foram encontrados cerca de 60 resultados relacionados com esta amina biogénica, sendo categorizados como sérios na decisão de risco do sistema, na maioria das vezes. Destes casos, os peixes que mais apareceram foram atum, correspondendo a cerca de metade dos casos. Dentro dessas notificações também existem investigações de suspeitas de doença causada pelo alimento, incluindo a intoxicação por histamina, onde são relatados a quantidade de pessoas afetadas, os sintomas apresentados e se foram realizadas análises no alimento. Dos cerca de 60 casos, poucos estavam relacionados a esta situação e apenas em três casos houve apresentação de maiores informações, sendo que em um deles a histaminose dos pacientes foi confirmada no hospital e nos outros dois foi realizada análise para quantificação de histamina onde os resultados ultrapassaram os 1000 mg/kg [44], muito acima do permitido pela legislação e já sendo capaz de produzir intoxicações.

1.9 Métodos de análise para aminas biogénicas

A concentração de histamina é utilizada para determinar o nível de deterioração que o peixe se encontra. Também pode ser usado como parâmetro do controle de qualidade, de modo a monitorar as práticas empregadas no manuseio, transporte e armazenamento do alimento [45].

Muitas das ABs, como a histamina, não levam a alterações no alimento seja no aroma, cor ou textura, mesmo em concentrações consideradas muito altas, podendo estar presente em quantidades maléficas ao ser humano mesmo quando o alimento ainda se encontra em condições aceitáveis pelo consumidor. Por isso não é possível determinar se a quantidade desses compostos está dentro dos limites apenas com análise sensorial, são necessárias técnicas, ensaios mais específicos [30].

As ABs são pouco voláteis e possuem poucos cromóforos (parte da molécula responsável por fornecer cor no espectro visível), logo é preciso existir uma etapa de derivatização na técnica para determinação da concentração destes compostos [32]. A deteção pode ser realizada por fluorescência ou por raios ultravioleta (UV) [35].

São necessários métodos diferentes para análise de ABs em peixes pois é uma matriz alimentar mais complexa do que outros tipos de alimentos como vegetais, por exemplo. Além disso, podem existir vários tipos de aminas, com estruturas muito distintas entre si, de modo que a metodologia deve ser capaz de quantificá-las. Existem testes imunoenzimáticos no mercado para determinação de histamina em alimentos como peixe fresco, mas estes podem ser usados apenas como método de triagem [45]. Para determinar a real concentração da amina é necessário utilizar uma técnica analítica com maior especificidade como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatographyl*), que é considerada o *golden standard* para determinação de aminas biogénicas, sendo descrita como o método de análise oficial, de acordo com o Regulamento (CE) Nº 2073/2005 [43]. Este método é considerado o melhor para determinação da concentração destes compostos devido a sua fiabilidade além de sensibilidade [21].

1.9.1 HPLC

HPLC é um tipo de análise que pertence ao grupo das cromatografias. Os métodos cromatográficos são utilizados para separar compostos que estejam presentes em uma mistura, onde outros métodos não sejam tão eficientes. Esse tipo de método possui uma fase móvel que passa por uma fase estacionária, fixa. No caso da cromatografia líquida a fase móvel é composta por líquido(s). Esta fase móvel arrasta os compostos que serão separados ao longo da fase estacionária e cada um

deles possui características distintas que interferem na sua afinidade com esta fase. Como os compostos possuem uma afinidade distinta com essa fase fixa, acabam saindo em momentos diferentes, se apresentando em zonas distintas na corrida cromatográfica [46].

O HPLC é um tipo de cromatografia líquida, cuja única diferença da cromatografia tradicional consiste no uso de altas pressões [46,47]. O equipamento consiste em reservatório para a fase móvel; bomba, que é a responsável por garantir as altas pressões; injetor; coluna cromatográfica; forno de coluna, para manter a coluna a uma temperatura constante; detetor e um sistema de computação com *software* para recolha e análise dos dados. Também pode ser utilizada uma pré-coluna, que tem a função de filtrar sujidades e outras partículas que não são do interesse da análise, de modo que não cheguem à coluna. Seu uso é recomendado para preservar a coluna e permitir que sua vida útil seja maior [47].

Neste trabalho foi realizada análise por HPLC em fase reversa. Isto significa que a fase estacionária, ou seja, a coluna cromatográfica é apolar e a fase móvel polar [48]. Existem diferentes tipos de detetores, como o detetor por UV e eletroquímico e, neste trabalho, foi utilizado o detetor por fluorescência, devido a sua sensibilidade. Após a passagem dos compostos pela coluna cromatográfica, essas moléculas são lidas pelo detetor devido a sua fluorescência (adquirida no processo de derivatização) [49] e essas informações são enviadas ao computador para que os dados sejam analisados.

1.10 Limite de aminas biogênicas no pescado

Existem estudos que determinam que um consumo superior a 1000 mg/kg de aminas biogénicas totais é suficiente para causar danos à saúde humana. Também existem trabalhos que demonstram que a tiramina apresenta um potencial de toxicidade entre as concentrações de 100 a 800 mg/kg, podendo variar de acordo com a sensibilidade do indivíduo [1,4]. Porém, apenas a histamina possui limites descritos em legislações [44, 53, 54].

Na União Europeia (EU), de acordo com o Regulamento (CE) Nº 2073/2005 [43], a determinação de critérios para certos alimentos é muito importante e, em

relação aos peixes, é preciso determinar os limites para histamina, principalmente, para famílias específicas. Essas famílias de peixes são conhecidas por possuírem, naturalmente, uma maior quantidade de histidina, o que significa que têm a capacidade de produzir altas concentrações de histamina. As famílias identificadas são Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae e Scombresosidae.

Em seu Anexo I, no Capítulo 1, nas diferentes categorias de alimentos, são descritos os produtos que necessitam de análise, o plano de amostragem, limites e o método de análise que deve ser utilizado. Uma das categorias diz respeito aos produtos de pesca das espécies pertencentes às famílias que apresentam maior risco. Devem ser coletados nove (9) unidades por lote que devem ser analisados por HPLC, que é o método de análise de referência para esta substância. Dentre nove amostras, a média não pode ultrapassar 100 mg/kg, duas (2) amostras podem estar acima deste valor, mas abaixo de 200 mg/kg e nenhuma das amostras pode ultrapassar a quantidade de 200 mg/kg. Em outra categoria estão classificados os produtos de pesca que foram submetidos a tratamento de maturação enzimática em salmoura nas espécies das famílias já descritas. O método de análise de referência é o mesmo e o plano de amostragem também; que se altera são os valores dos limites. Nestes produtos o valor médio não pode ultrapassar 200 mg/kg, duas (2) amostras podem ultrapassar este valor sem passar de 400 mg/kg e nenhuma das amostras pode ultrapassar 400 mg/kg.

O Regulamento (CE) Nº 1441/2007 [50] confirma o que foi determinado no Regulamento (CE) nº 2073/2005, em relação aos limites tolerados de histamina nos produtos oriundo da pesca e seus derivados, assim como o plano de amostragem que deve ser realizado e o método de análise de referência.

O Regulamento (UE) Nº 1019/2013 [51] separa os molhos de peixe fermentados dos demais produtos que sofrem maturação enzimática, tornando o plano de amostragem para esse tipo de produto mais simples. Por ser um alimento na forma líquida a histamina, se presente, estará amplamente distribuída, logo só é necessária uma amostra do produto. A amostra deve ser analisada por HPLC e deve ter menos que 400 mg/kg de histamina.

No Brasil, a Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019 [52] determina limites máximos para histamina em pescados (peixes, moluscos e crustáceos), incluindo suas vísceras, frescos, resfriados, congelados, temperados ou não. Devem ter no máximo 100 mg/kg, em uma amostra com nove (9) unidades amostrais, sendo que nenhuma dessas unidades pode ultrapassar o valor de 200 mg/kg. Esses valores também correspondem aos limites máximos permitidos em derivados de pescado como hambúrgueres de peixe. Já para os pescados salgados, salgados e secos, em salmoura ou anchovados o limite é maior: podem ter até 200 mg/kg, em uma amostra com nove (9) unidades amostrais, mas sem que nenhuma dessas unidades ultrapasse 400 mg/kg.

Nos EUA os limites são determinados pela FDA (*Food and Drug Administration*), que constantemente libera orientações para garantir a segurança dos alimentos [53]. Neste documento determina-se que o limite máximo aceitável é de 50 ppm, em partes edíveis do peixe. Esse valor foi determinado pois a histamina nem sempre se encontra homogeneamente distribuída, logo se uma porção possui 50 ppm outra parte pode possuir valores superiores. Este documento também determina que a amostragem contenha no mínimo dezoito (18) unidades por lote e se o lote possuir menos que essa quantidade de unidades, todas deverão ser analisadas.

1.11 Impacto das ABs em alimentos para os países

A intoxicação por histamina tem sua importância não só pela relevância em relação à Saúde Pública, uma vez que é uma das maiores causadoras de intoxicação por consumo de peixe e seus derivados, como sua presença pode trazer prejuízos econômicos para os países [22]. Como a análise de aminas biogénicas é usada como um indicador de qualidade em peixes, a presença de altas concentrações destes compostos nos alimentos e a ocorrência de casos de intoxicação em produtos de certo país pode comprometer a venda destes artigos alimentares para outros. O impacto no comércio internacional de peixe de um determinado país, que apresente inadequações, pode ser muito expressivo e a reparação desses danos pode ser complexo [12,30].

1.12 Espécies, géneros e famílias de peixes e sua relação com ABs

As famílias com maior quantidade de histidina estão listadas nas legislações de diferentes países e para elas existem um limite de histamina que pode estar presente nas amostras. Existe uma variação entre as famílias listadas em alguns regulamentos. Por exemplo, no Regulamento (CE) Nº 2073/2005 [43] são descritas as famílias: Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae e Scombresosidae, como as principais famílias, com maior quantidade de histidina na musculatura e, por conseguinte, aquelas que possuem maior probabilidade de acumularem altas concentrações de histamina. Já na Instrução Normativa nº 60, do Brasil [52], existem além destas, mais famílias descritas como de maior risco: Carangidae, Gempylidae e Istiophoridae, cujos integrantes são espécies encontradas na Europa e que são consumidos inclusive em Portugal, como o carapau (Trachurus trachurus) e carapau amarelo (Caranx rhonchus), pertencentes a família Carangidae [54]; peixe-espada-preto (*Nesiarchus nasutus*) da família Gempylidae [55] e espadarte-veleiro/veleiro (*Istiophorus albicans*) [56] e agulhão-branco/espadarte-branco (*Kajikia albida*) [57].

Os peixes escombróides como as espécies do género *Thunnus* (atuns e outros peixes), que possuem alto níveis de consumo em diferentes locais do mundo, possuem uma concentração de histidina livre elevada, podendo possuir cerca de 5000 a 20000 mg/kg. Por sua vez, os salmonídeos tendem a ter uma concentração muito menor deste aminoácido, geralmente menos que 1000 mg/kg. No salmão-do-Atlântico essa concentração se encontra entre 130 e 300 mg/kg [58].

Existem trabalhos que relatam a possibilidade do salmão (*Salmo salar*) e outras espécies da família Salmonidae, causarem quadros de intoxicação envolvendo histamina, mesmo que não sejam espécies pertencentes ao grupo dos escombróides e nem tenham altas concentrações de histidina livre na musculatura, precursora essencial para formação deste composto [21,31,59,60]. Como não pertencem às famílias com maior quantidade de histidina e que são abrangidas pelos regulamentos e demais legislações nos países (como famílias Clupeidae, Scombridae e Engraulidae), os casos de intoxicação por histamina causados por consumo de salmonídeos relatados podem ser inferiores ao real número existente.

Existem outras espécies, que não pertencem as famílias com maior concentração de histidina presentes nas legislações, que podem ter uma alta produção de outras aminas biogénicas, que por sua vez podem influenciar e muito a toxicidade de outras aminas que podem provocar danos à saúde humana, como a histamina, além de poderem causar danos a longo prazo. Por exemplo, a cadaverina e a putrescina não estão associadas a casos de intoxicação, mas podem influenciar a toxicidade da histamina, pois comprometer o bom funcionamento do sistema de detoxificação do organismo humano e pode levar a formação de nitrosaminas, que são substâncias carcinogênicas [4,33]. Além do salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*), existem relatos na literatura sobre a pescada europeia (*Merluccius merluccius*), sua produção de aminas biogénicas e como estas podem afetar a saúde humana.

No RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) os casos relacionados com *Salmo salar* e *Merluccius merluccius* estão relacionados com contaminação bacteriana, como *Listeria monocytogenes* (em salmão), presença de parasitos, problemas na cadeia do frio, entre outros. Além disso, muitas vezes é apenas utilizado os nomes-comuns dos peixes, sem o nome científico do salmão-do-Atlântico e da pescada europeia ou com o nome de outras espécies que algumas vezes são até de outros géneros. De modo geral, não foi possível encontrar nenhuma notificação que identificasse as duas espécies de peixes utilizadas neste trabalho em casos envolvendo a histamina, seja pela sua presença em alimentos analisados ou pela investigação de casos em que existiu intoxicação.

Como estas duas espécies pertencem a famílias que não são consideradas como aquelas que necessitam maior atenção em relação a histamina, de acordo com as legislações, é possível que exista uma defasagem do real número de casos em que estas espécies estejam envolvidas com altas concentrações de histamina e/ou casos envolvendo histaminose (presença de outras aminas biogénicas podem influenciar na toxicidade da histamina).

2. Salicórnia (*Salicornia ramosissima*)

As plantas halófitas, isto é, espécies vegetais que que possuem alta tolerância a altos níveis de salinidade e que conseguem sobreviver em regiões marítimas/oceânicas, onde outros tipos de plantas podem não conseguir se desenvolver, também podem ser utilizadas na alimentação humana, alimentação animal, como aditivo na produção de sabão e até como medicamentos [61]. Por conseguirem tolerar locais com alta salinidade, tendem a acumular grandes quantidades de minerais, o que faz com que muitas dessas plantas possuam um sabor salgado, o que pode ser vantajoso do ponto de vista sensorial [62].

2.1 Taxonomia e características morfológicas

A espécie utilizada nesta pesquisa foi a *Salicornia ramosíssima* J. Woods, pertencente à família Chenopodiaceae, sendo a única espécie deste género encontrada em Portugal. Essa espécie, assim como outras deste género, possui diferentes nomes populares como aspargo do mar, erva-salada e *glasswort.* Outras espécies de *Salicornia* spp., que tem certa importância e uso em outros países, são: *Salicornia bigelovii*, *Salicornia maritima*, *Salicornia herbacea* e *Salicornia europaea* [62].

A *S. ramosíssima* é caracterizada por ser uma planta com folhas pequenas, de caules suculentos, é hermafrodita e tem flores e frutos nos meses de maio até novembro, podendo apresentar variação na coloração de acordo com a época do ano. No entanto, possui alta taxa de polimorfismo, ou seja, pode apresentar variação considerável entre indivíduos da mesma espécie, o que acaba por dificultar as espécies do género [63]. No verão apresenta tonalidade verde e concentração moderada de sal. Já no outono apresentam coloração arroxeada, com altas concentrações de sal, já se encontrando maduras e prontas para serem colhidas [62]. Na Figura 2 é possível visualizar um espécime desta planta já apresentando coloração característica do outono (arroxeada). Já na Figura 3 observa-se espécimes apresentando coloração característica do verão.



Figura 2 - *Salicornia ramosissima* com coloração arroxeada

Fonte: Imagem da espécie Salicornia ramosissima por Flora de Galicia do Jardim Botânico UTAD, Flora Digital de Portugal.



Figura 3 – Salicornia ramosissima com coloração esverdeada

Fonte: Imagem da espécie Salicornia ramosissima por Marisa Ribeirinho do Jardim Botânico UTAD, Flora Digital de Portugal.

Esse vegetal pode ser coletado, após crescer naturalmente em regiões litorâneas. Entretanto, pode ser cultivado, sendo uma cultura que não apresenta grandes dificuldades, já que é uma planta resistente e que aceita irrigação com água salobra ou salgada, além de sobreviver em solos com alta concentração de sal e ser resistente a doenças [63,64]. Sua capacidade de sobreviver a condições desfavoráveis à outros vegetais se deve ao fato desta espécie produzir compostos que possuem funções antioxidantes, osmoprotetoras, entre outras. É rica em fibras, minerais, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Dentre estes compostos, alguns já foram identificados e sua ação, que pode ser benéfica a saúde humana, foi comprovada por pesquisas, principalmente na prevenção de cancro e doenças cardiovasculares [65].

2.2 Distribuição geográfica

Por ser altamente adaptável a condições extremas como altas concentrações de sais e regiões alagadas, esse género pode ser encontrado em diferentes locais do mundo. Logo sua distribuição geográfica inclui áreas com climas distintos, desde subtropical, temperados até regiões com vegetação boreal [62]. Sendo encontrada em diferentes continentes, desde Europa, Ásia e África, até às Américas. Na Europa pode ser encontrada deste regiões árticas até áreas próximas ao Mediterrâneo, incluindo a Península Ibérica [64]. Na Figura 4 é possível visualizar distribuição geográfica desta espécie em Portugal Continental, sendo notável sua distribuição por grande parte do litoral português, desde o Norte até o Algarve, e chegando até algumas regiões centrais, principalmente no Norte e Centro. Essa presença no interior do território pode ser pela presença desta espécie em outros corpos d'água presentes nestas regiões.



Figura 4 - Distribuição geográfica da *Salicornia ramosissima* em Portugal Continental

Fonte: Adaptado de Jardim Botânico UTAD. Disponível em: https://jd.utad.pt/especie/Salicornia_ramosissima. Acesso 12.09.2022

2.3 Cultivo em Portugal

Em Portugal existe cultivo desta espécie em diferentes locais como no estuário do Rio Aveiro. Esta atividade econômica tem ganhado cada vez mais espaço devido a oportunidade de aproveitar as possibilidades do cultivo de uma planta que tem valor considerável na gastronomia, além da possibilidade de ser associado a outras atividades como salicultura, o que pode representar um aumento na fonte de renda dos produtores [62]. Entretanto, seu cultivo ainda não está totalmente disseminado no território português e ainda é considerada um vegetal indesejável, sendo muitas vezes retirada do seu local de crescimento sem que haja seu aproveitamento [63].

2.4 Consumo e composição

Pode ser consumida em saladas quando fresca e como condimento quando seca e macerada. O seu uso após secagem é um desenvolvimento mais recente e é produzida após o vegetal ser seco e macerado até formar um pó, denominado sal de salicórnia, devido a sua coloração e sabor salgado. Este sal possui diferentes minerais incluindo sódio e magnésio, além de compostos importantes encontrados nesta espécie como compostos fenólicos, antioxidantes, flavonóides, entre outros. Por ter certas substâncias que tem capacidade de realçar sabores do alimento, como ácidos orgânicos, seu uso pode trazer ainda mais uma vantagem do ponto de vista sensorial [62].

De modo geral, a *Salicornia ramosissima* contém mais de 57 compostos já descritos na literatura, dentre álcoois de cadeia longa, esteróis, ácidos carboxílicos, e outros, que podem ter funções benéficas tanto do ponto de vista da saúde humana quanto em relação aos processamentos da indústria alimentar. Esses compostos estão presentes em concentrações distintas e aqueles que estão em maior quantidade são os álcoois de cadeia longa e os ácidos gordos saturados. Dentre estes tipos de álcoois aquele mais abundante é o tetracosanol e, dos diversos ácidos gordos, o mais

encontrado é o ácido palmítico. Esta espécie também possui ácidos graxos polinsaturados e o mais encontrado é o ácido linoleico (ômega 6) [61].

É importante ressaltar que estes compostos estão presentes na planta *in natura*. Porém, quando esta passa por processo de secagem para ser transformada em sal, o seu perfil nutricional e a presença e/ou concentração destes compostos fica alterada. Diferentes processos de secagem determinam diferenças nos compostos finais. Por exemplo, de acordo com Oliveira-Alves, S, *et al* [65] a secagem no forno é o processamento que mais modifica os perfis nutricionais, fitoquímicos e atividades antioxidantes. Sendo este tipo de secagem o mais utilizado na indústria alimentar, principalmente pela sua simplicidade e custo. No entanto, esse processo não compromete a capacidade desse sal de inibir a proliferação de microrganismos, uma vez que os componentes responsáveis por essa ação não são destruídos durante a secagem. Além disso outros compostos que não alterados durante o processo de secagem ou cuja mudança seja menor podem ter funções desejáveis na produção de alimentos. Para isso mais estudos são necessários.

