

**WARLEY PINHEIRO EVANGELISTA**

**CONTROLE DA QUALIDADE DO ENSAIO DE  
HISTAMINA EM PESCADO**

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2015**

**WARLEY PINHEIRO EVANGELISTA**

# **CONTROLE DA QUALIDADE DO ENSAIO DE HISTAMINA EM PESCADO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial à obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória  
Co-orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG  
Faculdade de Farmácia  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA


**WARLEY PINHEIRO EVANGELISTA**


**CONTROLE DA QUALIDADE DO ENSAIO DE HISTAMINA EM PESCADO**

TESE APROVADA EM 24 DE SETEMBRO DE 2015


**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Profa. Dra. **MARIA JOSÉ DE SENA**

  
Profa. Dra. **JULIANA CRISTINA SAMPAIO RIGUEIRA UBALDO**

  
Prof. Dr. **LEANDRO SOARES DE OLIVEIRA**

  
Prof. Dr. **CHRISTIAN FERNANDES**  
Coorientador

  
Profa. Dra. **RAQUEL LINHARES BELLO DE ARAÚJO**

  
Profa. Dra. **MARIA BEATRIZ DE ABREU GLÓRIA**  
Orientadora e Presidente da Comissão

*Dedico este trabalho aos meus pais Aparecida e José Rodrigues, ao meu irmão Léo Max e à minha esposa Luziana pelos valores e sonhos compartilhados.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por guiar meu caminho.

Aos meus pais Aparecida e José Rodrigues, pelo amor incondicional, incentivo aos estudos e pelo esforço em proporcionarem sempre o melhor.

À Luziana, pelo amor, compreensão e incentivo em todos os momentos. Sua dedicação aos estudos me inspira!

Aos meus padrinhos Léo Max e Mariana, pelo companheirismo e apoio.

À Professora Dr<sup>a</sup> Maria Beatriz Abreu Glória, pelos constantes ensinamentos, apoio, amizade e orientação em todas as etapas deste trabalho. Pelo exemplo de dedicação e competência.

Ao Professor Dr Christian Fernandes, pela disponibilidade, ensinamentos e pelas importantes contribuições ao trabalho.

Às amigas Patrícia e Letícia, pela amizade e apoio constante na finalização deste trabalho.

Aos colegas do LBqA, Andrezza, Bruno Dala Paula, Carol Paiva, Cecília Bandeira, Edineia Xavier, Flávia Beatriz, Gisela, Guilherme, José Maria, Larissa Bomtempo, Laura Ciribelli, Paula Santiago, Raquel Braga, Regina Carvalho, Ricardo Byrro e Rummenigge, pelos momentos agradáveis, amizade, sugestões.

Aos membros da banca examinadora pela participação e colaboração para a finalização deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
	<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	10
	<b>RESUMO</b> .....	11
	<b>ABSTRACT</b> .....	12
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
3.1	<b>PESCADOS</b> .....	16
3.1.1	Atuns e afins.....	17
3.1.2	Produção de pescado no Brasil e no mundo.....	18
3.1.3	Deterioração de pescado.....	21
3.1.4	Aminas em pescado.....	22
3.1.5	Aspectos toxicológicos das aminas biogênicas.....	26
3.1.6	Aminas biogênicas como critério de qualidade de peixes.....	29
3.2	<b>METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS EM PESCADO</b> .....	30
3.2.1	Determinação de aminas bioativas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	31
3.2.1.1	Extração.....	31
3.2.1.2	Deteção.....	32
3.2.1.3	Separação.....	33
3.2.2	Análise de aminas por métodos rápidos.....	33
3.3	<b>GARANTIA DA QUALIDADE DE RESULTADOS ANALITICOS</b> .....	35
	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	39
	<b>CAPÍTULO I - VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA</b> .....	40
I.1	<b>OBJETIVO</b> .....	40
I.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
I.2.1	<b>MATERIAL</b> .....	40
I.2.1.1	Amostras.....	40
I.2.1.2	Reagentes e solventes.....	40
I.2.1.3	Soluções.....	41
I.2.1.3.1	Solução padrão das aminas.....	41
I.2.1.3.2	Fases móveis para a cromatografia.....	41
I.2.1.3.3	Solução derivante.....	42
I.2.2	<b>MÉTODOS</b> .....	42
I.2.2.1	Validação do método.....	42
I.2.2.2	Estimativa da incerteza de medição.....	44
I.2.2.3	Determinação de histamina em pescado.....	44
I.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46