2.5 Teor de sódio

A quantidade de sódio pode variar dependendo do espécime, podendo ser devido a uma diferenciação individual, de população, de acordo com a época do ano, entre outros fatores [62]. Por isso, para que a substituição seja feita de maneira adequada e a proporção de sódio seja similar é preciso determinar a concentração de sódio no sal de salicórnia utilizado. Uma das metodologias mais utilizadas para quantificar o sódio é pela fotometria de chama, que foi o método utilizado neste trabalho. A partir desses resultados é possível realizar uma substituição nas amostras a serem analisadas no ensaio proposto.

2.6 Substituto do sal de cozinha

O uso do cloreto de sódio (sal de cozinha) para a conservação dos alimentos é uma das técnicas mais antigas para a preservação dos géneros alimentícios, incluindo os peixes e seus derivados. O sal leva a uma diminuição da atividade de água do alimento, o que torna a água livre menos disponível para a utilização pelos microrganismos e dificulta a sua chegada no interior, centro geométrico da matriz alimentícia em que se encontra. Muitas bactérias são inibidas pela diminuição da atividade de água, seja no seu crescimento populacional quanto nas suas atividades enzimáticas. Para algumas espécies a presença do cloreto de sódio pode até ser deletéria, logo o uso do sal de cozinha pode auxiliar na preservação dos alimentos, pela sua ação em microrganismos deteriorantes, quanto na segurança dos alimentos, pois pode agir em microrganismos patogénicos. Além disso, o sal tem uma função muito importante que influencia as características sensoriais do produto e até a sua aceitação por parte do consumidor [38]. Pelo seu uso tradicional e importância tanto do ponto de vista sensorial, quanto tecnológico e da segurança dos alimentos, neste trabalho foi utilizado um controlo com adição de sal marinho e foi feito a comparação entre estas amostras e aquelas com adição do sal de salicórnia, que além de sódio possui outros compostos inerentes a espécie de vegetal do qual tem origem. Também foram comparadas as amostras do controlo com sal com as amostras sem qualquer aditivo, sendo possível visualizar qual o efeito do uso do cloreto de sódio na formação das aminas biogénicas.

A possibilidade de substituição do cloreto de sódio por sal de salicórnia já vem sendo estudados em outros tipos de alimentos como na produção de pão. O uso do sal oriundo desta planta visa a diminuição do consumo de sódio pela população, uma vez que este produto possui uma concentração de sódio muito menor. Esse decréscimo é importante uma vez que o consumo de sódio em muitos países está acima do que é recomendado pela OMS/WHO [66] que determina que a ingestão diária não passe de 5 g de cloreto de sódio ou 2 g de sódio para a população em geral [67]. A necessidade da redução do sódio na alimentação levou à procura de alternativas para substituição deste composto, sendo uma delas o sal de salicórnia.

A redução da quantidade de sódio ingerido é muito importante uma vez que o consumo em concentrações excessivas está relacionado a problemas cardiovasculares como aumento da pressão sanguínea, derrames, infartos e outras patologias [66]. Em Portugal, o consumo de sal é de cerca de mais de 10 g por dia, conforme pesquisa da Sociedade Portuguesa de Hipertensão [68] e dados da DGS (Direção Geral da Saúde) [69], muito acima do recomendado pela WHO. Deste modo, alternativas ao consumo do sal de cozinha e outras inovações relacionadas a este problema tem surgido ao longo dos anos, não somente na Europa como em todo o mundo.

Existem estudos que analisam a substituição do sal de cozinha (cloreto de sódio) pelo sal de salicórnia em diferentes alimentos incluindo sopas, preparados de carne de porco e outras carnes [62], preparados de peixe [70], e outros alimentos. De modo geral os trabalhos relatam uma aceitação por parte dos consumidores no uso deste condimento. Como possui vários compostos, diferentemente do sal de cozinha que consiste majoritariamente em cloreto de sódio, o sal de salicórnia não consegue substituí-lo na mesma proporção. Para conseguir o mesmo nível do sabor salgado no alimento é necessário utilizar uma quantidade maior do sal com *Salicornia ramosissima* [62]. Para que a troca seja eficaz nutricionalmente (com a redução da quantidade de sódio adicionado ao alimento), sensorialmente (de modo que o consumidor aceite o alimento pois este apresenta características sensoriais desejáveis), tecnologicamente (o substituto precisa exercer as funções desempenhadas pelo cloreto de sódio como na conservação do alimento) e que possa trazer outras vantagens como prevenção na formação de compostos indesejados, ainda são necessários mais estudos e análises.

3. Salmão-do-Atlântico e Pescada Europeia

Durante o planejamento desta pesquisa diferentes peixes foram considerados para serem a matriz alimentar das análises. Diferentes fatores foram considerados para fazer essa escolha: os hábitos alimentares da população portuguesa; a facilidade de compra do peixe; a concentração lipídica de cada espécie; o tamanho dos adultos e rendimento dos filés; se pertenciam as espécies identificadas como de risco para formação de histamina pela legislação europeia e se poderiam ser transformados em um novo produto.

Tanto o salmão-do-Atlântico quanto a pescada europeia são facilmente encontradas em Portugal, sendo apresentadas de diferentes modos: filetes, postas, em salgados como folhados e em diferentes preparações como hambúrguer (salmão) e panados (pescada). Essas espécies apresentam espécimes adultos cujo tamanho os torna adequado para filetagem e permite que sejam utilizados em vários tipos de produtos. A concentração lipídica nestas duas espécies difere bastante. De acordo com a Tabela da Composição dos Alimentos, do INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge) [71], a pescada europeia crua possui, em média, 0,8 g de lipídeos em 100 g de alimento, já o salmão cru apresenta, em média, cerca de 21,9 g de lipídeos em 100 g de alimento. Além disso, possuem diferenças na composição da sua musculatura, apresentando colorações distintas, com a pescada sendo considerada uma espécie de musculatura branca e o salmão sendo considerado um peixe que possui musculatura escura/vermelha.

Em relação a legislação, essas duas espécies não pertencem a nenhuma das famílias identificadas na legislação europeia como pertencentes ao grupo de alto risco para formação de histamina (Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae e Scombresosidae), no entanto existem trabalhos que relatam casos de histaminose após consumo de salmonídeos [58]. Logo ainda há mais estudos que precisam ser feitos para analisar o risco destas outras espécies para formação de ABs.

A facilidade no acesso a peixes frescos, a aceitação destas espécies pelos consumidores e suas características individuais desejáveis foram os fatores determinantes na escolha destas duas espécies.

3.1 Taxonomia e características gerais

3.1.1 Salmão-do-Atlântico

O salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) pertence à família Salmonidae, que é uma das famílias pertencente ao grupo dos teleósteos, isto é, dos peixes ósseos. Esta família é a única dentro da ordem dos Salmoniformes. Muitas das espécies dessa família são marinhas, mas se reproduzem em locais de água doce. Sua alimentação consiste em crustáceos, larvas, peixes pequenos, insetos e outros. O salmão-do-Atlântico pertence ainda a subfamília Salmoninae e ao género *Salmo* [58].

Reino Animalia
Filo Chordata
Subfilo Vertebrata
Classe Actinopteri
Subclasse Teleostei
Ordem Salmoniformes
Família Salmonidae
Subfamília Salmoninae
Género *Salmo*
Espécie *Salmo salar*

Taxonomia do Salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*).

Fonte: [72]

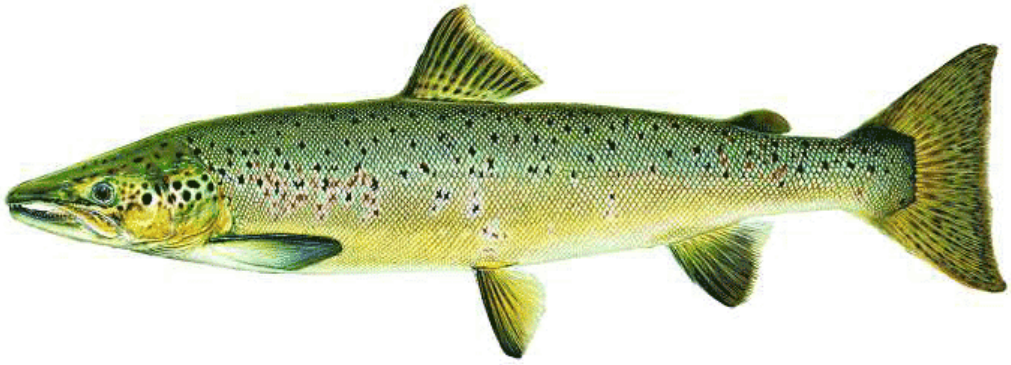


Figura 5 - Salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*)

Fonte: FAO - Fisheries and Aquaculture - Cultured Aquatic Species - Salmo salar (fao.org). Disponível em: https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/salmo_salar/en

Dentre os salmonídeos, uma das espécies mais consumidas em todo o mundo é o salmão-do-Atlântico. O salmão selvagem pode ser encontrado na região norte do Oceano Atlântico, desde a América do Norte, passando pelas ilhas como Reino Unido e Islândia, até a Europa, desde Portugal até a Rússia. Vivem em água salgada até a maturidade sexual, quando se dirigem a locais de água doce, geralmente subindo os rios, na direção contrária da corrente. Nesses locais ocorre a reprodução com a desova. Depois de eclodir, continuam vivendo nestes locais por cerca de 2 a 5 anos, quando passam a migrar para regiões de água salgada, principalmente para locais mais profundos [73]. Sua maturidade sexual leva de 3 a 7 anos, já em água oceânicas, e lá ficam por pelo menos um ano quando voltam ao local de nascimento para reprodução e os adultos possuem, cerca de, 73 cm [74].

Essa espécie possui corpo fusiforme, corpo de coloração acinzentada com pontos mais escuros dispersos, geralmente acima da linha lateral. Possui uma barbatana adiposa que se encontra no dorso, entre as barbatanas dorsal e caudal [54]. Na Figura 5 é possível visualizar algumas destas características morfológicas da espécie.

Também pode ser criado em cativeiro e sua produção é uma das mais importantes dentre as espécies de salmonídeos [58]. Quando jovens, ainda nos rios, consomem insetos e peixes pequenos e, quando chegam nas regiões oceânicas passam a se alimentar de peixes maiores como arenque, e outros animais marinhos [73].

3.1.2 Pescada europeia

A espécie *Merluccius merluccius* pode ser denominada como pescada, pescada-branca ou marmota-branca, em Portugal [75]. É um peixe marinho e sua distribuição vai desde a região norte do Oceano Atlântico, compreendendo parte da costa da Rússia, passando pela Noruega até a Islândia, e vai até o Mar Mediterrâneo, chegando na costa do extremo norte do continente africano e podendo chegar até o Mar Negro. Quando chega a maturidade sexual pode medir entre 20 e 70 cm e geralmente são encontrados entre 70 e 400 metros de profundidade, mas podem ultrapassar os 1000 metros [76].

Reino Animalia
Filo Chordata
Subfilo Vertebrata
Classe Actinopteri
Subclasse Teleostei
Ordem Gadiformes
Família Merluccidae
Subfamília Merlucciinae
Género *Merluccius*
Espécie *Merluccius merluccius*

Taxonomia da Pescada europeia (*Merluccius merluccius*).

Fonte: [77]

Os jovens se alimentam de crustáceos, já os adultos consomem majoritariamente peixes (anchovas, sardinhas, pescadas menores, entre outros) e lulas [76]. Diferentemente do salmão, cuja maioria da população só se reproduz uma vez, naturalmente, a pescada não possui essa limitação, possui uma fecundidade indeterminada.

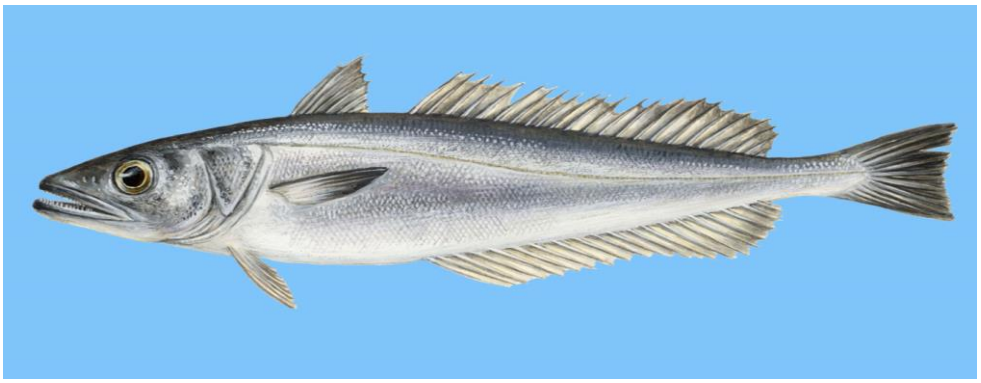


Figura 6 - Pescada europeia (*Merluccius merluccius*)

Fonte: https://guiapescado.wwf.pt/species/pescada/. Acesso em: 13.09.2022

Possui um corpo longo e estreito, com a porção dorsal da cabeça sendo achatada. Possui coloração acinzentada ao longo de todo o corpo, exceto na porção ventral onde é mais clara, podendo ser considerado branco. Tem uma estrutura em forma de "V" no topo da cabeça. Possui boca bem desenvolvida, com a maxila inferior levemente maior que a superior [54]. Na Figura 6 é possível identificar algumas das suas características morfológicas.

3.2 Produção de aminas biogénicas

3.2.1 Salmão-do-Atlântico

No artigo de Pawul-Gruba [78], os autores relatam a presença de histamina em duas das três amostras analisadas de salmão (*Salmo salar*) fresco em concentrações inferiores ao limite máximo. No entanto, essa concentração pode variar devido a diferentes fatores como diferenças entre espécimes; época do ano; diferenças na microbiota natural do animal, entre outros. Além disso, a toxicidade da histamina presente vai depender da concentração de outras aminas presentes como cadaverina e putrescina e das condições individuais dos consumidores.

No trabalho de Dondero, *et al* [79] os autores realizaram testes em salmão defumado, com diferentes temperaturas, sem que ultrapassassem vinte e oito graus

Celsius, e sem qualquer procedimento para inativar as enzimas responsáveis pela produção de aminas biogénicas. Os resultados mostraram que a cadaverina é a amina que pode chegar a concentrações muito altas em pouco tempo, enquanto a histamina permanece a níveis mais baixos, porém como a cadaverina tem a capacidade de potencializar os efeitos tóxicos da histamina, a ingestão de um peixe com altos níveis de cadaverina poderá causar quadros de intoxicação por histamina, principalmente nos indivíduos mais suscetíveis, como aqueles com maior sensibilidade a histamina; aqueles que possuem algum tipo de deficiência enzimática no sistema de detoxificação, seja genética ou por uso de certos medicamentos; pelo consumo de álcool, entre outros.

No artigo de Emborg, *et al* [80] os autores relatam que houve produção de aminas biogénicas (agmatina, cadaverina, histamina e tiramina) em salmão (*Salmo salar*) defumado a 5º C, principalmente devido a ação de uma espécie bacteriana: *Photobacterium phosphoreum*. Outros artigos da literatura citam essa bactéria como uma das que podem formar aminas biogénicas, devido ao fato de serem descarboxilase positivas [2].

No trabalho de Di Toro, *et al* [59], os autores realizaram análises em filetes de *Salmo salar* frescos, que haviam sido submetidos a tratamento com vinagre e que foram armazenados em atmosfera modificada, de modo a analisar se o uso desta substância prevenia o desenvolvimento de aminas biogénicas. Após 10 dias foi possível visualizar a formação das ABs tanto nas amostras desenvolvidas quanto no grupo controlo, que não recebeu o tratamento. Neste último notou-se que foi a histamina que alcançou os maiores valores (59 mg/kg) e as outras aminas que também foram encontradas (2-feniletilamina, putrescina, cadaverina e tiramina) estavam em concentrações variáveis. Sabe-se que em filetes inteiros a produção será menor se comparados com produtos que foram triturados, logo existe a possibilidade de que em produtos em que esse processo é realizado, como é o caso dos hambúrgueres, haja uma maior formação destas aminas.

Na revisão de literatura desenvolvida pela FAO, juntamente com a OMS [58], existem relatos, inclusive de outros trabalhos científicos, que trazem informações sobre casos suspeitos de intoxicação por histamina relacionados com consumo de salmão. Mesmo quando a histamina se encontrava em baixas concentrações no peixe suspeito, ainda havia a suspeita da ocorrência deste tipo de intoxicação. Isto pode

acontecer devido a presença de outras substâncias, incluindo outras aminas biogénicas como cadaverina e putrescina, que potencializam a ação da histamina. Entretanto, muitos dados não foram devidamente publicados ou não foram adequadamente coletados, logo as informações não puderam ser totalmente analisadas, ou seja, esses dados acabam não sendo utilizados nos estudos epidemiológicos. Outro motivo desta defasagem nas informações pode ser devido ao fato da família Salmonidae não pertencer ao grupo das famílias ricas em histidina, e que se encontram determinadas nas legislações dos países. Por não serem o foco principal destes regulamentos, esses peixes, incluindo o salmão-do-Atlântico, podem, erroneamente, não serem associados aos casos de intoxicação, além de haver a possibilidade de existir uma falta de vigilância nestas espécies. Logo, conclui-se que ocorre uma subnotificação dos casos de intoxicação por histamina causados pelo consumo de salmonídeos.

A espécie *Salmo salar* tem capacidade de produzir histamina, fato que já foi observada em alguns estudos, realizados em diferentes países, mas somente quando as bactérias descarboxilase positivas estão presentes, o que nem sempre ocorre. Além disso, pode demorar mais tempo para que se forme uma concentração de histamina capaz de produzir uma intoxicação, de modo que quando isso ocorre o peixe já se encontra em estado avançado de deterioração e não é mais aceito pelo consumidor. No entanto, se o peixe passar por um processamento que aumente o seu período de validade, existe chances de haver produção de histamina e/ou outras aminas que propiciem o desenvolvimento deste tipo de enfermidade. Neste mesmo trabalho da FAO/OMS [58] existe o relato de um estudo onde foram identificadas altas concentrações de histamina em salmão defumado. De modo geral, esta publicação conclui que os dados epidemiológicos existentes ainda são insuficientes para determinar se os salmonídeos realmente podem causar casos de histaminose e mais estudos precisam ser realizados.

3.2.2 Pescada europeia

A pescada, logo após a pesca, possui uma certa quantidade de espermina e espermidina (poliaminas), pois estas aminas possuem ação fisiológica nestes animais.

Sua concentração pode variar por questões individuais, época do ano, maturidade sexual, entre outros e essas poliaminas podem ser utilizadas pelos microrganismos como fontes de nitrogênio e/ou carbono [8]. Também pode existir uma pequena quantidade de putrescina, já que esta amina pode dar origem às poliaminas, e, à medida que o processo de deterioração decorre, a sua concentração também tende a aumentar [24].

A agmatina pode estar presente e sua concentração tende a elevar-se durante o período de armazenamento deste peixe. A cadaverina pode estar presente no peixe fresco em pequenas quantidades, mas tende a aumentar consideravelmente durante o armazenamento da pescada, principalmente quando esta se encontra em temperatura de refrigeração [24]. Como a cadaverina e agmatina estão presentes em baixas concentrações na pescada fresca, estas duas aminas podem ser utilizadas como índice de frescor [17]. Outros autores indicam apenas a cadaverina como indicador de frescor para pescada [8]. A histamina e tiramina não estão presentes no peixe fresco, porém, de acordo com o trabalho de Baixas-Nogueras, *et al* [24], depois de cerca de seis dias em refrigeração já há presença dessas aminas biogénicas. Neste mesmo artigo os autores não detetaram triptamina nem feniletilamina em pescada.

No trabalho de Baixas-Nogueras, *et al* [8], os autores analisaram o desenvolvimento de aminas biogénicas em pescada (*Merluccius merluccius*). Através da pesquisa concluíram que a putrescina e a cadaverina foram as aminas com maior acúmulo, enquanto outras aminas, como histamina e tiramina, apresentaram concentração menor, em peixes armazenados em gelo. Todas as amostras frescas apresentaram concentrações relevantes de espermina e espermidina, o que é esperado, uma vez que essas aminas possuem função fisiológicas nos peixes. A putrescina pode ser encontrada também no peixe fresco, mas em menores concentrações, que tendem a aumentar durante o período de armazenamento, devido a atividade bacteriana. Em relação à cadaverina, os autores relatam que a pescada fresca não apresentou ou possuía muito pouco, e que sua concentração tende a aumentar durante o armazenamento, por isso poderia ser considerada como um indicador específico para esta espécie de peixe, principalmente em temperaturas de resfriamento. É preciso ressaltar que a quantidade de cadaverina pode variar entre espécimes devido a variação da microbiota normal de cada indivíduo, que acaba por influenciar a formação destes compostos. A agmatina pode ou não estar presente no

início do período de armazenamento, porém pode aumentar depois, dependendo da época do ano. As concentrações de histamina na pescada foram muito baixas, porém as concentrações mais altas de outras aminas como cadaverina e putrescina, que potencializam a ação deste composto pode ser relevante. Com relação a tiramina os autores indicaram uma concentração muito baixa desta amina. Outra sugestão feita é a utilização de um índice de aminas biogénicas, que leva em consideração as concentrações de cadaverina, putrescina, tiramina e histamina como uma boa alternativa para o controlo de qualidade na pescada.