I.3.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	46
I.3.2	ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	48
I.3.3	DETERMINAÇÃO DA HISTAMINA EM PESCADO.....	49
I.4	CONCLUSÕES.....	50

**CAPÍTULO II - GARANTIA DA QUALIDADE DE RESULTADO DO ENSAIO DE HISTAMINA EM ATUNS E AFINS DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS.....** 51

II.1	OBJETIVO.....	51
II.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
II.2.1	MATERIAL.....	51
II.2.1.1	Amostras.....	51
II.2.1.2	Reagentes e solventes.....	51
II.2.2	MÉTODOS.....	52
II.2.2.1	Determinação da histamina.....	52
II.2.2.2	Técnicas de controle da qualidade.....	52
II.2.2.2.1	Ensaio de recuperação/adição de padrão.....	52
II.2.2.2.2	Carta controle para a porcentagem de recuperação.....	53
II.2.2.2.3	Cálculo do fator de correção do padrão.....	54
II.2.2.2.4	Estudo de estabilidade de soluções.....	54
II.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
II.3.1	CARTA CONTROLE PARA A RECUPERAÇÃO.....	56
II.3.2	ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES.....	56
II.3.2.1	Solução Tampão usada como fase móvel.....	56
II.3.2.2	Solução KOH/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	57
II.3.2.3	Solução TCA 5%.....	59
II.3.2.4	Solução padrão de histamina.....	59
II.4	CONCLUSÃO.....	60

**CAPÍTULO III - ACREDITAÇÃO DO LABORATÓRIO JUNTO À COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO DO INMETRO TENDO COMO ESCOPO A ANÁLISE DE HISTAMINA EM PESCADO.....** 61

III.1	OBJETIVO.....	61
III.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
III.2.1	AMOSTRAS PARA REALIZAÇÃO DE ENSAIO PARA AVALIAÇÃO INICIAL PELA CGCRE.....	62
III.2.2	AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE PROFICIÊNCIA.....	63
III.2.3	AMOSTRAS PARA CONTROLE DA QUALIDADE.....	63
III.2.4	REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS.....	63
III.2.5	DETERMINAÇÃO DA HISTAMINA.....	63
III.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
III.3.1	RELATO DAS ETAPAS DO PROCESSO DE ACREDITAÇÃO.....	64
III.3.1.1	Solicitação da acreditação.....	64
III.3.1.2	Análise crítica da solicitação da acreditação.....	64
III.3.1.3	Formação da equipe de avaliação.....	64
III.3.1.4	Análise da Documentação.....	64
III.3.1.5	Avaliação inicial pela CGCRE.....	65
III.3.2	DECISÃO DA ACREDITAÇÃO.....	68