No artigo de Baixas-Nogueras, *et al* [81], os autores relatam a presença de aminas biogénicas em pescada (*Merluccius merluccius*), tanto fresca quanto congelada. Logo após a pesca as amostras possuíam níveis razoáveis de espermidina e espermina (poliaminas), devido ao seu papel na fisiologia destes animais. Após alguns dias de armazenamento foi descrito que a cadaverina foi a amina com maior concentração, seguido da histamina, putrescina e tiramina. Já as poliaminas mantiveram valores praticamente constantes durante os ensaios. Os autores explicam que as aminas biogénicas apresentaram concentrações maiores nos peixes frescos comparativamente aos peixes congelados. Esta observação pode ser explicada pelo fato da proliferação bacteriana e, por conseguinte, a possibilidade de formação destas aminas, serem maiores nos peixes frescos. Os peixes congelados são mantidos em baixas temperaturas e isso acaba por dificultar a multiplicação destes microrganismos, além de dificultar a realização de certas atividades, inclusive a ação de enzimas como as descarboxilases; logo existe uma menor produção de aminas biogénicas.

No artigo de Ruiz-Capillas e Moral [82], os autores realizaram testes para determinar a concentração de aminas biogénicas em pescada (*Merluccius merluccius*) ao longo de um período de armazenamento em gelo. Relataram que após 25 dias de armazenagem houve alterações nos níveis destes compostos. Assim como outros artigos relatam, foram encontrados níveis identificáveis de espermidina e putrescina nos peixes logo após a pesca, o que é considerado normal uma vez que possuem funções fisiológicas. Porém, suas concentrações apresentam tendências distintas durante o armazenamento: a espermidina tende a ficar constante ou varia um pouco e a putrescina tende a aumentar à medida que o processo de deterioração avança. No final do ensaio os autores relatam que todas as aminas biogénicas analisadas (cadaverina, putrescina, agmatina, tiramina e histamina) apresentaram aumento nas

concentrações e somente a espermidina se manteve praticamente constante. No final do período a cadaverina e agmatina foram as aminas mais abundantes, respetivamente, enquanto a tiramina e histamina foram encontradas em baixas quantidades.

A pescada europeia (*Merluccius merluccius*) tende a ter certos níveis de putrescina e espermidina logo após a pesca, já que estas aminas possuem algumas funções fisiológicas. No entanto a primeira tende a aumentar, atingindo picos de produção durante o armazenamento, enquanto a segunda tende a se manter constante durante este período. Já a histamina e tiramina são encontrados, geralmente, em poucas quantidades, enquanto a cadaverina, tende a se apresentar em baixas concentrações no início e aumenta com o passar do tempo de armazenamento, podendo chegar a ser a amina biogénica mais abundante. Por isso há a sugestão para que esta seja utilizada como parâmetro do controle de qualidade nesta espécie de peixe, sendo que alguns autores incluem a agmatina como possuindo esse mesmo potencial. A agmatina também pode chegar a níveis mais altos em poucos dias de armazenamento, até mesmo antes do alimento apresentar aspetos sensoriais inerentes a deterioração [18].

4. Consumo de peixe

4.1 Recomendação da OMS e outras agências de saúde

A EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar) [83] e WHO/OMS (Organização Mundial da Saúde) recomendam que o consumo de pescado seja de 1 a 2 refeições por semana, pois é um alimento rico em vitaminas (A, D e do complexo B), minerais (sódio, ferro, potássio, cobre, enxofre, iodo, entre outros) [84], ácidos gordos polinsaturados (ácido linolénico/ômega 3 e ácido linoleico/ômega 6), além de ser uma fonte alimentar rica em proteínas e aminoácidos livres. O peixe também possui um

menor nível de colesterol, o que pode ser vantajoso para certos grupos que necessitam de uma dieta com menores índices dessa substância. [13]

De modo geral existe um consenso entre as agências de saúde mundiais de que o consumo de pescado seja frequente devido aos benefícios que pode propiciar para os consumidores. Existem estudos que demonstram as vantagens do consumo do pescado como: controlo dos níveis de triglicerídeos no sangue, o que pode influenciar o desenvolvimento de certas doenças cardiovasculares como aterosclerose; prevenção de diferentes tipos de cancro; controlo da quantidade de colesterol ingerido na dieta, já que a carne dos peixes tendem a ter uma menor concentração deste lipídeo; redução dos riscos de doenças inflamatórias e depressão; presença de compostos que podem atuar na manutenção da integridade de membranas celulares e auxílio no desenvolvimento de Sistema Nervoso Central dos fetos, quando consumidos por mulheres grávidas [83].

Para as populações onde o consumo seja abaixo do recomendado há a sugestão do seu aumento. Entretanto, existem riscos envolvidos nesse consumo, que envolvem diferentes tipos de contaminantes desde a presença de metais traços até a existência de aminas biogénicas neste tipo de alimento [30].

4.2 Limitações do consumo

O consumo de peixe pode trazer vários benefícios à saúde humana, mas também possui riscos. Os peixes são altamente perecíveis e tendem a se deteriorar muito mais rápido que outros tipos de proteína animal como as carnes suína ou bovina. Isto se deve ao fato dos peixes possuírem certas características que favorecem o desenvolvimento de microrganismos. Possuem, naturalmente, uma maior humidade e pH próximo da neutralidade, o que favorece o desenvolvimento de diversos microrganismos [59]. Além disso, possuem pouco tecido conjuntivo, o que favorece a deterioração, já que facilita a ação de degradação dos microrganismos [11].

A humidade na musculatura pode variar entre 60 até 85%, dependendo da espécie, o que influencia a perecibilidade de cada tipo de peixe. A maioria dos peixes é rico em aminoácidos de alto valor biológico, possuindo concentrações ideais de

aminoácidos essenciais como a lisina. A quantidade de proteínas varia entre 15 e 25% dependendo do tipo de peixe, porém, de modo geral, os peixes possuem proteínas de fácil digestibilidade, com cerca de 90-95%, o que pode ser um fator muito importante a ser considerado na dieta de alguns grupos da população [84]. Por exemplo, pessoas que necessitam de altas doses de proteína, mas que tem certa dificuldade em digerir outros tipos de proteína animal. Porém, isso significa também uma maior suscetibilidade à ação bacteriana, que pode provocar deterioração e formação de compostos indesejáveis.

Existem populações cujo acesso a peixes para sua alimentação é restrito seja por questões financeiras quanto por condições climáticas/geográficas. Porém, ainda que exista a possibilidade deste alimento fazer parte da dieta, as condições em que este se encontra e, por conseguinte, a qualidade microbiológica e físico-química, pode ser muito variada. Uma vez que esta matriz alimentícia possui características próprias (humidade elevada, altas concentrações de determinados aminoácidos, proteínas de fácil digestibilidade, pouco tecido conjuntivo, entre outros) que possibilitam o desenvolvimento de microrganismos responsáveis pela deterioração e produção de compostos indesejados que podem causar patologias em humanos, é preciso uma atenção maior de modo a garantir a segurança daqueles que a consomem.

Por isso é preciso continuar as pesquisas para desenvolver novas metodologias para deteção dos compostos indesejados; novas formulações de derivados de peixe, que podem conter aditivos cujo uso ofereça benefícios para a segurança alimentar; determinação do nível de toxicidade das substâncias que são formadas ao longo do tempo no alimento ou após processamento, entre outros.

5. Objetivos do trabalho

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o uso da salicórnia (*Salicornia ramosíssima*) como condimento na formulação de hambúrgueres de peixe, leva a uma inibição na formação de aminas biogénicas, desde a sua produção até o momento do consumo, aumentando assim o tempo de prateleira do produto (prazo de validade). Foram utilizadas duas espécies de peixe, separadamente, que possuem diferentes concentrações de lipídeos (*Salmo salar* e *Merluccius merluccius*) [72] e foi realizado um ensaio para verificar em qual espécie a adição de sal de salicórnia leva a um efeito de inibição na formação destes compostos.

A escolha pela análise de aminas biogénicas em hambúrgueres de peixe se deu porque para preparação deste tipo de alimento deve ser realizada moagem e mistura de todas as partes do peixe e dos ingredientes, se estiverem presentes. Assim é possível ter uma mistura homogênea, que permitirá a obtenção de resultados mais fidedignos. Além disso, o alimento triturado possui uma maior superfície de contato com o ar e entre os componentes do alimento e a microbiota presente, o que facilita o desenvolvimento de microrganismos na matriz alimentar. Logo, se houvesse condições de desenvolvimentos de bactérias e, por conseguinte, de aminas biogénicas, nas amostras, essas ocorreriam com maior facilidade auxiliando na avaliação dos resultados dos ensaios. Assim a eficácia do sal de salicórnia proteger o alimento da produção de ABs seria mais facilmente percebido. Além disso, como foram feitos dois tipos de controlo: um sem adição de ingredientes e outro apenas com adição de sal marinho, foi pensado na possibilidade de se comparar a eficácia do uso de sal de salicórnia, em comparação com o sal tradicionalmente adicionado a preparados à base de peixe, na prevenção da produção destas aminas.

A escolha do uso da salicórnia ocorreu por diferentes motivos: pelo crescente uso desta espécie em diferentes preparações culinárias, seja pela sua capacidade de substituição do sal tradicional seja por possuir outras funções, logo possuindo um interesse por parte da população; pelo aumento do cultivo e/ou aproveitamento desta planta, tanto pelos produtores quanto pelas pessoas no geral e pelo fato desta espécie ser amplamente distribuída em Portugal, sendo encontrada facilmente em todo o território continental.

6. Materiais e métodos

6.1 Reagentes e outros materiais

A histamina (97%), cadaverina (≥ 97%), agmatina (99%), putrescina (≥98,5%), tiramina (≥ 98%), cloreto de dansilo (Dns-Cl) e o padrão interno (1,7-diaminoheptano) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A 2-feniletilamina (≥ 99%) foi adquirida de Merck (Darmstadt,Alemanha). A triptamina (99%) foi obtida de Sigma Chemichal Company (Saint Louis, MO, USA). O acetonitrilo de pureza HPLC (≥ 99,9%) utilizado foi do fabricante Honeywell/ Riedel-de Haën™ (Seetze, Alemanha). Água ultrapura foi obtida utilizando sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Os demais reagentes eram de grau analítico e foram: ácido clorídrico (HCl) obtido de VWR™ (Rosny-sous-Bois, França); ácido tricloroacético (TCA) a 5% adquirido de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA); hidróxido de sódio (NaOH) adquirido de Fisher Chemical (Geel, Bélgica); carbonato de sódio (Na_2CO_3) adquirido de Merck (Darmstadt, Alemanha) em solução saturada; hidróxido de amônia a 25% (solução aquosa de amónia) adquirido de Merck (Darmstadt, Alemanha) e acetato de amónia 0,1M (solução móvel A) obtido de PanReac AppliChem (Darmstadt,Alemanha).

Para realizar a filtração na extração e derivatização foram utilizados papéis de filtro qualitativo Whatman™ Nº1 e filtros de seringa com poros de 0,2 µm (CLARIFY-PTFE 13 mm Filtros de Seringa, hidrofílicos, não-estéreis, 0.22 µm, de CLARIFY *Syringe Filters*™).

6.2 Preparo das soluções

As soluções de aminas biogénicas foram preparadas separadamente e com preparações de *mix*, para serem utilizados tanto para a curva de calibração quanto

para o ensaio de recuperação. Todas as preparações foram realizadas seguindo as normas de segurança indicados pelos fabricantes para um manuseio adequado.

As soluções mãe das aminas biogénicas foram preparadas com concentração de 1mg/mL em HCl 0,1 M. As soluções de trabalho foram preparadas retirando-se 1 mL da solução estoque e adicionando-se HCl 0,1 M até 10 mL, para que sua concentração fosse de 0,1 mg/mL. Das soluções de trabalho de cada amina foram retiradas alíquotas para formar misturas de padrões com diferentes concentrações para construção da curva de calibração e verificação da sua linearidade, além do uso para verificação da recuperação em amostras de peixe.

A solução-mãe do padrão interno (1,7-diaminoheptano) foi também preparada com concentração de 1 mg/mL em HCl 0,1 M. O TCA foi dissolvido em água ultrapura preparando uma diluição até concentração de 5%.

O reagente de derivatização foi o cloreto de dansilo (Dns-Cl), que foi preparado numa concentração de 5 mg/mL, dissolvido em acetona. O hidróxido de sódio foi preparado até concentração de 2 M. A solução de carbonato de sódio saturado foi preparada com água ultrapura e, com o auxílio de um aparelho de ultrassom (Sonica, Soltec®)

As soluções-mãe e soluções de trabalho das aminas biogénicas, o padrão interno (PI), o derivatizante, as amostras extraídas e as amostras derivatizadas foram armazenadas sob refrigeração (4ºC).

6.3 Preparo das amostras

6.3.1 Peixes

Foram utilizados 2,2 kg de peixe da espécie *Salmo salar* (salmão-do-Atlântico) e 2,2 kg de peixe de pescada europeia (*Merluccius merluccius*), para o preparo de hambúrgueres de 80 g. Os peixes foram adquiridos em uma peixaria local, onde foram eviscerados, filetados, e foram retiradas as cabeças, espinhas e pele. Foram transportados em saco térmico e preparados de imediato. Enquanto eram preparados permaneciam em recipientes, que repousavam sob gelo, de modo a manter a

temperatura mais baixa e não induzir a formação das ABs, que pudesse influenciar na análise realizada em seguida para determinar a concentração inicial destes compostos. Após serem preparados, embalados e identificados foram imediatamente armazenados sob refrigeração, a 4ºC, em câmara frigorífica. Foram preparadas três categorias de hambúrgueres com diferenças na composição: sem adição de ingredientes, com adição de sal marinho e com adição de sal de salicórnia.

6.3.2 Sal de Salicórnia

A salicórnia comercial utilizada indicava na embalagem a origem em Portugal e continha somente essa planta na forma seca. O rótulo apresentava também a quantidade aproximada de sódio existente, no entanto, para realização deste trabalho, a concentração precisava ser determinada analiticamente para que a quantidade acrescentada de sal de salicórnia fosse correspondente aos valores de sal de cozinha adicionados ao controlo (controlo com adição de sal), sendo este valor baseado nos valores encontrados em hambúrguer de peixe encontrados no mercado português.

Foi necessário realizar um compósito de três embalagens (3 X 45 g), todos do mesmo lote, que foi misturado e moído até atingir uma moagem parecida com sal de cozinha (sal de mesa), (Figura 7).



Figura 7 - Sal de salicórnia

A técnica analítica utilizada para determinar a concentração de sódio na salicórnia seca foi a espectroscopia de absorção atómica com atomização em chama (FAAS), utilizando o equipamento AAnalyst 200 (PerkinElmer, Überlingen, Alemanha). Antes da determinação da concentração do sódio a amostra sofreu um pré-tratamento: digestão ácida assistida por micro-ondas.

O procedimento consistiu na pesagem de aproximadamente 0,2 g de amostra para vasos de Teflon, aos quais foram adicionados posteriormente 4 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3 69% m/m, TraceMetal™, Fisher Chemical) e 1 mL de peróxido de hidrogénio (H_2O_2, 30-32% m/m, Primar™, for Trace Metal Analysis, Fisher Chemical). Os vasos foram hermeticamente fechados e colocados dentro do forno de micro-ondas. O programa de temperatura utilizado foi o seguinte: 1) de 0 a 10 minutos – aumentar gradualmente a temperatura até atingir os 180ºC; 2) de 10 a 30 minutos – manter a temperatura a 180ºC. Após o término da digestão, os vasos de Teflon foram abertos, sendo o conteúdo dos mesmos transferido para balões volumétricos de 50 mL, aos quais foi adicionada água ultrapura até à marca. As soluções foram armazenadas a 4º C até posterior análise. A amostra de salicórnia foi digerida em triplicado.

Para a análise por FAAS, as amostras foram diluídas entre 100 e 1000 vezes com uma solução diluída de HNO_3 (0,2%, v/v). A curva de calibração foi preparada com soluções de sódio nas concentrações entre 0,1 e 5 mg/L, preparados a partir de solução padrão de sódio (Sodium standard for AAS, TraceCERT®, 1000 mg/L Na in nitric acid, Supelco, Bellefonte, PA). O resultado obtido foi expresso em g/100 g de sal de salicórnia [85]. Após análise foi verificado que o sal de salicórnia utilizado apresentava um teor de 12,8 g/100g de Na, o que representa 32,4 g de NaCl. Com este valor é possível substituir o sal tradicional pelo sal de salicórnia para que possuíssem a mesma concentração de sódio

6.3.3 Preparo dos hambúrgueres

Para preparar os hambúrgueres, os filetes de cada espécie de peixe foram moídos, separadamente, com o auxílio de um robô de cozinha multifunções (Vorwerk Thermomix TM6 Bimby®), e devidamente homogeneizados com os demais

ingredientes (quando aplicado), o que proporcionou uma uniformização das amostras e a consistência adequada para hambúrguer. O sal marinho utilizado foi previamente moído até que chegasse à textura do "sal de mesa" com auxílio de um moinho (GRINDOMIX GM 200 Retsch). Todos os hambúrgueres foram preparados no dia 0, (dia em que chegaram no laboratório), e cada um deles pesava aproximadamente 80 g e media cerca de 8,6 cm de diâmetro e 1 cm de espessura, para tal foram utilizados moldes para alimentos em formato circular (PRESTO *FoodStyle,* da marca Tescoma. Deste modo, para cada categoria, foram utilizados 730 g de peixe, totalizando 2190 g para cada peixe (salmão e pescada). Neste mesmo dia foram separados 6 g (duplicado) de cada peixe, após a moagem, para realização das análises no dia 0, e assim determinar a concentração inicial das aminas biogénicas na matriz alimentar.

Os hambúrgueres da categoria sem adição de ingredientes foram preparados apenas com peixe, devidamente triturados até formar uma massa homogênea. Já aqueles pertencentes a categoria com adição de sal, foram preparados para que apresentassem 1% de sal (1g/100g) (concentração semelhante a outros produtos derivados de peixe encontrados no mercado), desta forma foi necessário homogeneizar 7,3 g de sal marinho com os 730 g de cada porção de peixe desta categoria. Os hambúrgueres com salicórnia foram preparados para que apresentassem a mesma concentração de sódio. Sabendo que o sal de salicórnia utilizado apresentava 32,4 g de sódio, foi necessário o uso de 3,08 vezes mais o valor utilizado de sal marinho.

Os hambúrgueres foram armazenados em câmara frigorífica, com temperatura controlada (variação de 3,6 a 4º C), em embalagens plásticas próprias para alimentos.

6.3.4 Identificação das amostras

Cada categoria, de cada espécie, recebeu um código de acordo com o dia de análise (T0, T2, T5 e T8). Como é possível visualizar nas Tabelas 4 e 5, os códigos foram atribuídos para determinar também a quantidade de análises realizadas em cada dia. Em cada categoria foram preparadas 3 amostras independentes em triplicado, exceto no primeiro dia, quando foram analisadas apenas duas amostras, por

não haver variação esperada. No dia de cada uma das análises, antes de ser realizada a pesagem, cada hambúrguer foi macerado dentro do próprio saco onde foi armazenado. Esse passo foi feito para que houvesse a homogeneização de todas as ABs que pudessem ter sido produzidas durante o armazenamento, de modo que a fração retirada para pesagem fosse representativa da amostra como um todo.

Dia / **Categorias**	**T0**	**T2**	**T5**	**T8**
Controlo sem sal	CS01 CS02	CS21 CS22 CS23	CS51 CS52 CS53	CS81 CS82 CS83
Controlo com sal	-	CSS21 CSS22 CSS23	CSS51 CSS52 CSS53	CSS81 CSS82 CSS83
Salicórnia	-	SS21 SS22 SS23	SS51 SS52 SS53	SS81 SS82 SS83

Tabela 4. Código das amostras de salmão

CS: controlo de salmão sem adição de sal; CSS: controlo de salmão com adição de sal e SS: salmão com salicórnia

Dia / **Categoria**	**T0**	**T2**	**T5**	**T8**
Controlo sem sal	CP01 CP02	CP21 CP22 CP23	CP51 CP52 CP53	CP81 CP82 CP83
Controlo com sal	-	CPS21 CPS22 CPS23	CPS51 CPS52 CPS53	CPS81 CPS82 CPS83
Salicórnia	-	PS21 PS22 PS23	PS51 PS52 PS53	PS81 PS82 PS83

Tabela 5. Códigos das amostras de pescada

CP: controlo de pescada sem adição de sal; CPS: controlo de pescada com adição de sal e PS: pescada com adição de salicórnia.

6.4 Determinação das Aminas biogénicas

A metodologia utilizada na extração, derivatização e na análise por HPLC foi baseada no artigo de Zhai, *et al*, de 2012 [4], com algumas alterações. Este artigo usado como referência também foi baseado em outros trabalhos. O processo de extração foi baseado no artigo de Mah *et al*, de 2002 [86], com algumas modificações. Já o processo de derivatização seguido foi o desenvolvido por Ben-Gigirey *et al*, de 1998 [87], também com algumas alterações sugeridas em Zhai, *et al*, [4]. A determinação de aminas biogénicas da matriz alimentar é baseada em dois passos principais: a extração e a determinação analítica [88].

6.4.1 Extração das Aminas Biogénicas

Para a realização da extração, baseada no trabalho de Zhai, *et al*, de 2012 [4], foram pesados 3 g de amostra em tubo de centrífuga de 50 mL, em que foram adicionados 10 mL de TCA a 5% e 20 µL de PI (1,7-diaminoheptano a 1mg/mL). A mistura foi homogeneizada com o Ultra-Turrax® IKA® T18 basic, e foi feita a centrifugação por dez minutos a 5000 g a 4ºC (Eppendorf Centrifuge 5810 R). O sobrenadante gerado foi coletado e o resíduo sólido resultante foi novamente sujeito à extração com 10 mL de TCA. Os dois sobrenadantes foram combinados e filtrados com papel de filtro qualitativo Whatman Nº 1. O volume final foi ajustado até a medida de 25 mL com TCA 5%.

6.4.2 Derivatização

A maioria das aminas biogénicas não possui cromóforos suficientes para serem visualizados no espectro de luz visível. Para isso o processo de derivatização foi desenvolvido, de modo a permitir a análise cromatográfica e determinação da

concentração dos compostos. Além disso, esse processo auxilia na estabilização das ABs [21]. Essas aminas que passam por processo de derivatização adquirem melhores propriedades cromatográficas e tornam-se mais estáveis [17]. Neste trabalho o derivatizante utilizado foi o cloreto de dansilo, que se associa com as aminas formando um complexo mais estável e com melhores propriedades cromatográficas. Na Figura 8 pode ser observado um esquema que representa a reação entre amina e derivatizante.

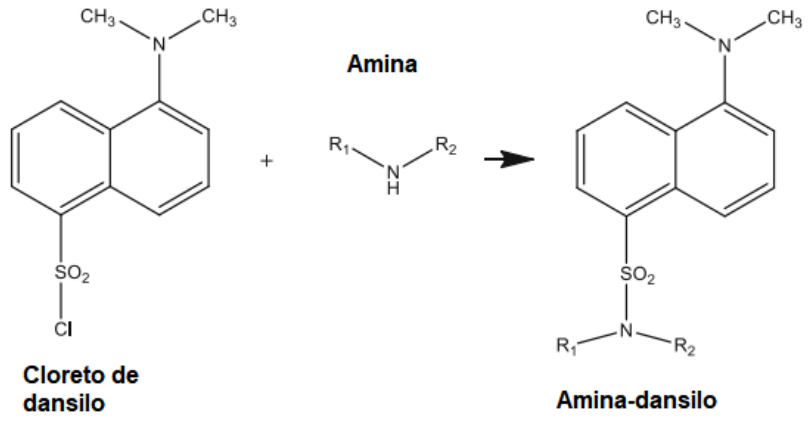


Figura 8 - Reação entre cloreto de dansilo e aminas biogénicas

Adaptado de: Liu, Y, *et al* (2020) [89].

Para realizar a derivatização foi seguido o trabalho de Zhai et al [4], já por si desenvolvido a partir do método proposto por Ben-Gigirey et al, de 1998 [86]. Desta forma, 1 mL do extrato filtrado de cada amostra foi misturado com 200 µL de NaOH 2 M e 300 µL de Na_2CO_3 saturado em tubo de centrífuga de 10 mL. Após homogeneização, foi acrescentado 2 mL do derivatizante (cloreto de dansilo) e a mistura foi incubada por 45 minutos a 40ºC em bloco de aquecimento Stuart® SBH200D/3. Depois foi adicionado 100 µL de hidróxido de amónia, de modo a remover resíduos do derivatizante livre. Seguiu-se uma nova incubação por trinta minutos a temperatura ambiente e, após esse período, o volume foi ajustado até 5 mL com acetonitrilo. Essa mistura foi centrifugada por cinco minutos a 3000 g e depois foi filtrada através de filtros de seringa de PTFE (poros de 0,2 µm). Após filtração as

amostras derivatizadas foram armazenadas em tubos Eppendorfs de 1 mL e uma alíquota foi injetada no HPLC.

6.4.3 Análise das Aminas Biogénicas por HPLC-FLD

Foi utilizado HPLC de fase reversa (Jasco, Japão) com bomba (Jasco PU-1580), unidade de gradiente quaternário (Jasco LG-1580-04), degaseificador (Jasco DG-2080-53), forno de coluna (Jones Chromatography Model 7981), injetor automático (Jasco AS-2057 Plus) com *loop* de 100 µL, detetor de fluorescência (Jasco FP 4025), interface para aquisição de dados (Jasco LC-Net II/ADC) e software *ChromNAV*. A coluna cromatográfica utilizada foi YMC - Triart C18 (250 mm x 4,6 mm; 3 µm, 12 nm). As condições cromatográficas foram realizadas de acordo com Zhai et al [4]. O fluxo usado foi de 1 mL/min à temperatura de 40ºC. A fase móvel foi composta por 3 eluentes (A: acetato de amónia 0,1 M; B: água ultrapura e C: acetonitrilo).

O gradiente de eluição está apresentado na Tabela 6. O tempo de corrida foi de 30 minutos e as amostras foram detetadas a 350 nm, para o comprimento de onda de excitação e 520 nm para comprimento de onda de emissão. O volume de injeção foi de 50 µL.

Tempo (min.)	A (%)	B (%)	C (%)
0	15	35	50
6	20	15	65
15	17	15	68
25	10	0	90
25,1	15	35	50
30	15	35	50

Tabela 6: Programa do gradiente de eluição para separação das aminas biogénicas. A: acetato de amónia 0,1 M; B: água ultrapura; C: acetonitrilo)

6.4.3.1 Controlo de Qualidade Analítico

Vários parâmetros foram avaliados, de modo a garantir a aplicabilidade do método utilizado nas condições e nos equipamentos do laboratório. Para isso, recorreu-se a parâmetros analíticos como a linearidade, LOD, LOQ, precisão e recuperação. A validação foi realizada de acordo com as diretrizes determinadas pela *International Conference on Harmonization of Technical Requirements* (ICH) e pela Food and Drug Administration (FDA) [93, 94]. A curva de calibração foi realizada de modo a verificar a capacidade do equipamento de realizar a quantificação destes compostos nas amostras analisadas e para verificar a linearidade dos resultados adquiridos.

A calibração foi realizada através do método da curva de calibração externa com adição de 20 µL de padrão interno e para construção da curva de calibração foi feita a derivatização de 1 mL de diferentes quantidades de padrão das diferentes aminas biogénicas, com PI.

Assim, a curva de calibração foi construída utilizando sete pontos de calibração numa gama de concentrações (1, 2, 4, 10, 20, 40 e 80 mg/L) semelhante à descrita por Zhai, et al [4]. Foi feita adição de PI na concentração equivalente à adicionada às extrações das amostras, sendo seguida de 1 mL de cada concentração sujeito à derivatização tal como anteriormente descrito para as amostras. Para cada concentração realizaram-se três diluições e derivatizações de forma independente. Assim as curvas calibração foram estabelecidas relacionando a proporção entre a área de cada amina biogénica com a área do PI em função da concentração de cada amina.

Os limites de deteção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) foram determinados com base nos valores obtidos dos brancos (n = 2), através da fórmula: $LOD = 3.3\sigma/S$ e $LOQ = 10\sigma/S$, respetivamente (onde σ significa o desvio padrão da leitura dos brancos e S o declive obtido na curva de calibração expressa em mg/L). O

fator de correção derivado da massa utilizada e diluições decorrentes do processo extrativo foi aplicado para expressar os resultados em mg/kg.

O ensaio realizado para determinar a recuperação corresponde à quantidade de analito recuperado relativamente à quantidade teórica de padrão adicionado. Este ensaio foi realizado com a fortificação de uma amostra de salmão, previamente adquirida para este efeito, com três diferentes níveis de concentração: 3, 8 e 20 mg/kg, de cada amina biogénica. A recuperação dos analitos não precisa chegar a 100%, mas a recuperação dos analitos e do padrão interno deverá ser consistente, precisa e reprodutível [93]. Para preparar as soluções nestas concentrações, foi feita uma solução inicial, contendo todas as aminas biogénicas, sem o PI, com concentração de 100 µg/mL. A partir desta solução foram retiradas as alíquotas para as soluções dos diferentes níveis. Como foram utilizadas 3 gramas de amostra (peixe) foi necessário multiplicar a quantidade que seria inoculada por três. Para o nível 1 (3 mg/kg) foi adicionado 90 µL; para o nível 2 (8 mg/kg) foi adicionado 240 µL e para o nível 3 (20 mg/kg) foi acrescentado 600 µL. Também foi feita a extração da amostra de peixe sem adição de padrões, apenas com adição do PI, assim era possível identificar as aminas presentes na amostra (sem que tivesse sido adicionado padrões) e suas concentrações para assim poder calcular a recuperação nas amostras fortificadas.

A precisão pretende avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios repetidos sobre uma mesma amostra num mínimo de três determinações por concentração [93]. A precisão pode ser avaliada a partir de dois níveis: pelo estudo da repetibilidade ou precisão intra-dia e pela precisão intermédia ou precisão inter-dia. A repetibilidade foi avaliada no mesmo dia em três diferentes concentrações (3, 8 e 20 mg/kg) e em triplicata, correspondendo a um total de nove determinações. A precisão intermédia também foi determinada, nas mesmas concentrações, com três determinações por dia, em três dias seguidos. Os resultados destes dois parâmetros foram expressos em %RSD.

6.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software de analise GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, Califórnia). Todas as análises

foram realizadas em triplicado, sendo os resultados apresentados como concentração média e desvio-padrão. A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi testada usando o teste de Levene. Para avaliar as diferenças nas concentrações das aminas biogénicas entre as condições testadas foi utilizada a *One way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. O nível de significância definido foi de 0,05.

7. Resultados e Discussão

7.1 Controlo de Qualidade analítico

Na Figura 9, observa-se um cromatograma típico de uma mistura das aminas em estudo, além do PI, com concentração de 20 µg/mL, onde estão identificados os picos de cada amina.

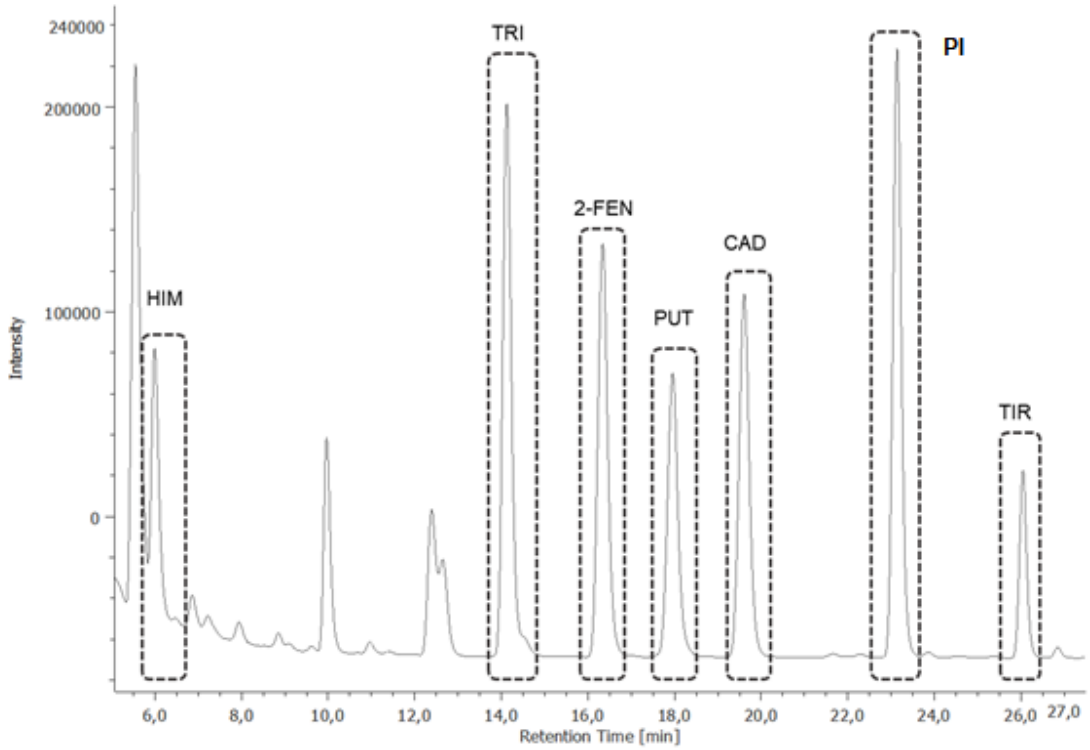


Figura 9 – Cromatograma característico de uma mistura de padrões de aminas biogénicas a 20 µg/mL obtido após derivatização e HPLC-FLD. HIS: histamina; TRIP: triptamina; 2-FEN: 2-feniletilamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; PI: 1,7-diaminoheptano; TIR: tiramina

É importante salientar que a amina biogénica agmatina foi preparada assim como as demais aminas, inclusive a curva de calibração e recuperação, além de ter sido analisada nas amostras. No entanto esta amina apesar de apresentar picos identificáveis nas corridas cromatográficas (tempo de retenção anterior ao apresentado no detalhe de cromatograma na Figura 10), apresentavam a presença de interferentes (possivelmente resíduos resultantes da derivatização), de modo que a sua quantificação ficou comprometida, uma vez que não foi possível diferenciar com precisão esta AB dos interferentes. Por este motivo a agmatina foi excluída dos resultados. Para trabalhos futuros será preciso optimizar a resolução cromatográfica na porção inicial da corrida, possibilitando a separação inequívoca desta amina dos interferentes.

Os parâmetros da curva de calibração encontram-se na Tabela 7. A linearidade do método pode ser demonstrada através do estudo estatístico dos parâmetros da reta, onde através do coeficiente de correlação (R^2) é possível observar que foi obtida uma excelente resposta linear entre as duas variáveis para todos os compostos (0,999 a 1), dentro da gama de trabalho.

Aminas Biogénicas	Equação de regressão	R^2
2-FEN	y = 0,7357x – 0,065	0,999
CAD	y = 1,1774x + 0,0233	0,9995
HIS	y = 0,2676x – 0,035	0,999
PUT	y = 1,053x + 0,027	1
TIR	y = 0,2972x + 0,003	0,9992
TRIP	y = 0,5687x + 0,0874	0,9995

Tabela 7: Equação de regressão e R^2 das aminas biogénicas. HIS: histamina; TRIP: triptamina; 2-FEN: 2-feniletilamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina e TIR: tiramina.

O Limite de Deteção (LOD), a menor concentração do composto analisado que se consegue determinar, e que consegue ser distinguido da sua ausência. O Limite de

Quantificação (LOQ) é a menor concentração passível de ser quantificada com precisão de um determinado composto. Assim os valores de LOD e LOQ foram determinados para cada composto, como é possível visualizar na Tabela 8. Estes valores são importantes na análise dos resultados obtidos para cada composto nas amostras e para os cálculos estatísticos dos compostos não detetados e não quantificáveis. Os valores obtidos são semelhantes aos descritos por Zhai *et al*. [4] que descreveu LOD de 0,02 mg/kg para PUT, 0,3 mg/kg para CAD e 0.05 mg/kg para 2-FEN, 0,08 mg/kg para TRIP, 0,14 mg/kg para TIR e 0,24 mg/kg para HIS.

Aminas	LOD	LOQ
2-FEN	0,124	0,377
CAD	0,078	0,235
HIS	0,342	1,036
PUT	0,087	0,263
TIR	0,308	0,933
TRIP	0,161	0,487

Tabela 8: LOD e LOQ das aminas biogénicas expressos em mg/kg. HIS: histamina; TRIP: triptamina; 2-FEN: 2-feniletilamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina e TIR: tiramina.

Para avaliar a aplicabilidade do método escolhido para este estudo, foram realizados ensaios de recuperação a três níveis de concentração (3, 8 e 20 mg/kg) aplicados em amostras de salmão (Tabela 9). Através destes ensaios, foi possível observar uma recuperação satisfatória e consistente, para todas as aminas nas três concentrações utilizadas para fortificar, estando todos os valores dentro do intervalo aceitável (70-120%) de recuperação preconizados pelo ICH [90,91].

AB	Recuperação (%) 3 mg/kg	Recuperação (%) 8 mg/kg	Recuperação (%) 20 mg/kg
2-FEN	99,3 ± 4,4	84,1 ± 5,7	80,8 ± 0,05
CAD	96,6 ± 0,1	105,6 ± 1,1	85,6 ± 2,2
HIS	106,1 ± 1,0	109,6 ± 0,32	82,49 ± 0,1
PUT	83,2 ± 0,2	90,1 ± 6,95	70,6 ± 0,6
TIR	101,4 ± 1,0	78,1 ± 3,7	78,7 ± 3,3
TRIP	98,8 ± 3,95	105,5 ± 0,2	92,3 ± 0,17

Tabela 9. Recuperação do método a três níveis (3, 8, 20 mg/kg) aplicado em amostra de salmão, expressa em %. HIS: histamina; TRIP: triptamina; 2-FEN: 2-feniletilamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina e TIR: tiramina.

Na figura abaixo (Figura 10) encontra-se um cromatograma da amostra de salmão utilizada para os ensaios de recuperação amostra de recuperação sem adição de padrões, mas com PI (a preto), sobreposto com um cromatograma da mesma amostra com adição de padrões na concentração correspondente a 20 mg/kg (a cinza).

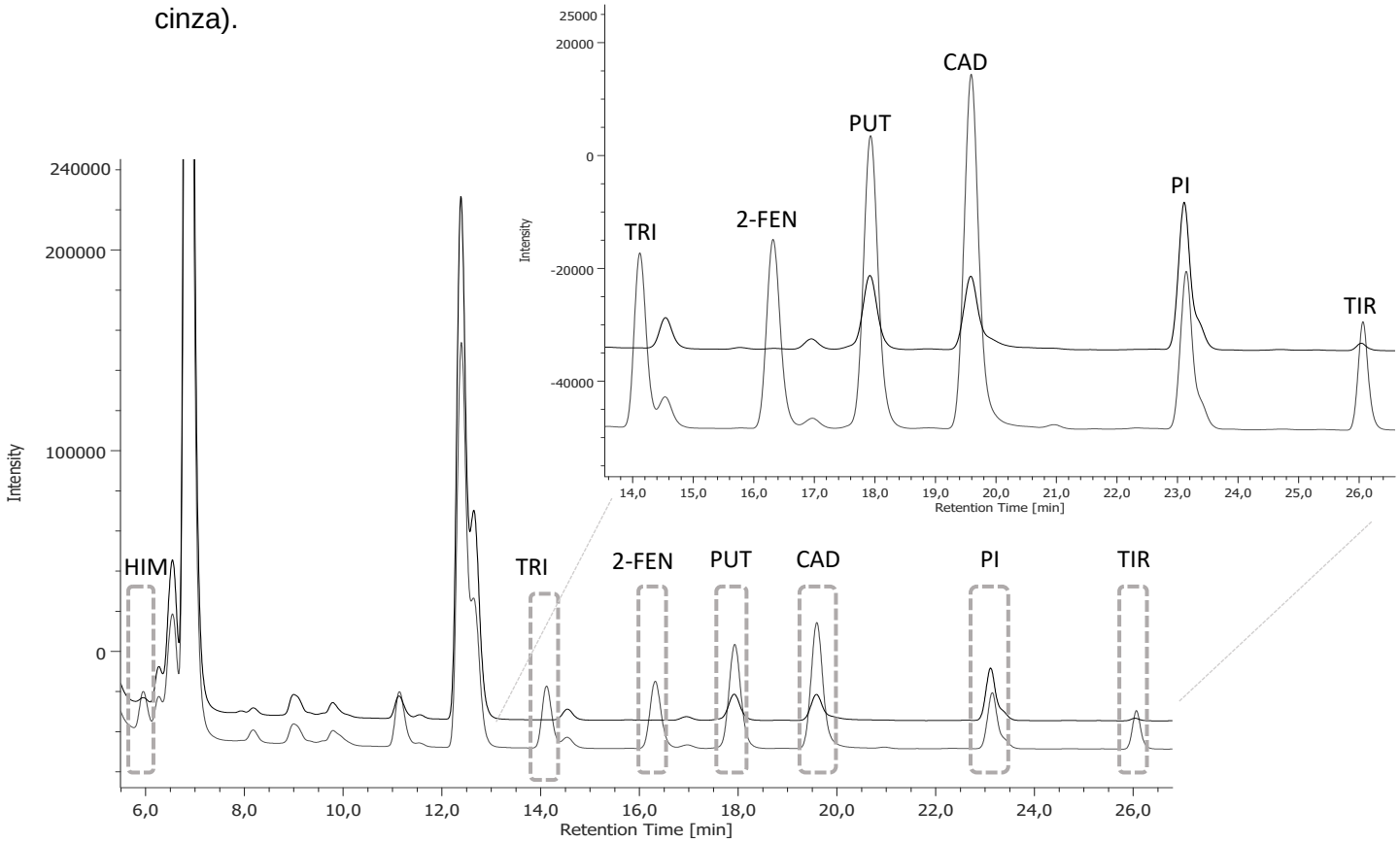


Figura 10 – Cromatograma de uma amostra de salmão sem adição de padrões, mas com PI em preto, sobreposto a um cromatograma da mesma amostra com adição de padrões na concentração de as recuperações a 20 mg/kg. No detalhe os picos das aminas que foram detetadas próximas umas das outras, com o PI entre a cadaverina e tiramina (HIS: histamina; TRIP: triptamina; 2-FEN: 2-feniletilamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; PI: padrão interno; TIR: tiramina).