III.3.3	FORMALIZAÇÃO DA ACREDITAÇÃO.....	68
III.3.4	MANUTENÇÃO DA ACREDITAÇÃO.....	69
III.4	CONCLUSÃO.....	70
<b>CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ATUNS E AFINS COMERCIALIZADOS NO MERCADO INTERNO BRASILEIRO SEGUNDO OS TEORES DE HISTAMINA E OUTRAS AMINAS BIOATIVAS.....</b>		<b>71</b>
IV.1	OBJETIVO.....	71
IV.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
IV.2.1	MATERIAL.....	71
IV.2.1.1	Amostras.....	71
IV.2.1.2	Reagentes e solventes.....	71
IV.2.2	MÉTODOS.....	72
IV.2.2.1	Determinação das aminas bioativas.....	72
IV.2.2.2	Determinação do índice de qualidade baseado nos teores de aminas bioativas.....	72
IV.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
IV.3.1	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ATUNS E AFINS CAPTURADOS POR PEQUENAS EMBARCAÇÕES MEIO DA ANÁLISE DE HISTAMINA E DE OUTRAS AMINAS BIOATIVAS... ..	73
IV.3.2	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ATUNS E AFINS AVALIADOS POR MEIO DO ÍNDICE DE MIETZ & KARMAS. ....	74
IV.3.3	APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS AOS REPRESENTANTES DAS EMPRESAS PESQUEIRAS TREINAMENTO DOS PESCADORES E MANIPULADORES DO PESCADO DO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.....	76
IV.4	CONCLUSÃO.....	77
<b>CAPÍTULO V – COMPARAÇÃO DOS TEORES DE HISTAMINA EM ATUNS DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E POR KITS RÁPIDOS.....</b>		<b>78</b>
V.1	OBJETIVO.....	78
V.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
V.2.1	MATERIAL.....	78
V.2.1.1	Amostras.....	78
V.2.1.2	Reagentes e solventes.....	78
V.2.2	MÉTODOS.....	79
V.2.2.1	Determinação da histamina por CLAE.....	79
V.2.2.2	Determinação da histamina por kit.....	79
V.2.2.2.1	Preparo do extrato concentrado da amostra.....	79
V.2.2.2.2	Diluição do extrato concentrado da amostra.....	79
V.2.2.2.3	Realização do teste.....	79
V.2.2.3	Análise estatística.....	80
V.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
V.4	CONCLUSÃO.....	83
4	CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	84
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
6	ANEXOS.....	95



## LISTA DE TABELAS

1	Teores médios de aminas bioativas em diferentes tecidos de atum, em atum de diferentes qualidades e em atum armazenado em diferentes condições e submetidos a tratamento térmico.....	23
2	Episódios de intoxicação histamínica em diferentes países.....	27
I.1	Resultados de precisão e veracidade avaliados por meio de matrizes idênticas fortificadas com histamina nos três níveis de concentração (10, 20 e 30 µg/mL.....	47
I.2	Teores de histamina em diferentes tipos de atum enlatado adquiridos no mercado.....	49
II.1	Critérios de avaliação baseados nos limites de controle superior (110% de recuperação) e inferior (80% de recuperação) utilizados na análise crítica da carta controle para tomada de decisão.....	53
II.2	Estudo de estabilidade da solução de TCA 5% baseado no percentual de recuperação do controle interno.....	59
III.1	Teor de histamina nas amostras utilizadas para a realização da avaliação inicial pela CGCRE.....	65
III.2	Teores médios de histamina no Controle Interno Matriz Fortificada (CIMF) e no Material de Referência (MR) utilizados na avaliação inicial e percentual médio de recuperação obtido.....	66
III.3	Teor de histamina na amostra utilizada para o Ensaio de Proficiência (FAPAS®).....	66
III.4	Teor de histamina no Material de Referência (MR) e percentual de recuperação obtido.....	66
III.5	Teores de histamina e z-escores obtidos pelos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência FAPAS® Report 27101.....	67
IV.1	Teores de aminas por amostras de pescado capturados por pequenas embarcações da região sul do estado do Espírito Santo.....	73
V.1	Teores de histamina em amostras de atum enlatado obtidos por meio do kit e da cromatografia líquida de alta eficiência.....	82

## LISTA DE FIGURAS

1	Reação de descaboxilação do aminoácido histidina com formação da histamina.....	23
2	Reação de amina com o-ftalaldeído.....	33
3	Perfil cromatográfico das dez aminas bioativas mais comumente encontradas nos alimentos.....	34
I.1	Curva de calibração da solução padrão de histamina no solvente ( __ ) na matriz pescado (.....)	46
I.2	Cromatograma de uma amostra branca adicionada com solução padrão de todas as aminas.....	48
II.1	Carta controle referente ao percentual de recuperação obtido por meio das análises de histamina em atuns e afins.....	57
II.2	Avaliação do pH da Solução Tampão (Fase Móvel A) durante 30 dias de armazenamento. Linha vermelha - faixa de pH em que a solução foi medida.....	58
II.3	Avaliação do pH da Solução KOH/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> durante 30 dias de armazenamento.....	58
III.1	Etapas do fluxo operacional definidas pela CGCRE para obtenção da Acreditação.....	61
III.2	Desempenho dos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência realizado em 2012 para concessão da acreditação – FAPAS® Report 27101...	68
III.3	Desempenho dos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência realizado em 2014 para manutenção da acreditação – FAPAS® Report 27132.	70
IV.1	Percentual de ocorrência das aminas bioativas nas amostras de pescado provenientes do litoral sul do estado do Espírito Santo.....	75
IV.2	Índices de Mietz & Karmas das amostras de atuns e afins provenientes da região sul do estado do Espírito Santo.....	76
V.1	Soluções controle utilizadas para comparação dos teores de histamina.....	80
V.2	Resultados de análises das amostras de atum enlatado utilizando o kit Veratox®.....	81