Para avaliar a repetibilidade (*intraday*) e a precisão intermédia foram utilizados os derivatizados da recuperação (3, 8 e 20 mg/kg), do mesmo dia e em dias distintos (*interday*), de cada concentração usada. Para o *intraday* foi analisado os resultados de um mesmo dia de cada uma das concentrações (3, 8, 20 mg/kg). Para o *interday,* que avalia a capacidade de repetição dos resultados em dias diferentes, essas amostras, de cada concentração, foram injetadas novamente no HPLC, em 3 dias, de modo a determinar a precisão intermediária e avaliar o desvio que pode existir [92]. Este tipo de método é chamado de estudo i*ntraday* e *interday.*

Assim os resultados foram calculados e comparados com os limites determinados pela literatura [93], que permite uma variação até 15%. É importante salientar que para a menor concentração aceita-se um valor de até 20%. Na Tabela 10 e visualiza-se os resultados de CV para cada amina, tanto intra-dia, quanto inter-dia, com valores abaixo do limite máximo (15%).

Aminas	**CV de 3 mg/kg**		**CV de 8 mg/kg**		**CV de 20 mg/kg**	
	Intraday	*Interday*	*Intraday*	*Interday*	*Intraday*	*Interday*
2-FEN	0,13	11,3	6,6	7,6	2,8	0,06
CAD	1,7	3,4	9,4	0,4	3,5	0,4
HIS	9,4	9,8	4,1	2,8	6,3	3,6
PUT	3,0	1,1	9,3	2,4	4,6	0,25
TIR	1,2	1,7	4,8	0,8	3,9	0,09
TRIP	2,9	3,2	9,2	1,6	1,7	0,2

Tabela 10: Repetibilidade (*intraday*) e precisão intermédia (*interday*) do método (CV %). HIS: histamina; TRIP: triptamina; 2-FEN: 2-feniletilamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina e TIR: tiramina.

7.2 Resultados das Aminas Biogénicas nas amostras

7.2.1 Aminas biogénicas no salmão-do-Atlântico e na pescada europeia

As aminas biogénicas presentes nos peixes utilizados para o estudo, salmão-do-Atlântico e pescada europeia, foram avaliadas no dia da aquisição e preparo dos peixes. Os resultados obtidos nas amostras de salmão e de pescada no dia 0 podem ser observados na Tabela 11.

Amostras	HIS	TRIP	2-FEN	PUT	CAD	TIR
Dia 0 Salmão	5,0 ± 0,18 (3,56)	NQ	ND	1,7 ± 0,12 (7,15)	1,2 ± 0,05 (4,38)	ND
Dia 0 Pescada	8,3 ± 1,18 (14,15)	NQ	ND	0,6 ± 0,06 (11,02)	0,3 ± 0,03 (9,20)	ND

Tabela 11: Resultados das ABs iniciais em hambúrgueres de salmão e de pescada em mg/kg (resultados apresentados como média ± desvio padrão, n = 3, RSD entre parênteses)

Nq: não quantificável e Nd: não detetado, com LOQ de TRIP: 0,487; LOD de 2-FEN e TIR: 0,124 e 0,308 mg/kg, respetivamente. HIS: histamina; TRI: triptamina; 2-FEN: 2-feniletilamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina e TIR: tiramina.

Relativamente aos resultados do dia 0 (dia em que os peixes chegaram ao laboratório) a histamina foi a AB mais abundante (5 ± 0,18 mg/kg), seguida da putrescina (1,7 ± 0,12 mg/kg) e da cadaverina (1,2 ± 0,05 mg/kg). No trabalho de Di Toro, *et al* [59] os autores não detetaram a histamina nos primeiros dias de armazenamento das suas amostras de filetes de salmão armazenadas a 4ºC. No trabalho de Dondero, et al [79] foram utilizadas amostras de salmão (*Salmo salar*) defumado embalado a vácuo, tendo sido encontrados valores inferiores a 18 (mg/kg) em temperaturas de cerca de 4ºC, que foi a mesma temperatura utilizada nas amostras aqui apresentadas. A putrescina pode ser encontrada no peixe logo após a pesca, resultado também corroborado no artigo de Di Toro, et al [59]. No entanto a

histamina não é, normalmente, encontrada no peixe logo após a sua morte, sugerindo, o peixe adquirido já estava sofrendo um processo de degradação e ação de microrganismos capazes de produzir essa amina. A concentração de triptamina não foi possível de se quantificar com precisão estando por isso abaixo do LOQ. Já a 2-feniletilamina e a tiramina não foram detetadas.

Em relação a pescada europeia, no dia 0, que foi o dia da chegada dos peixes no laboratório, as amostras apresentaram uma menor formação de putrescina e cadaverina se comparadas com as amostras de salmão, com 0,6 ± 0,06 mg/kg e 0,3 ± 0,03 mg/kg, respetivamente, mas obtiveram um valor maior de histamina, com 8,3 ± 1,18 mg/kg, como observado na Tabela 11. Em relação à triptamina, assim como no salmão, as concentrações foram muito baixas e não foi possível quantificá-las. A tiramina e 2-feniletilamina não foram detetadas. A concentração de putrescina foi menor do que a encontrada no trabalho de Ruiz-Capillas e Moral [38], em que foram encontradas concentrações de 3,08 mg/kg em pescada europeia frescas, já a cadaverina apresentou um valor bem próximo ao encontrado por estes mesmos autores e a tiramina não foi encontrada.

No artigo de Baixas-Nogueras, *et al* [8], os autores relatam a presença de certas aminas no dia 0, em pescadas armazenadas em gelo. Encontraram a putrescina em concentrações bem acima do que neste trabalho, com 1,74 mg/kg. O mesmo ocorrendo com a cadaverina, mas os autores encontraram uma menor concentração de histamina. Neste artigo os autores identificaram a tiramina, diferentemente das amostras deste trabalho. Outros artigos, como o de Baixas-Nogueras, *et al* [81] relatam que certas aminas como cadaverina, histamina e tiramina não foram detetadas, mas em peixes congelados, o que pode ser uma prova da influência que a temperatura possui na formação destes compostos.

7.2.2 Formação de Aminas Biogénicas no salmão ao longo do período de armazenamento

A partir do segundo dia é possível observar um aumento considerável na concentração de aminas biogénicas nas amostras de salmão, sendo possível detetar e

quantificar todas as aminas encontradas (HIS, TRIP, 2-FEN, PUT, CAD e TIR), como se observa na Figura 11. O aumento mais marcante ocorreu na cadaverina com valores entre 112,1 ± 6,25 mg/kg (amostras com salicórnia) e 125,9 ± 5,83 mg/kg (controlo com sal), seguido da histamina, com valores entre 67,5 ± 5,95 (amostras com salicórnia) e 79,7 ± 2,27 mg/kg (controlo sem aditivos), nas três condições testadas (controlo sem adição de ingredientes, controlo com adição de sal marinho e adição de sal de salicórnia). No dia 2 foi notado uma diferença nas concentrações da histamina, tiramina, putrescina e cadaverina nas três condições, mas as diferenças entre estas não foram consideradas significativas ($p<0,05$). A triptamina foi encontrada em concentrações passíveis de serem quantificadas, com valores entre 1,5 ± 0,05 e 2,0 ± 0,33 mg/kg nas amostras controlo sem aditivos e amostras com salicórnia, respetivamente. A 2-feniletilamina passou a ser detetada, com concentrações entre 2,7 ± 0,05 (controlo sem aditivos) e 5,7 ± 0,57 mg/kg (controlo com sal). A putrescina também apresentou um aumento nas suas concentrações em todas as amostras, com valores entre 7,1 ± 0,46 mg/kg (amostras com salicórnia) e 9,8 ± 0,06 mg/kg (controlo com sal).

Nas amostras do dia 5, a histamina e a 2-feniletilamina apresentaram um aumento significativo se comparados com o dia 2, com HIS apresentando valores entre 109,9 ± 14,45 mg/kg (controlo com sal) e 134,8 ± 1,8 mg/kg (controlo sem aditivos) e 2-FEN apresentando os seguintes valores: 18,5 ± 1,21 mg/kg (amostras com salicórnia), 29,2 ± 3,7 mg/kg (controlo com sal) e 30,2 ± 3,6 mg/kg (controlo sem aditivos), em que as diferenças entre as amostras com salicórnia foram significativamente menores do que os controlos ($p<0,05$). A tiramina e putrescina apresentaram um aumento considerável nas três categorias de amostras, com valores entre 56,7 ± 3,63 mg/kg (amostras com salicórnia) entre 61,1 ± 2,93 mg/kg (controlo sem aditivos) e entre 38,2 ± 2,2 mg/kg (controlo sem aditivos) e 46,2 ± 6,52 mg/kg (controlo com sal), respetivamente. O aumento da triptamina, se comparado com o dia 2, foi pouco percetível, alcançando a concentração máxima de 3,8 ± 0,3 mg/kg no controlo sem aditivos. Neste dia a cadaverina manteve sua tendência e foi a amina com as maiores concentrações em todos os tratamentos, atingindo os seguintes valores: 142,6 ± 17,8 mg/kg (controlo sem aditivos), 178,1 ± 7,6 mg/kg (amostras com salicórnia) e 189,1 ± 3,95 mg/kg (controlo com sal), com diferença significativa entre o controlo sem aditivos e as outras duas categorias ($p<0,05$)

Na Figura 11, em forma de gráficos, estão apresentados os resultados estatísticos nas amostras de salmão, com as diferenças significativas ($p<0,05$) identificadas com asterisco e uma linha entre as categorias que apresentaram essa diferença.

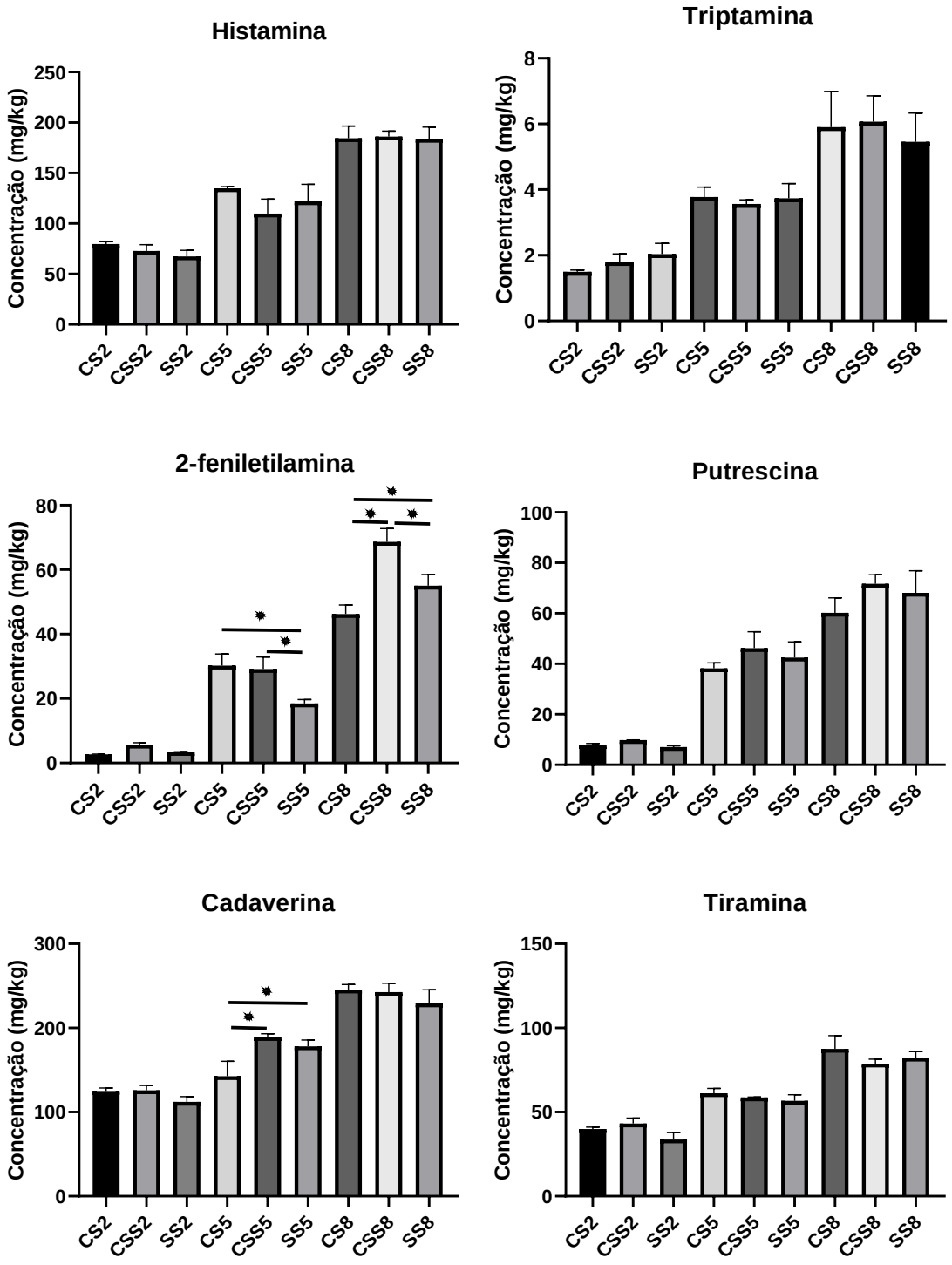


Figura 11 - Gráficos representativos da concentração das aminas biogénicas (expressos em mg/kg, n = 3 × 3, três hambúrgueres independentes analisados em triplicata) nos hambúrgueres de salmão ao longo do armazenamento (dia 2 a dia 8). * indica diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p<0,05$). As amostras codificadas são: CS (controlo sem aditivos), CSS (controlo com sal) e SS (amostra com salicórnia), sendo os números 2, 5 e 8 correspondente ao dia de armazenamento.

A partir desse dia o hambúrguer já seria considerado impróprio para consumo já que a concentração de histamina ultrapassou o limite máximo definido pela legislação europeia, de 100 mg/kg [43] sendo a análise desta amina um dos pontos críticos no controlo de qualidade dos peixes. Apesar de não ter sido realizada a análise sensorial destes hambúrgueres, os aspetos sensoriais percecionados das amostras não estavam totalmente comprometidos, o odor se apresentava um pouco alterado, mas sua textura e aparência estavam como no dia 0. Isto corrobora o que vários autores relatam, nomeadamente que a concentração de ABs pode alcançar níveis elevados, até mesmo ultrapassar o limite máximo definido pela legislação (histamina), antes que o alimento apresente características que o consumidor consideraria impróprias para consumo [5,22,28]. Nestas concentrações a histamina já pode causar intoxicação e com a influência de outras aminas como cadaverina e putrescina essa toxicidade pode ser intensificada.

Nas amostras do dia 8 nota-se que os valores de histamina foram muito próximos nas três condições, com valores entre 183,8 ± 11,78 mg/kg (amostras com salicórnia) e 186,2 ± 5,48 mg/kg (controlo com sal), muito acima do limite máximo permitido pela legislação. Na triptamina os valores continuaram baixos, variando entre 5,4 ± 0,87 mg/kg nas amostras com salicórnia e 6,1 ± 0,79 mg/kg nas amostras com adição de sal. Relativamente à 2-feniletilamina, a variação das concentrações entre as categorias foi maior: o menor valor foi o do controlo sem sal (46,2 ± 2,83 mg/kg), seguido das amostras com salicórnia (58,3 ± 8,9 mg/kg) e controlo com sal (72 ± 9,82 mg/kg), com diferenças significativas entre cada um dos três tratamentos, ($p<0,05$). A concentração de putrescina variou de 60,2 ± 5,92 mg/kg (controlo sem aditivos) a 71,7 ± 3,62 mg/kg (controlo com sal). A cadaverina foi a amina que apresentou as concentrações mais elevadas no final do período de armazenagem, tendência que ocorreu desde o segundo dia. A concentração de cadaverina foi sempre superior a 200 mg/kg, chegando a 245,6 ± 6,06 mg/kg nas amostras do controlo sem aditivos. A

diferença entre os tratamentos não foi significativa em nenhuma das aminas biogénicas analisadas no oitavo dia de armazenamento, exceto na 2-feniletilamina.

Esses valores da cadaverina, que aumentaram desde o dia 2 de armazenamento, é um dado relevante uma vez que esta amina pode levar a um aumento da toxicidade da histamina, pelo comprometimento do sistema de detoxificação no organismo humano [11, 16, 27]. Logo, a ingestão dessas amostras, que ainda estavam dentro do limite permitido em relação a histamina, poderia levar a uma intoxicação, principalmente em pessoas mais sensíveis.

É importante salientar que no dia 8 das análises os hambúrgueres já apresentavam uma mudança na textura, apresentando-se mais amolecidos e com um odor forte e desagradável, ou seja, já com sinais claros de deterioração, o que seria considerado indesejável pela maioria dos consumidores. Nas amostras de salmão as ordens dos resultados das aminas biogénicas no último dia de armazenamento (8º dia) foram: CAD > HIS > TIR > PUT > 2-FEN > TRIP, nas amostras com adição de salicórnia e controlo sem aditivos e CAD > HIS > TIR > 2-FEN > PUT > TRIP.

Atualmente, existem poucos artigos na literatura em que foram estudados os efeitos da *Salicornia ramosissima* na inibição da formação de aminas biogénicas em salmão e outros produtos à base desta espécie.

7.2.3 Formação de Aminas Biogénicas na pescada ao longo do armazenamento e efeito da salicórnia

Nas amostras de pescada do segundo dia, a 2-feniletilamina e tiramina continuaram a não serem detetadas. A maior diferença ($p<0,05$) na concentração das aminas foi com a histamina, entre as amostras do controlo com sal e as com adição de salicórnia, que apresentaram valores de 9,7 mg/kg ± 1,76 e 4,9 mg/kg ± 0,72, respetivamente, sendo possível dizer que o controlo com sal apresentou quase o dobro da concentração de histamina das amostras com salicórnia com essa diferença sendo considerada significativa, ($p<0,05$), como se observa na Figura 12. Na triptamina a diferença foi significativa ($p<0,05$) entre cada um dos tratamentos, com concentrações de 0,6 ± 0,11 mg/kg (controlo sem aditivo), 1,5 ± 0,18 mg/kg (controlo

com sal) e 1,14 ± 0,14 mg/kg (amostras com salicórnia). Houve um aumento na concentração da putrescina e cadaverina, exceto nas amostras com salicórnia em que o valor da putrescina foi o mesmo encontrado no peixe analisado no dia 0. As concentrações da putrescina variaram de 0,6 ± 0,06 mg/kg nas amostras com salicórnia até 1,8 ± 0,16 mg/kg no controlo sem aditivos. Já a cadaverina alcançou concentrações entre 1,0 ± 0,17 mg/kg nas amostras com salicórnia e 3,6 ± 0,6 mg/kg no controlo com sal. Entretanto as diferenças encontradas nestas duas aminas (CAD e PUT) não foram significativas ($p<0,05$).