## LISTA DE SIGLAS

AB:	Amostra Branca
ABNT:	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGM:	Agmatina
ATP:	Adenosina Trifosfato
CAD:	Cadaverina
CE:	Comunidade Europeia
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CGCRE:	Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro
CIMB:	Controle Interno Matriz Branca
CIMF:	Controle Interno Matriz Fortificada
CV <sub>r</sub> :	Coeficiente de variação da repetibilidade
CV <sub>R</sub> :	Coeficiente de variação da reprodutibilidade
DAO:	Diaminoxidase
DICLA:	Divisão de Acreditação de Laboratórios
ELISA:	do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EP:	Ensaio de Proficiência
EPD:	Espermidina
EPM:	Espermina
FAO:	do inglês; Food and Agriculture Organization
FAPAS:	do inglês Food Analysis Performance Assessment Scheme
FDA:	do inglês Food and Drug Administration
FEM:	Feniletilamina
FMOC:	Fluorenilmetil cloroformato
GA:	Gestor de Acreditação
HIM:	Histamina
ICCAT:	do inglês International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas
IEC:	do inglês International Electrotechnical Commission
INMETRO:	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO:	do inglês International Organization for Standardization
IT:	Instrução de Trabalho
LBqA:	Laboratório de Bioquímica de Alimentos
MAO:	Monoaminoxidase
MAPA:	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MPA:	Ministério da Pesca e Aquicultura
MR:	Material de Referência
MRC:	Material de Referência Certificado
NIT:	Norma Interna Técnica
OAC:	Organismo de Avaliação da Conformidade
OMS:	Organização Mundial de Saúde
OPA:	Orto-ftalaldeído
PAO:	Poliaminoxidase
PUT:	Putrescina
RASFF:	do inglês European Rapid Alert System for Food and Feed
SINMETRO:	Sistema Nacional de Metrologia
SRT:	Serotonina
TCA:	Ácido tricloroacético
TIM:	Tiramina
TRM:	Triptamina

## RESUMO

A histamina é uma amina biogênica que, em teores elevados, pode causar efeitos adversos à saúde humana sendo que vários surtos de intoxicação têm sido relatados no Brasil e no mundo. É também um parâmetro de qualidade e comercialização de atuns e afins, sendo sua análise uma exigência da União Europeia (UE) para a importação de pescado. O método oficial de análise da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) se baseia em coluna de troca iônica e quantificação fluorimétrica. Entretanto a UE exige análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), recomendando método de derivação pré-coluna e detecção por ultravioleta. Estudos recentes indicaram que ambos métodos são inadequados. O objetivo geral deste trabalho foi implantar o sistema de gestão da qualidade do ensaio de histamina em atuns e afins, validar o método para determinação de histamina em pescado e fornecer dados sobre aminas em atuns e peixes de piscicultura. A técnica foi considerada rápida, eficiente e precisa, e com limites de detecção e quantificação adequados para o propósito. As técnicas de controle da qualidade previstas na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 foram implantadas e foram consideradas eficazes para a garantia da qualidade do ensaio de histamina em atuns e outros tipos de peixe. Amostras de atum enlatado do comércio também foram analisadas. O método foi acreditado junto à Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO segundo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Um método Elisa rápido para 'screening' de histamina em pescado foi comparado ao método por CLAE proposto. Amostras dos estados do Espírito Santo e do Rio Grande do Sul e peixes de piscicultura de Minas Gerais foram avaliadas e apresentaram excelente qualidade quanto aos teores de histamina. O Sistema de Gestão da Qualidade baseado na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 foi implantado no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, o método foi validado e a aplicação deste por meio de análises de amostras de atum fresco, enlatado e de peixes de água doce comprovaram a eficácia do método em várias matrizes.

**PALAVRAS-CHAVE:** histamina, qualidade, teste de proficiência, acreditação.

## **ABSTRACT**

QUALITY CONTROL OF THE ANALYSIS OF HISTAMINE IN FISH. Histamine is a biogenic amine, that, at high levels, can cause adverse effects to human health. It has been associated to several cases of food intoxication in Brazil and throughout the world. It is also a parameter of quality and trade of tuna and related fish. Histamine analysis is required by the European Union (EU) for the importation of tuna. The official method of analysis (AOAC) is based on ion exchange chromatography and fluorimetric detection and the EU requires high pressure liquid chromatography (HPLC), recommending pre-column derivatization and ultraviolet detection. However, recent studies indicated that both methods are inadequate. The objective of this study was to implement the quality management system for histamine analysis in fish, validate the method for determination of histamine in fish and to provide data on histamine in tuna and freshwater fish. An extraction procedure was optimized and an ion-pair HPLC method was validated. It was considered efficient, precise and the limits of detection and quantification were fit for the purpose. The quality control techniques established by ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 were implemented and considered effective to warrant the quality of histamine analysis in tuna and other fishes. Canned samples from the market were also analyzed. The Quality Management System was implemented and the method was accredited by INMETRO. A quick Elisa method for the screening of histamine in fish was compared to the HPLC method proposed. Tuna samples from the states of Espírito Santo and Rio Grande do Sul and freshwater fish from Minas Gerais were analyzed providing excellent results for histamine. The method was used in the analysis of fresh tuna samples, canned and fresh water fish have demonstrating the effectiveness of method in various matrices.

**KEY WORDS:** histamine, quality, proficiency test, accreditation.

# 1. INTRODUÇÃO

O consumo de peixes tem sido incentivado nos últimos anos, devido as suas qualidades nutricionais. Entretanto, o pescado é altamente susceptível à deterioração (SOARES & GONÇALVES, 2012) e esta pode levar à formação e acúmulo de aminas biogênicas, principalmente de histamina. A avaliação da presença da histamina em pescado é importante devido à sua capacidade de causar efeitos adversos à saúde humana (intoxicação histamínica) quando em elevadas concentrações. Além disso, a histamina pode ser utilizada como parâmetro de qualidade de peixes, podendo refletir as condições higiênico-sanitárias prevalentes durante a captura, transporte e manuseio destes (OLIVEIRA et al., 2012). Em função disto, a intoxicação histamínica é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos associado ao consumo de peixe, podendo causar riscos à saúde do consumidor. São diversos os relatos de intoxicação histamínica em todo o mundo, principalmente por consumo de atuns e afins. Este é o motivo pelo qual diversos países limitam a importação de atum pelos respectivos teores de histamina no tecido muscular.

Estudos recentes indicaram que atuns e afins tipo exportação da costa brasileira são de excelente qualidade. Entretanto, surtos de intoxicação histamínica têm sido relatados no país (EVANGELISTA, 2010; TAKEMOTO et al., 2014). São escassos os dados sobre os teores de aminas em atuns e afins capturados na costa brasileira por embarcações de pequeno porte e destinados ao mercado interno.

Vários métodos têm sido utilizados para determinar o teor de histamina e outras aminas bioativas em pescado, dentre eles, cromatografia em coluna (método oficial), cromatografia em camada delgada, eletroforese capilar, cromatografia a gás e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ÖNAL et al., 2013; FERNANDES & GLORIA, 2015). A CLAE com derivação pré ou pós-coluna tem sido a técnica mais utilizada na separação e quantificação de aminas. Além das técnicas analíticas tradicionais, kits comerciais baseados em métodos de imunoensaio estão sendo cada vez mais utilizados devido à rapidez e simplicidade dos mesmos. Estes kits tornaram-se populares devido à sua facilidade de utilização e o tempo reduzido de análise em comparação com as técnicas analíticas tradicionais (KÖSE et al., 2011). Os Estados Unidos aceitam o uso de kits para a análise de histamina nos pescados destinados a importação. Entretanto, a União Europeia exige que amostras de atuns e afins sejam analisadas por método cromatográfico para sua importação e sugere um método de

derivação pré-coluna e detecção por ultra-violeta. Recentemente, a eficiência deste método e do oficial da AOAC foram investigados, tendo sido observado que o método sugerido pela União Europeia tem a tendência a superestimar os teores de histamina em pescado, enquanto que o método da AOAC tende a subestimar estes teores (ÖNAL et al., 2013; EU, 2014). Desta forma, há a necessidade de se ter um método mais eficaz na determinação de histamina em pescado.