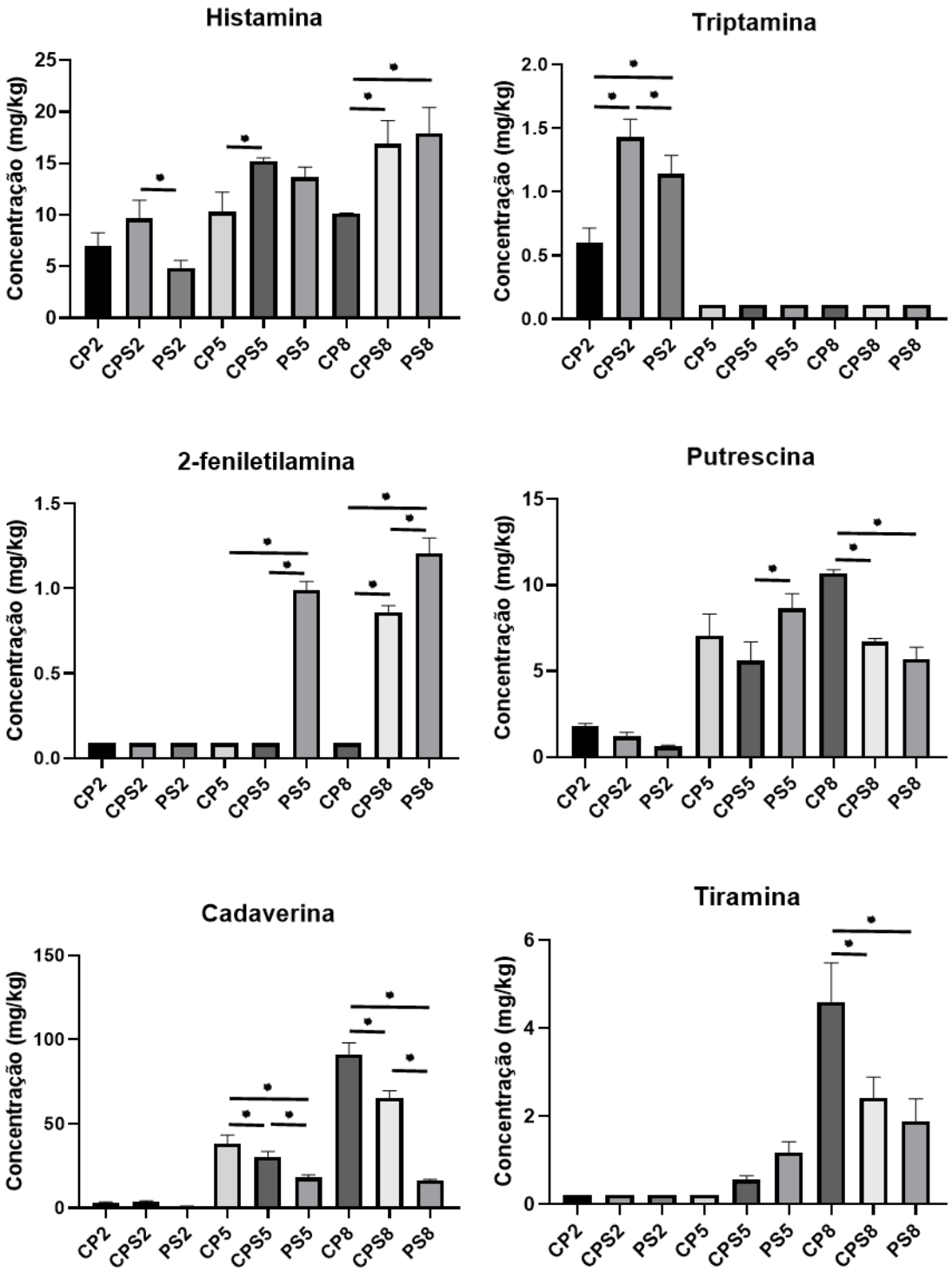


Figura 12 - Resultados estatísticos da concentração das aminas biogénicas nas amostras de pescada, com $p<0,05$, em que o asterisco indica uma diferença significativa entre duas amostras. As amostras codificadas são: CP (controlo sem aditivos), CPS (controlo com sal) e PS (amostra com salicórnia), com os números 2,5 e 8 representando os dias de armazenamento.

Nos hambúrgueres de pescada do dia 5 foi possível observar um aumento na concentração da histamina e o controlo sem aditivos foi o que apresentou menores concentrações (10,3 ± 1,89 mg/kg), seguido das amostras com salicórnia (13,7 ± 0,95 mg/kg) e do controlo com sal (15,2 ± 0,3 mg/kg), sendo a diferença entre os controlos significativa ($p<0,05$). Porém, nestas duas últimas os valores foram bem próximos. Nas três categorias não foi possível quantificar a triptamina, enquanto a 2-feniletilamina só foi identificada nas amostras com salicórnia (1,0 ± 0,05 mg/kg), o que levou a existir uma diferença significativa ($p<0,05$) entre essas amostras e os controlos. A tiramina não foi detetada apenas nas amostras do controlo sem aditivos, mas nas outras amostras as concentrações encontradas foram baixas, com o controlo com sal apresentando valores de 0,5 ± 0,1 mg/kg e amostras com salicórnia apresentando 1,2 ± 0,24 mg/kg. A putrescina apresentou os menores valores no controlo com sal (5,6 ± 1,08 mg/kg), seguido do controlo sem aditivos (7,1 ± 1,25 mg/kg), com as amostras com salicórnia apresentando as maiores concentrações (8,6 ± 0,87 mg/kg), sendo a diferença, entre esta última categoria e o controlo com sal, significativa ($p<0,05$). A cadaverina foi a amina que alcançou as maiores concentrações nos três tratamentos, com valores de: 38,2 ± 5,1 mg/kg (controlo sem aditivos), 30,4 ± 3,1 mg/kg (controlo com sal) e 18,0 ± 1,67 mg/kg (amostras com salicórnia). O aumento desta amina foi considerável se comparado com os resultados obtidos no segundo dia; enquanto no dia 2 a histamina foi a amina mais abundante, no quinto dia a cadaverina passou a ser a amina em maiores concentrações. É importante salientar que a diferença encontrada entre as amostras com salicórnia e entre cada um dos controlos foi considerada significativa ($p<0,05$) em relação a cadaverina.

Este é um resultado promissor para a indústria alimentar e para os consumidores, uma vez que ficam mostrados alguns benefícios da substituição do sal tradicional por sal de salicórnia, nomeadamente ao nível da preservação dos alimentos. Os resultados deste estudo permitem ser mais um contributo para o corpo de conhecimento técnico-científico que propõe esta substituição em diferentes alimentos [62].

Nas amostras do dia 8 houve um aumento na concentração da histamina nas três categorias, porém foram as amostras com salicórnia que apresentaram os maiores valores (17,9 ± 2,49 mg/kg), com o controlo com sal apresentando valores

bem próximos (16,9 ± 2,26 mg/kg); o controlo sem aditivos apresentou as menores concentrações, com 10,15 ± 0,04 mg/kg, sendo a diferença entre esse valor e aqueles encontrados nas outras duas categorias considerada significativa ($p<0,05$). É importante salientar que em nenhuma das amostras foi ultrapassado o limite máximo determinado para histamina, de 100 mg/kg, diferentemente do que ocorreu com os hambúrgueres de salmão. A triptamina não pode ser quantificada em nenhuma das amostras, enquanto a 2-feniletilamina só não foi detetada no controlo sem aditivos, tendo sido obtido valores de 0,9 ± 0,04 mg/kg no controlo com sal e 1,2 ± 0,09 mg/kg nas amostras com salicórnia; a diferença entre cada um dos tratamentos foi significativa ($p<0,05$). Na putrescina, tiramina e na cadaverina as maiores concentrações foram encontradas no controlo sem aditivos, com 10,7 ± 0,21, 4,6 ± 0,88 e 91,2 (± 6,79 mg/kg), respetivamente. Nesta mesma ordem foram encontrados os seguintes valores no controlo com sal: 6,7 ± 0,17 mg/kg, 2,4 ± 0,47 mg/kg e 65,2 ± 4,39 mg/kg e nas amostras com salicórnia com 5,7 ± 0,68 mg/kg, 1,6 ± 0,1 mg/kg e 16,3 ± 0,8 mg/kg. As diferenças significativas ($p<0,05$) foram encontradas na putrescina entre o controlo sem aditivos tanto em relação ao outro tipo de controlo quanto com as amostras com salicórnia; em relação a tiramina a significância foi identificada entre os controlos e entre o controlo sem aditivo e as amostras com salicórnia; em relação a cadaverina houve significância na diferença entre cada um dos tratamentos. A ordem das aminas biogénicas encontradas nas amostras de pescada no último dia de armazenamento (8º dia) foram: HIS > CAD > PUT > TIR > 2-FEN > TRIP, nas amostras com salicórnia; CAD > HIS > PUT > TIR > 2-FEN > TRIP, no controlo com adição de sal e CAD > HIS > PUT > TIR > TRIP > 2-FEN, no controlo sem aditivos.

No artigo de Baixas-Nogueras, *et al* [8], os autores analisaram amostras de pescada europeia armazenada sob refrigeração, mas sem o processamento sofrido nesta dissertação, em que os peixes foram triturados para serem transformados em hambúrgueres. Isso pode explicar as diferenças encontradas na concentração de aminas ao fim de oito dias de armazenamento que podem ser analisados nos dois trabalhos. No artigo de Baixas-Nogueras, *et al,* as amostras apresentaram valores mais baixos de putrescina, cadaverina e histamina. No entanto, a concentração de tiramina foi muto parecida com os do controlo sem aditivos: no artigo 4,51 mg/kg e 4,6 mg/kg (± 0,88). Isso quer dizer que as amostras com adição de salicórnia parecem ter

uma menor concentração de tiramina (1,6 mg/kg) se comparados com os resultados deste ensaio e deste artigo.

Assim como vários autores relatam, a cadaverina foi a amina biogénica mais abundante, tanto no controlo sem aditivos quanto no controlo com sal, sendo um dos motivos de certos trabalhos sugerirem o uso desta amina no controlo de qualidade da pescada europeia [18,82]. Nas amostras com salicórnia a amina mais abundante foi a histamina (17,9 ± 3,52 mg/kg) seguido da cadaverina (16,3 ± 1,13 mg/kg). Neste dia esses hambúrgueres apresentavam alterações sensoriais bem percetíveis, mas menos intensas que as amostras de salmão. A textura se apresentava mais amolecida, pouco firme, já com sinais de deterioração das fibras musculares. O odor também se encontrava alterado, com sinais claros de deterioração, que já seriam suficientes para a não aceitação da maioria dos consumidores.

De modo geral, as amostras de pescada apresentaram concentrações menores de aminas biogénicas se comparadas com as amostras de salmão. A cadaverina foi a amina mais abundante nas amostras dos dois tipos de peixe ao final de 8 dias, porém enquanto a pescada apresentou a maior concentração de 91,25 ± 6,79 mg/kg, no salmão foi de 245,5 ± 6,06 mg/kg, ambas no controlo sem adição de ingredientes.

Também é importante salientar que neste trabalho não foram realizadas análises microbiológicas, logo não foi possível determinar se o uso deste sal tem influência inibitória na microbiota encontrada neste alimento. Também não foi possível determinar a população bacteriana, mas nos dois tipos de hambúrguer já havia sinais claros de deterioração, logo no último dia e, mesmo sem os resultados das aminas biogénicas, já seria desaconselhável o seu consumo. A formulação dos hambúrgueres foi simplificada de modo a otimizar as análises e não foram utilizados conservantes, estabilizantes e outros aditivos que são utilizados em alguns produtos disponíveis no mercado, quando comercializados frescos. Além disso, diferentemente de outros estudos que utilizam outros tipos de embalagem, como o uso de atmosfera modificada, o objetivo das análises desta dissertação foi de analisar a formação das aminas biogénicas em um alimento que passa por uma manipulação maior (hambúrgueres), em temperaturas de refrigeração, que permitem um maior crescimento bacteriano, se comparado com o congelamento, e em condições aeróbias de armazenamento, que é a forma mais simples e tradicional de armazenamento deste tipo de alimento. Assim as condições seriam suficientes para o desenvolvimento

das aminas e a eficácia do uso do sal de salicórnia poderia ser avaliada nestes produtos.

Em algumas comparações feitas entre amostras com diferentes tratamentos, diferentes aminas, em dias distintos, foi possível notar que o uso do sal tradicional muitas vezes foi favorável a formação de aminas biogénicas, se comparado ao controlo sem aditivos, ou até não houve um efeito protetor significativo ($p<0,05$). Isso pode ser explicado devido a variabilidade que existe na microbiota encontrada em cada tipo de peixe [98,99]. Como não foram realizadas análises microbiológicas, não foi possível determinar o efeito que o sal exerceu sobre esses microrganismos.

Existem estudos que analisam os efeitos que compostos presentes em espécies vegetais podem exercer em diferentes alimentos. No trabalho de Kenar, Özogul e Kuley [41], os autores utilizaram alecrim e chá de sálvia em filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*) embalados á vácuo e demonstraram que nas amostras que receberam estes ingredientes houve uma inibição do crescimento bacteriano. Neste artigo os autores não analisaram o efeito em relação as aminas biogénicas, mas como o desenvolvimento das bactérias está diretamente ligado à formação de ABs, pode existir uma conexão entre eles; outros estudos poderiam ser feitos para determinar se também ocorre inibição na formação destas aminas.

No trabalho de Kuley, *et al* [95], os autores avaliaram o uso de extrato de cártamo (*Carthamus tinctorius*) e melão de São Caetano (*Momordica charantia L*.) como inibidor da proliferação bacteriana e formação de aminas biogénicas em caldo de peixe (*Scomber scombrus*). Os resultados apresentados revelaram a eficácia destes extratos na inibição de algumas espécies de bactérias, algumas delas já sendo conhecidas pela sua capacidade de formar aminas biogénicas. A eficácia destes extratos dependeu de qual espécie de bactéria foi testada. Essa variabilidade na eficácia dos extratos de vegetais na matriz alimentícia é um fator importante, já que a microbiota presente nos peixes pode variar não só entre espécies, como entre populações e indivíduos. Isso significa que o sal de salicórnia também possui esse potencial de ter ação inibitória em apenas certas espécies bacterianas, ou seja, um mesmo tipo de peixe testado com este sal pode ter resultados diferentes em relação a formação de aminas biogénicas, se a microbiota for diferente.

No trabalho de Cai, *et al* [96] os autores utilizaram óleos essenciais (cravo-da-índia, cominhos e hortelã-verde) em amostras de *red drum* ou corvinão-de-pintas (*Sciaenops ocellatus*) e avaliaram diferentes fatores que poderiam ser influenciados por estes óleos, incluindo aminas biogénicas. Os resultados demonstraram que os tratamentos utilizados levaram a uma menor formação de ABs, principalmente histamina, putrescina e cadaverina, o que pode levar a um aumento do período de validade e manutenção da qualidade destes alimentos.

No trabalho de Houicher*, et al* [97] os autores estudaram o efeito que extratos de hortelã-comum (*Mentha spicata L.)* e abrótano (*Artemisia campestris)* possuem na formação de aminas biogénicas em sardinhas (*Sardina pilchardus*) embaladas à vácuo. Os resultados demonstraram que as amostras tratadas com extrato de hortelã obtiveram uma menor produção de ABs, enquanto as amostras tratadas com extrato de abrótano apresentaram uma população bacteriana produtora de histamina controlada. Os autores sugerem o uso destes extratos em produtos com peixe para prolongar o período de validade destes.

No trabalho de Wang, et al [71], os autores desenvolveram um produto a base de peixe com adição de *Salicornia bigelovii*, outra espécie deste género, que assim como a *Salicornia ramosissima*, é uma espécie halófita, ou seja, é considerada uma planta com sabor natutalmente salgado. Neste trabalho, os autores apenas estudaram o desenvolvimento de um novo produto utilizando este vegetal e as características sensoriais deste, logo não foram realizadas análises referentes à formação de aminas biogénicas. Neste artigo, foi desenvolvido um produto com peixe moído, situação em que pode haver uma maior formação de ABs, já que há uma maior manipulação do alimento e um aumento da superfície de contato, isto é, maior quantidade de substrato fica suscetível a ação de microrganismos, podendo levar a um crescimento mais expressivo da população bacteriana, se comparado com produtos como filetes e postas [2]. Neste tipo de produto seria interessante analisar a formação de aminas biogénicas e avaliar a eficácia da *Salicornia bigelovii* na prevenção da formação destes compostos.

Na pescada as significâncias foram mais frequentes e mais intensas, ou seja, a diferença entre as médias dos resultados das amostras comparadas foi mais alta. Foi possível determinar uma diferença significativa na triptamina, no dia 2; na 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina, tiramina, soma total, soma das aminas alifáticas

e aromáticas nos dias 5 e 8 e soma das aminas heterocíclicas, nos dias 2, 5 e 8, podendo variar na intensidade dessa variação e nas categorias que foram comparadas e que apresentaram essas diferenças. Quando se analisa as diferenças das aminas que atingiram maiores concentrações como a cadaverina é possível perceber o impacto que a salicórnia teve nestas amostras.

Na Figura 13, em forma de gráficos, estão apresentados os resultados estatísticos nas amostras de pescada, com as diferenças significativas ($p<0,05$) identificadas com asterisco e uma linha entre as categorias que apresentaram essa diferença.

Nas amostras de pescada notou-se uma diferença entre as amostras na putrescina e, principalmente na cadaverina. Deste modo pode-se inferir que o uso da salicórnia nesta espécie de peixe pode ser eficaz no controlo destas aminas, que podem intensificar a toxicidade da histamina e que podem estar envolvidas em outras patologias, como cancro gástrico, devido a formação de nitrosaminas [13]. Na pescada, a presença da salicórnia parece ter produzido um efeito negativo na formação das aminas 2-feniletilamina e triptamina, já que nas amostras com sal de salicórnia as concentrações obtidas foram maiores do que as encontradas nos controlos (exceto na triptamina, onde as amostras com salicórnia obteve valores menores entre os aqueles dos controlos). Entretanto essas aminas atingiram concentrações muito baixas, mesmo no último dia de armazenamento, com valores abaixo de 1,5 mg/kg. De modo que a inibição que a salicórnia exerceu na cadaverina, que foi a amina que atingiu os maiores valores, ofereça uma vantagem mais relevante do que a desvantagem que possui em relação a estas aminas encontradas em menor concentração.

Atualmente, existem poucos artigos na literatura em que foram estudados os efeitos da *Salicornia ramosissima* na inibição da formação de aminas biogénicas em pescada europeia e outros produtos à base desta espécie.

A partir destes resultados é possível determinar a taxa de inibição que o sal de salicórnia exerceu nas amostras de pescada. A cadaverina foi a amina que alcançou as maiores concentrações. No quinto dia a inibição da cadaverina foi de 52,8% nas amostras com salicórnia se comparadas com as do controlo sem aditivos. Já no oitavo dia essa inibição foi de 20,4% e 82,1% nas amostras com salicórnia se comparadas

com o controlo com sal e controlo sem aditivos, respetivamente. Sendo possível dizer que a salicórnia levou a uma inibição considerável desta amina nas amostras de pescada.

Para trabalhos futuros seria interessante realizar análises microbiológicas juntamente com análises para quantificação das aminas biogénicas, pois alguns autores como Kuley, *et al* [95] relatam a existência de uma correlação entre a ação dos extratos de vegetais com diferentes espécies de bactérias, ou até mesmo diferentes estirpes. Dependendo dos microrganismos encontrados no peixe pode haver a inibição, um estímulo ou não haver efeito sobre a formação das aminas biogénicas.

7.3 Efeito do sal de salicórnia

Para visualizar se o sal de salicórnia poderia ter um efeito maior em um tipo de amina biogénica, foi feito um somatório das concentrações encontradas das diferentes aminas, a partir da classificação pela estrutura química: aminas alifáticas (cadaverina e putrescina), aminas aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e aminas heterocíclicas (histamina e triptamina). Na Figura 13 é possível visualizar a média das somas totais de cada um dos peixes (salmão e pescada), em que está representada se a diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,05$). Em relação à soma total apenas as amostras de pescada apresentaram esse tipo de diferença, sendo possível observar nesta figura, que houve significância entre o controlo sem aditivos e amostra com salicórnia no dia 5 e entre cada um dos tipos de tratamento no dia 8 (entre os controlos, entre o controlo sem aditivos e amostra com salicórnia e entre controlo com sal e amostra com salicórnia).

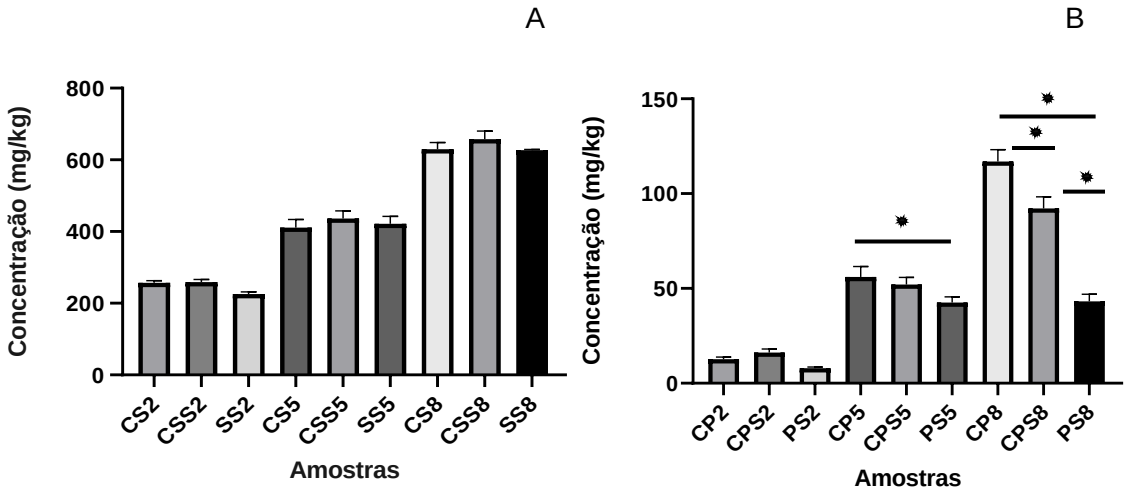


Figura 13 - Gráficos representativos do somatório da concentração de aminas biogénicas nas três condições estudadas. Sendo A: salmão e B: pescada, em mg/kg. * indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05). As amostras codificadas do salmão são: CS (controlo sem aditivos), CSS (controlo com sal) e SS (amostra com salicórnia), sendo os números 2, 5 e 8 correspondente ao dia de armazenamento. As amostras codificadas de pescada são: CP (controlo sem aditivos), CPS (controlo com sal) e PS (amostra com salicórnia), com os números também representando os dias de armazenamento.

Na Figura 14 visualiza-se as somas das aminas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas nas amostras de hambúrguer, com a diferença estatisticamente significativa (p<0,05) existente representada por um asterisco. Na Figura 15 visualiza-se as diferenças destas mesmas somas em amostras de pescada, sendo a diferença estatisticamente significativa representada por um asterisco, (p<0,05). Com isso foi possível visualizar se houve diferença na soma total das aminas e na soma entre as aminas pertencentes a mesma classificação de acordo com suas estruturas químicas.

Nas amostras de salmão do dia 2 não houve diferença significativa de acordo com a estatística (p<0,05) na soma das aminas alifáticas. Já no dia 5 percebeu-se uma diferença significativa (p<0,05) entre os controlos e entre o controlo sem aditivos e amostras com salicórnia, devido à influência que exerceu sobre a formação da cadaverina, que foi a amina que apresentou maiores concentrações neste grupo e nas aminas dos demais grupos (classificação por estrutura química). Isto se modificou no dia 8, quando as amostras de todos os tratamentos (controlos e amostra com salicórnia), apresentaram valores muito próximos. Nas aminas aromáticas e heterocíclicas não houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) em nenhum dos dias, em nenhum dos tratamentos. Esses resultados podem ser observados na Figura 15.

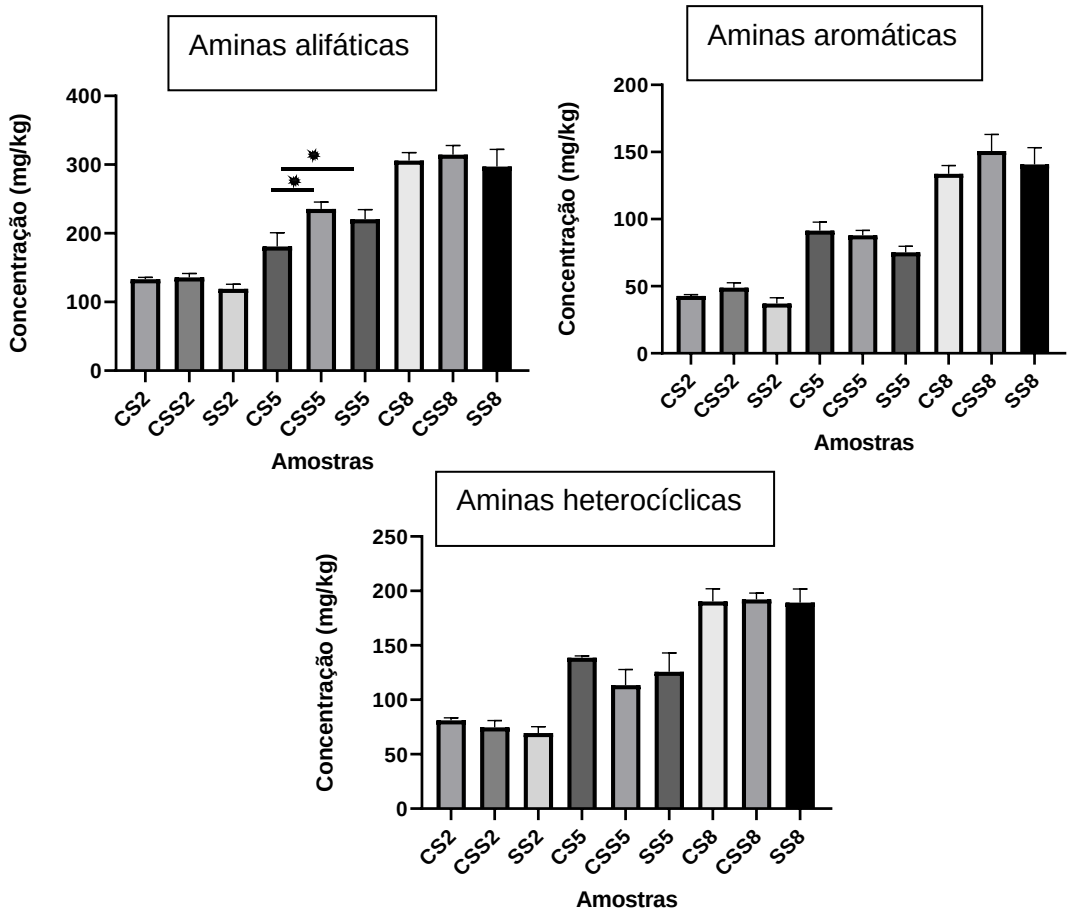


Figura 14 - Gráficos representativos do somatório de cada grupo de aminas biogénicas classificadas de acordo com sua estrutura química: aminas alifáticas (cadaverina e putrescina), aminas aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e aminas heterocíclicas (histamina e triptamina) nos três tratamentos analisados em amostras de salmão em mg/kg. * indica diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). As amostras codificadas do salmão são: CS (controlo sem aditivos), CSS (controlo com sal) e SS (amostra com salicórnia), sendo os números 2, 5 e 8 correspondente ao dia de armazenamento

Nas amostras de pescada foi possível visualizar uma diferença maior entre as somas de cada grupo de aminas biogénicas, sendo possível observar que estatisticamente essa diferença foi significativa ($p<0,05$). No dia 2 a soma das aminas heterocíclicas apresentou diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre o controlo com sal e amostra com salicórnia. No dia 5 as diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) foram observadas nas aminas alifáticas, entre controlo sem aditivos e amostra com salicórnia, por influência da cadaverina, principalmente; nas aminas aromáticas entre controlo sem aditivos e amostra com salicórnia e entre controlo com sal e amostra com salicórnia; nas aminas heterocíclicas observou-se

essa diferença entre os controlos. No dia 8 as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) foram identificadas nas aminas alifáticas (entre cada um dos tratamentos), nas aminas aromáticas (entre os controlos e entre controlo sem aditivos e amostra com salicórnia) e nas aminas heterocíclicas (entre os controlos e entre controlo sem aditivos e amostra com salicórnia). Essas informações podem ser observadas na Figura 15.

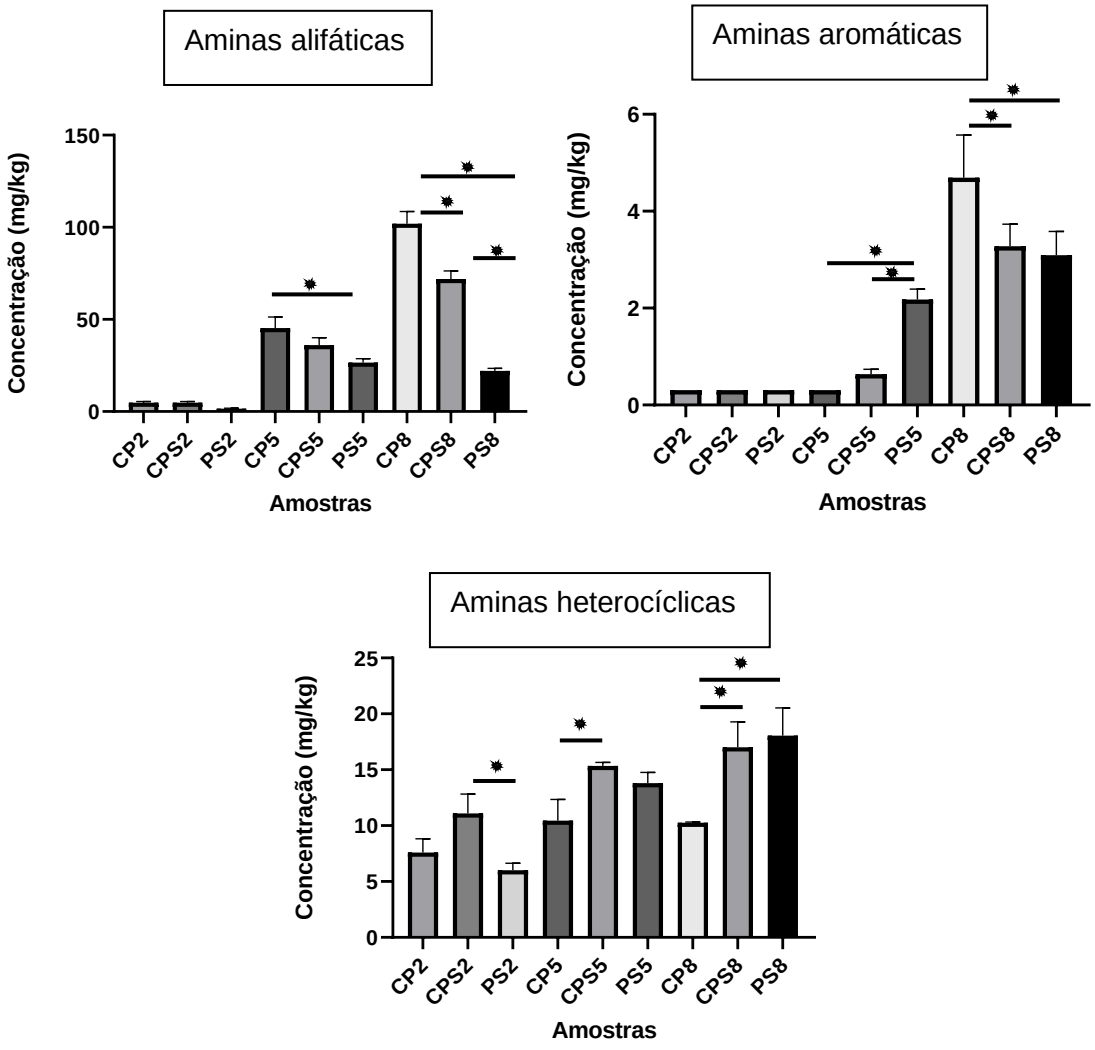


Figura 15 - Gráficos representativos do somatório de cada grupo de aminas biogénicas classificadas de acordo com sua estrutura química: aminas alifáticas (cadaverina e putrescina), aminas aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e aminas heterocíclicas (histamina e triptamina) nos três tratamentos analisados em amostras de pescada em mg/kg. * indica diferença estatisticamente significativa (p<0,05). As amostras codificadas de pescada são: CP (controlo sem aditivos), CPS (controlo com sal) e PS (amostra com salicórnia), com os números representando os dias de armazenamento (dias 2, 5 e 8).

A partir dessas informações foi possível observar que a salicórnia apresentou maior potencial antiaminogénico na pescada e, principalmente, sobre a formação da cadaverina.

Conclusão

Foi possível observar diferenças na formação das aminas biogénicas nas amostras dos três tratamentos utilizados (controlo sem aditivos, controlo com sal e amostra com salicórnia), nos dois tipos de hambúrgueres (salmão-do-Atlântico e pescada europeia). A análise estatística indicou que nos hambúrgueres de salmão só existiam diferenças significativas ($p<0,05$) apenas na 2-feniletilamina no oitavo dia e na cadaverina no quinto dia, não possuindo influência na histamina, que é a única amina com limites máximos determinados pela legislação. Já na pescada verificam-se diferenças significativas, principalmente a partir do quinto dia de armazenamento, na 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina e tiramina e no total de aminas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, especialmente no quinto e oitavo dia de armazenamento.

O uso da salicórnia em formulações de hambúrgueres de pescada tem potencial de proteção na formação destas aminas, um potencial antibiogénico. Como a eficácia só pode ser notada a partir do quinto dia de armazenamento, a salicórnia deverá ser utilizada em conjunto com outros processos que permitam a conservação deste alimento por mais tempo, tais como a utilização de atmosfera protetora ou armazenamento em temperaturas baixas, de modo a diminuir a proliferação bacteriana e aumentando o período de validade do produto.

Comparando a formação de aminas biogénicas nas amostras de hambúrgueres de pescada com sal e nas amostras com salicórnia na pescada verificaram-se vantagens no seu uso, principalmente a partir do quinto dia de armazenamento, na putrescina e cadaverina, que foram duas das três aminas mais produzidas nas

amostras deste peixe. No caso da cadaverina houve uma diferença muito significativa entre amostras com salicórnia e controlo sem aditivos já no quinto dia, diferenças que ainda foram vistas no dia 8. Nas amostras de pescada nenhuma ultrapassou o limite máximo da histamina, porém as amostras com altas concentrações de putrescina e cadaverina podem causar quadros de intoxicação em pessoas mais sensíveis, mesmo com níveis baixos de histamina, já que estas aminas interferem no sistema de detoxificação, podendo aumentar sua toxicidade [35]. Logo, conclui-se que o controlo na formação desta putrescina e cadaverina, é importante para diminuir os efeitos tóxicos que o consumo da histamina, mesmo em concentrações baixas, pode causar nos consumidores. Mesmo que o sal de salicórnia não forneça uma proteção em relação à formação da histamina, seu uso pode auxiliar na inibição da formação destas outras aminas que, indiretamente, podem levar a quadros de intoxicação com severidade variável.

Os motivos para essa proteção ter apenas ocorrido na pescada pode estar relacionado a características inerentes da espécie, como composição dos aminoácidos na musculatura; microbiota presente nos peixes, cuja suscetibilidade aos compostos do sal de salicórnia pode variar; composição lipídica das espécies; características da fisiologia de cada espécie; época do ano; entre outros. Outros estudos seriam necessários para determinar este(s) motivo(s) e até se esse efeito ocorre em outras espécies, principalmente aquelas com características parecidas com as da pescada europeia.

Neste trabalho a salicórnia foi utilizada em uma quantidade exata para que a proporção de sódio fosse o mesmo do sal tradicional, já que objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade que o sal de salicórnia possui em proteger o alimento da produção de aminas biogénicas. Porém, outros estudos podem ser feitos, comparando amostras com diferentes concentrações de salicórnia e controlo com cloreto de sódio, para verificar se concentrações menores do sal de salicórnia apresentam o mesmo efeito. Se este efeito permanecer mesmo em concentrações menores deste sal, será mais uma vantagem para a substituição do sal tradicional por ele. Além de promover uma diminuição do consumo de sódio poderia evitar a formação destas aminas, algo importante para a qualidade e segurança dos alimentos.

Como não foram realizadas análises microbiológicas seria interessante se, no futuro, este tipo de pesquisa fosse desenvolvido, de modo a entender o impacto que

este sal possui na população de microrganismos, seja diminuindo-a ou alterando-a, já que pode ser função inibitória apenas para algumas espécies. Além disso, pode-se analisar se este sal também pode ter a capacidade de controlar a formação de outros compostos indesejáveis, como por exemplo formação de certos compostos após a preparação do alimento, em que se poderia utilizar o mesmo tipo de amostra (hambúrgueres de peixe). Assim a vantagem do seu uso poderia ir além do seu potencial de substituição do cloreto de sódio, poderia ser também na prevenção da formação destes compostos nocivos.

Referências bibliográficas

1. Jinadasa, B.K.K.K.; Jayasinghe, G.D.T.M.; Ahmad, S.B.N. Validation of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Quantitative Analysis of Histamine in Fish and Fishery Products. *Cogent Chem* **2016**, *2*, 1156806, doi:10.1080/23312009.2016.1156806.

2. Arulkumar, A.; Paramithiotis, S.; Paramasivam, S. Biogenic Amines in Fresh Fish and Fishery Products and Emerging Control. *Aquac Fish* **2021**, doi:10.1016/j.aaf.2021.02.001.

3. Visciano, P.; Schirone, M.; Paparella, A. An Overview of Histamine and Other Biogenic Amines in Fish and Fish Products. *Foods* **2020**, *9*.

4. Zhai, H.; Yang, X.; Li, L.; Xia, G.; Cen, J.; Huang, H.; Hao, S. Biogenic Amines in Commercial Fish and Fish Products Sold in Southern China. *Food Control* **2012**, *25*, 303–308, doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.057.

5. Arulkumar, A.; Paramasivam, S.; Rameshthangam, P.; Paramithiotis, S. Detection of Biogenic Amines in Indian Fish and Fishery Products Consumed in Southeast Coast

Region of India. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **2021**, *30*, 95–106, doi:10.1080/10498850.2020.1856262.

6. Souza, A.L.M. de; Calixto, F.A.A.; Mesquita, E. de F.M. de; Packness, M. da P.; Azeredo, D.P. Histamina e Rastreamento de Pescado: Revisão de Literatura. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* **2016**, *82*, doi:10.1590/1808-1657000382013.

7. Tabanelli, G.; Montanari, C.; Gardini, F. Biogenic Amines in Food: A Review of Factors Affecting Their Formation. *Reference Module in Food Science* **2018**, 1–7.

8. Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogué, M.T.; Mariné -Font, A.; Vidal-Carou, M.C. *Biogenic Amine Index for Freshness Evaluation in Iced Mediterranean Hake (Merluccius Merluccius)*; **2005**; Vol. 68;.

9. Bangieva, D.; Stratev, D.; Stoyanchev, T. Histamine Level in Freshwater and Marine Fish Sold in Bulgarian Markets. *J Food Qual Hazards Control* **2020**, *7*, 196–199, doi:10.18502/jfqhc.7.4.4848.

10. Hwang, C.C.; Tseng, P.H.; Lee, Y.C.; Kung, H.F.; Huang, C.Y.; Chen, H.C.; Tsai, Y.H. Determination of Histamine in Japanese Spanish Mackerel (Scomberomorus Niphonius) Meat Implicated in a Foodborne Poisoning. *J Food Prot* **2019**, *82*, 1643–1649, doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-111.

11. Magro, S. lo; Summa, S.; Iammarino, M.; D'antini, P.; Marchesani, G.; Chiaravalle, A.E.; Muscarella, M. A 5-Years (2015–2019) Control Activity of an Eu Laboratory: Contamination of Histamine in Fish Products and Exposure Assessment. *Applied Sciences (Switzerland)* **2020**, *10*, 1–17, doi:10.3390/app10238693.

12. WHO/FAO *Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting Report*; **2013** ISBN 9789241564670.

13. El-Ghareeb, W.R.; Elhelaly, A.E.; Abdallah, K.M.E.; El-Sherbiny, H.M.M.; Darwish, W.S. Formation of Biogenic Amines in Fish: Dietary Intakes and Health Risk Assessment. *Food Sci Nutr* **2021**, *9*, 3123–3129, doi:10.1002/fsn3.2271.

14. Galgano, F.; Caruso, M.; Condelli, N.; Favati, F. Focused Review: Agmatine in Fermented Foods. *Front Microbiol* **2012**, *3*, doi:10.3389/fmicb.2012.00199.

15. Lizandro, R.; Peterson Pereira, J.; Garus Saint Clair, A.; Carlos, J. *Compostos nitrogenados do vinho: fatores envolvidos na formação de aminoácidos e aminas biogênicas*; **2012**; Vol. 12;.

16. Debeer, J.; Bell, J.W.; Nolte, F.; Arcieri, J.; Correa, G. Histamine Limits by Country: A Survey and Review. *J Food Prot* **2021**, *84*, 1610–1628.

17. Lapa-Guimarães, J.; Pickova, J. New Solvent Systems for Thin-Layer Chromatographic Determination of Nine Biogenic Amines in Fish and Squid. *J Chromatogr A* **2004**, *1045*, 223–232, doi:10.1016/j.chroma.2004.06.014.

18. Ruiz-Capillas, C.; Moral, A. Effect of Controlled Atmospheres Enriched with O2 in Formation of Biogenic Amines in Chilled Hake (Merluccius Merluccius L.). *European Food Research and Technology* **2001**, *212*, 546–550, doi:10.1007/s002170100287.

19. Lv, L.; Liang, X.F.; Huang, K.; He, S. Effect of Agmatine on Food Intake in Mandarin Fish (Siniperca Chuatsi). *Fish Physiol Biochem* **2019**, *45*, 1709–1716, doi:10.1007/s10695-019-00659-w.

20. Hariri, O. el; Bouchriti, N.; Bengueddour, R. Risk Assessment of Histamine in Chilled, Frozen, Canned and Semi-Preserved Fish in Morocco; Implementation of Risk Ranger and Recommendations to Risk Managers. *Foods* **2018**, *7*, doi:10.3390/foods7100157.

21. Muscarella, M.; lo Magro, S.; Campaniello, M.; Armentano, A.; Stacchini, P. Survey of Histamine Levels in Fresh Fish and Fish Products Collected in Puglia (Italy) by ELISA and HPLC with Fluorimetric Detection. *Food Control* **2013**, *31*, 211–217, doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.013.

22. Yesudhason, P.; Al-Zidjali, M.; Al-Zidjali, A.; Al-Busaidi, M.; Al-Waili, A.; Al-Mazrooei, N.; Al-Habsi, S. Histamine Levels in Commercially Important Fresh and Processed Fish of Oman with Reference to International Standards. *Food Chemistry*; **2013**; Vol. 140, pp. 777–783.

23. Self, R.L.; Wu, W.H.; Marks, H.S. Simultaneous Quantification of Eight Biogenic Amine Compounds in Tuna by Matrix Solid-Phase Dispersion Followed by HPLC-Orbitrap Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **2011**, *59*, 5906–5913, doi:10.1021/jf200455r.

24. Pawul-Gruba, M.; Michalski, M.; Osek, J. Determination of Histamine in Fresh and Smoked Fish Commercially Available in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **2014**, *58*, 301–304, doi:10.2478/bvip-2014-0046.

25. Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, T.; Vidal-Carou, M.C. Chemical and Sensory Changes in Mediterranean Hake (Merluccius Merluccius) under Refrigeration (6-8 °C) and Stored in Ice. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 6504–6510, doi:10.1021/jf025615p.

26. Evangelista, W.P.; Silva, T.M.; Guidi, L.R.; Tette, P.A.S.; Byrro, R.M.D.; Santiago-Silva, P.; Fernandes, C.; Gloria, M.B.A. Quality Assurance of Histamine Analysis in Fresh and Canned Fish. *Food Chem* **2016**, *211*, 100–106, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.035.

27. Visciano, P.; Schirone, M.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Histamine Poisoning and Control Measures in Fish and Fishery Products. *Front Microbiol* 2014, *5*, doi: 10.3389/fmicb.2014.00500.

28. Cicero, A.; Cammilleri, G.; Galluzzo, F.G.; Calabrese, I.; Pulvirenti, A.; Giangrosso, G.; Cicero, N.; Cumbo, V.; Vella, A.; MacAluso, A.; et al. Histamine in Fish Products Randomly Collected in Southern Italy: A 6-Year Study. *J Food Prot* **2020**, *83*, 241–248, doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-305.

29. Vosikis, V.; Papageorgopoulou, A.; Economou, V.; Frillingos, S.; Papadopoulou, C. Survey of the Histamine Content in Fish Samples Randomly Selected from the Greek Retail Market. *Food Addit Contam Part B Surveill* **2008**, *1*, 122–129, doi:10.1080/02652030802527147.

30. da Silva, M. v.; Gibbs, P. Significance of Biogenic Amines in Cold-Smoked Fish and Their Relation to Microbiological Characteristics of Products Available in Portuguese Retail Markets. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*; **2015;** *78*: 13-14, pp. 945–957, DOI: 10.1080/15287394.2015.1051206

31. Silva, T.M.; Sabaini, P.S.; Evangelista, W.P.; Gloria, M.B.A. Occurrence of Histamine in Brazilian Fresh and Canned Tuna. *Food Control* **2011**, *22*, 323–327, doi:10.1016/j.foodcont.2010.07.031.

32. da Silva, M. v; Pinho, O.; Ferreira, I.; Plestilová, L.; Gibbs, P.A. Production of Histamine and Tyramine by Bacteria Isolated from Portuguese Vacuum-Packed Cold-Smoked Fish. *Food Control* **2002**, *13*, 457–461, doi:10.1016/S0956-7135(01)00081-0.

33. Sagratini, G.; Fernández-Franzón, M.; de Berardinis, F.; Font, G.; Vittori, S.; Mañes, J. Simultaneous Determination of Eight Underivatised Biogenic Amines in Fish by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem* **2012**, *132*, 537–543, doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.054.

34. Kočar, D.; Köse, S.; Tufan, B.; Ščavničar, A.; Pompe, M. Determination of Biogenic Amines in Fresh Fish and Processed Fish Products Using Ic-Ms/Ms. *Foods* **2021**, *10*, doi:10.3390/foods10081746.

35. Silla Santos, M.H. Biogenic Amines: Their Importance in Foods . *Int J Food Microbiol* **1996**, *29*, 213–231.

36. Ochi, N. Simultaneous Determination of Eight Underivatized Biogenic Amines in Salted Mackerel Fillet by Ion-Pair Solid-Phase Extraction and Volatile Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2019**, *1601*, 115–120, doi:10.1016/j.chroma.2019.06.027.

37. Veciana-Nogués, M.T.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C. Biogenic Amines in Fresh and Canned Tuna. Effects of Canning on Biogenic Amine Contents. *J Agric Food Chem* **1997**, *45*, 4324–4328, doi:10.1021/jf970092k.

38. Gonçalves, A.A. *Tecnologia Do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação*; Editora Atheneu: São Paulo, 2011,p. 12-14 e 156-165; ISBN 978-85-388-0197-9.

39. Ruiz-Capillas, C.; Moral, A. Effect of Controlled and Modified Atmospheres on the Production of Biogenic Amines and Free Amino Acids during Storage of Hake. *European Food Research and Technology* **2002**, *214*, 476–481, doi:10.1007/s00217-001-0483-9.

40. Wu, T.H.; Bechtel, P.J.; Bower, C.K. Effects of Delayed Processing of Pink Salmon (Oncorhynchus Gorbuscha) by-Products on Fishmeal Quality. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **2009**, *18*, 345–359, doi:10.1080/10498850903224299.

41. Kenar, M.; Özogul, F.; Kuley, E. Effects of Rosemary and Sage Tea Extracts on the Sensory, Chemical and Microbiological Changes of Vacuum-Packed and Refrigerated

Sardine (Sardina Pilchardus) Fillets. *Int J Food Sci Technol* **2010**, *45*, 2366–2372, doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02414.x.

42. Tao, Z.; Sato, M.; Zhang, H.; Yamaguchi, T.; Nakano, T. A Survey of Histamine Content in Seafood Sold in Markets of Nine Countries. *Food Control* **2011**, *22*, 430–432, doi:10.1016/j.foodcont.2010.09.018.

43. Mercogliano, R.; Santonicola, S. Scombroid Fish Poisoning: Factors Influencing the Production of Histamine in Tuna Supply Chain. A Review. *LWT* **2019**, *114*.

44. Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 338/2, 22.12.2005

45. RASFF Window. **2022**. Disponível em: https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search (Acesso em 8 de fevereiro de 2022)

46. Altieri, I.; Semeraro, A.; Scalise, F.; Calderari, I.; Stacchini, P. European Official Control of Food: Determination of Histamine in Fish Products by a HPLC-UV-DAD Method. *Food Chem* **2016**, *211*, 694–699, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.111.

47. Damasceno Silva, P. *Determinação de Compostos Fenólicos Por HPLC*; Covilhã, Outubro de **2012,** Universidade da Beira Interior. Dissertação para obtenção do Grau de mestre em Química Industrial

48. Domingos, C.R.M. Validação de um método de HPLC para análise de conteúdo em comprimidos. **2011**, Universidade de Aveiro – Departamento de Química. Dissertação para obtençõa do grau de Mestre em Bioquímica.

49. Meyer, Veronika. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*; John Wiley, 2004; ISBN 0470093773.

50. Swartz, M. HPLC detectors: a brief review. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **2010**, *33*, 1130–1150, doi:10.1080/10826076.2010.484356.

51. Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal da União Europeia,* 7.12.2007

52. Regulamento (UE) N.º 1019/2013 da Comissão de 23 de outubro de 2013, que altera o anexo I do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 no que se refere à histamina em produtos da pesca. *Jornal da União Europeia,* L 282/46, 24.10.2013

53. BRASIL, Instrução Normativa Nº 60*,* de 23 de Dezembro de 2019; Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, 249: 1; p. 133. Publicado em 26.12.2019.

54. FDA, Grant, F.S. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition – June **2021***; 4ª edição.

55. Martins, Rogélia e Carneiro, Miguel P. *Manual de identificação de peixes ósseos da costa continental portuguesa: Principais Características Diagnosticantes*; IPMA, Lisboa, **2018**; 204p, ISBN 9789729083198.

56. Fishbase Peixe-Espada-Preto (*Nesiarchus nasutus*). Disponível em: https://www.fishbase.se/summary/7573 (Acesso em 20 setembro 2022).

57. Fishbase Espadarte-Veleiro (*Istiophorus albicans*). Disponível em: https://www.fishbase.se/summary/78 (Acesso em 20 setembro 2022).

58. Fishbase Espadarte-Branco (*Kajikia albida*). Disponível em: https://www.fishbase.de/summary/219. (Acesso em 20 de setembro de 2022)

59. Goulding, I.; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization *Histamine in Salmonids : Joint FAO/WHO Literature Review*; ISBN 9789251308882.

60. di Toro, J.; Branciari, R.; Roila, R.; Altissimi, S.; Jang, H.; Zhou, K.; Perucci, S.; Codini, M.; Ranucci, D. Efficacy of an Aromatic Vinegar in Reducing Psychrotrophic Bacteria and Biogenic Amines in Salmon Fillets (Salmo Salar) Stored in Modified Atmosphere Packaging. *Pol J Food Nutr Sci* **2019**, *69*, 397–405, doi:10.31883/pjfns/112643.

61. Auerswald, L.; Morren, C.; Lopata, A.L. Histamine Levels in Seventeen Species of Fresh and Processed South African Seafood. *Food Chem* **2006**, *98*, 231–239, doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.071.

62. Isca, V.M.S.; Seca, A.M.L.; Pinto, D.C.G.A.; Silva, H.; Silva, A.M.S. Lipophilic Profile of the Edible Halophyte Salicornia Ramosissima. *Food Chem* **2014**, *165*, 330–336, doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.117.

63. Cardoso, M.; Silva, H.; Patinha, C.; Costa, N.; Nunes, S.; Cunha, Â. From the Saltpan to the Plate: An Evaluation of the Use of the Edible Halophyte Salicornia Ramosissima in Catering. *Annals of Applied Biology* **2022**, *180*, 99–108, doi:10.1111/aab.12714.

64. Lopes, M.; Roque, M.J.; Cavaleiro, C.; Ramos, F. Nutrient Value of Salicornia Ramosissima—A Green Extraction Process for Mineral Analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* **2021**, *104*, doi:10.1016/j.jfca.2021.104135.

65. Barreira, L.; Resek, E.; Rodrigues, M.J.; Rocha, M.I.; Pereira, H.; Bandarra, N.; da Silva, M.M.; Varela, J.; Custódio, L. Halophytes: Gourmet Food with Nutritional Health Benefits? *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, *59*, 35–42, doi:10.1016/j.jfca.2017.02.003.

66. Oliveira-Alves, S.C.; Andrade, F.; Prazeres, I.; Silva, A.B.; Capelo, J.; Duarte, B.; Caçador, I.; Coelho, J.; Serra, A.T.; Bronze, M.R. Impact of Drying Processes on the Nutritional Composition, Volatile Profile, Phytochemical Content and Bioactivity of Salicornia Ramosissima j. Woods. *Antioxidants* **2021**, *10*, doi:10.3390/antiox10081312.

67. Lopes, M.; Cavaleiro, C.; Ramos, F. Sodium Reduction in Bread: A Role for Glasswort (*Salicornia Ramosissima* J. Woods). *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2017**, *16*, 1056–1071, doi:10.1111/1541-4337.12277.

68. WHO *Reducing Salt Intake in Populations: Report of a WHO Forum and Technical Meeting 5-7 October 2006, Paris, France*; **2007,** ISBN: 978 92 4 159537 7

69. Sociedade Portuguesa de Hipertensão. *Sal e Hipertensão Arterial*. Disponível em: http://www.sphta.org.pt/pt/base8_detail/25/105 (Acesso em 19 Setembro 2022).

70. DGS: Promoção da Alimentação Saudável Programa Nacional da Direção Geral da Saúde, *Sal.* Disponível em: https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/nutriente/sal/ (Acesso em 19 Setembro 2022).

71. Wang, L.; Zhang, M.; Mujumdar, A.S.; Wang, Y.; Zhu, C. Restructured Crispy Fish Cubes Containing Salicornia Bigelovii Torr. Developed with Microwave Vacuum Drying.

Journal of Aquatic Food Product Technology **2013**, *22*, 226–240, doi:10.1080/10498850.2011.641672.

72. PortFIR – INSA. Disponível em: https://portfir-insa.min-saude.pt/# (Acesso em 13 setembro de 2022).

73. World Register of Marine Species - *Salmo Salar* Linnaeus, 1758. Disponível em: https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=127186 (Acesso em 14 março de 2022).

74. FAO - Fisheries and Aquaculture: Salmo Salar. Disponível em: https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/salmo_salar/en (Acesso em 8 fevereiro de 2022).

75. Fishbase: *Salmo salar*. Disponível em: https://www.fishbase.se/summary/salmo-salar.html (Acesso em 7 de fevereiro de 2022).

76. Comissão Europeia: *Merluccius merluccius* Disponível em: https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_pt?sn=22428 (Acesso em 8 fevereiro de 2022).

77. Fishbase: *Merluccius merluccius.* Disponível em: https://www.fishbase.se/summary/Merluccius-merluccius.html (Acesso em 8 fevereiro de 2022).

78. World Register of Marine Species - *Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758. Disponível em: https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=126484 (Acesso em 14 março de 2022).

79. Dondero, M.; Cisternas, F.; Carvajal, L.; Simpson, R. Changes in Quality of Vacuum-Packed Cold-Smoked Salmon (Salmo Salar) as a Function of Storage Temperature. *Food Chem* **2004**, *87*, 543–550, doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.005.

80. Emborg, J.; Laursen, B.G.; Rathjen, T.; Dalgaard, P. Microbial Spoilage and Formation of Biogenic Amines in Fresh and Thawed Modified Atmosphere-Packed Salmon (Salmo Salar) at 2oC. *J Appl Microbiol* **2002**, *92*, 790–799, doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01588.x.

81. Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Vidal-Carou, M.C.; Veciana-Nogues, M.T. Volatile and Nonvolatile Amines in Mediterranean Hake as Function of Their Storage Temperature. *J Food Sci* **2001**, *66*, 83–88, doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb15586.x.

82. Ruiz-Capillas, C.; Moral, A. Production of Biogenic Amines and Their Potential Use as Quality Control Indices for Hake (Merluccius Merluccius, L.) Stored in Ice. *J Food Sci* **2001**, *66*, 1030–1032, doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb08230.x.

83. EFSA - Statement on the Benefits of Fish/Seafood Consumption Compared to the Risks of Methylmercury in Fish/Seafood. *EFSA Journal* **2015**, *13*, doi:10.2903/j.efsa.2015.3982.

84. Galvão, J.A.; Oetterer, M. *Qualidade e Processamento de Pescado*; 2ª edição.; Elsevier: Rio de Janeiro, 2014, p. 32-36; ISBN 978-85-352-7607-7.

85. Mah, J.-H.; Han, H.-K.; Oh, Y.-J.; Kim, M.-G.; Hwang, H.-J. *Biogenic Amines in Jeotkals, Korean Salted and Fermented Fish Products*; *Food chemistry* **2002**, *79*, 239-243.

86. Ben-Gigirey, B.; Vieites Baptista de Sousa, J.M.; Villa, T.G.; Barros-Velazquez, J. Changes in Biogenic Amines and Microbiological Analysis in Albacore (Thunnus Alalunga) Muscle during Frozen Storage. *J Food Prot* **1998**, *61*, 608–615, doi:10.4315/0362-028X-61.5.608.

87. Pinto, E; Almeida, A. A.; Aguiar, A. A. R. M. e Ferreira, I. M. P. L. V. O. Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: Influence of soil composition. *Food Chemistry***, 2014,** *152*, 603-611, doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.023

88. Ruiz-Capillas, C.; Triki, M.; de Las Heras, C.; Tejada, M.; Pálmadóttir, H.; Porvaldsdóttir, R.; Jiménez-Colmenero, F.; Herrero, A.M. Essay of Different Extraction Procedures in Capelin Fish Meal for Biogenic Amine Determination by HPLC. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **2015**, *24*, 443–453, doi:10.1080/10498850.2013.787482.

89. Liu, Y.; Han, F.; Liu, Y.; Wang, W. Determination of Biogenic Amines in Wine Using Modified Liquid-Liquid Extraction with High Performance Liquid Chromatography-

Fluorescence Detector. *Food Anal Methods* **2020**, *13*, 911–922, doi:10.1007/s12161-020-01710-w.

90. FDA - *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry Nonbinding Recommendations*; **2018**;

91. Viegas, O.; Esteves, C.; Rocha, J.; Melo, A.; Ferreira, I.M.P.L.V.O. Simultaneous Determination of Melatonin and Trans-Resveratrol in Wine by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by HPLC-FLD. *Food Chem* **2021**, *339*, 128091, doi:10.1016/j.foodchem.2020.128091.

92. Moreno-González, D.; Huertas-Pérez, J.F.; Gámiz-Gracia, L.; García-Campaña, A.M. High-Throughput Methodology for the Determination of 33 Carbamates in Herbal Products by UHPLC–MS/MS. *Food Anal Methods* **2015**, *8*, 2059–2068, doi:10.1007/s12161-014-9998-0.

93. FDA - *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*; **2001**

94. ICH – Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), **2005**

95. Kuley, E., Yavuzer, M. N., Yavuzer, E., Durmuş, M., Yazgan, H., Gezginç, Y, Özogul, F. Inhibitory effects of safflower and bitter melon extracts on biogenic amine formation by fish spoilage bacteria and food borne pathogens. *Food Bioscience*, **2019,** *32*, 10478, https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100478

96. Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., Li, J. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. *Food Control,* **2015,** *56*, p. 1-8, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.009

97. Houicher, A., Kuley, E., Özogul, F., Bendeddouche, B. Effect of Natural Extracts (*Mentha spicata* L. and *Artemisia campestris*) on Biogenic Amine Formation of Sardine Vacuum-Packed and Refrigerated (*Sardina pilchardus*) Fillets. *Journal of Food Processing and Preservation,* **2015**, *39*:6, p. 2393-2403, https://doi.org/10.1111/jfpp.12489

98. Vatsos, I. N. Standardizing the microbiota of fish used in research. *Laboratory Animals,* **2017**, *51(4)*, 353-364, doi: 10.1177/0023677216678825

99. Minniti, G., Hagen, L. H., Porcellato, D., Jørgensen, S. M., Pope, P. B. e Vaaje-Kolstad, G. The Skin-Mucus Microbial Community of Farmed Atlantic Salmon (Salmo salar). Front. Microbiol., 2017, 8:2043, doi: 10.3389/fmicb.2017.02043