O Laboratório de Bioquímica de Alimentos (LBqA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) é um laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para realizar análise de histamina em pescado utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O LBqA implantou o Sistema de Gestão da Qualidade baseado na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, requisito essencial para ter o reconhecimento internacional. Entretanto, para a acreditação no INMETRO, é necessário um estudo rigoroso sobre parâmetros de qualidade laboratorial, dentre eles, a otimização e validação do método, estudos de estabilidade de soluções, estudos de incerteza e participação em ensaios de proficiência. Ainda, dados são necessários sobre a qualidade de atuns e peixes de piscicultura no Brasil quanto aos teores de histamina.

O objetivo geral deste trabalho foi implantar o sistema de gestão da qualidade do ensaio de histamina em atuns e afins e fornecer dados sobre aminas em atuns e peixes de piscicultura.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo implantar o sistema de gestão da qualidade dos resultados do ensaio de histamina em atuns e afins no Laboratório de Bioquímica de Alimentos pelo atendimento aos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.

Os objetivos específicos foram: (i) validar o método para determinação de histamina em pescado por cromatografia líquida de alta eficiência; (ii) implantar as técnicas de controle da qualidade previstas na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 para garantir a qualidade dos resultados do ensaio de histamina em atuns e afins; (iii) descrever o processo de acreditação do Laboratório de Bioquímica de Alimentos junto à Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro para a análise de histamina em pescado; (iv) avaliar a qualidade de atuns e afins comercializados no mercado interno brasileiro segundo os teores de histamina e outras aminas bioativas; e (v) comparar os teores de histamina em atuns determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e por métodos rápidos.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. PESCADOS

De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), peixe fresco é definido como aquele conservado somente pelo resfriamento, a uma temperatura próxima a 0 °C. Deve possuir pele firme, bem aderida, úmida e sem a presença de manchas. Os olhos devem ser brilhantes e salientes. As escamas devem apresentar-se unidas entre si, brilhantes e fortemente aderidas à pele. As brânquias devem apresentar cor que vai do rosa ao vermelho intenso, ser brilhantes e sem viscosidade. O odor deve ser característico e não repugnante (BRASIL, 2013).

O pescado é um alimento altamente nutritivo e constitui fonte de proteínas de alto valor biológico. Sabe-se que 100g da carne de pescado, por exemplo, contêm 80 calorias, enquanto que a mesma quantidade de carne bovina magra representa 210 calorias. Devido à quantidade mínima de tecido conjuntivo, os peixes são de alta digestibilidade, o que representa relação inversa com o teor de gordura, ou seja, os peixes considerados magros são os mais digestíveis. Os peixes contêm quantidade significativa de fósforo e iodo; pouco cálcio e ferro. Nos peixes com teores de gordura acima de 15%, são encontrados níveis elevados das vitaminas A e D na musculatura; nos demais, a concentração é elevada no fígado. Peixes marinhos, como o atum, a sardinha, o salmão e a cavala, são excelentes fontes de ácidos graxos ômega-3 (AG n-3). Quanto mais ricos em gordura, maior o teor de AG n-3 (HARDMAN, 2004; PHILIBERT et al., 2013; SOUZA et al., 2014).

O Guia Alimentar para a População Brasileira, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), recomenda o consumo de peixe fresco pelo menos duas vezes por semana. A recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 12 kg de pescado por pessoa ao ano (VICENTE et al., 2014). No Brasil, o consumo de peixe por pessoa está abaixo do recomendado pela OMS. De acordo com dados oficiais, cada brasileiro consome, em média, 9 kg de pescado por ano (BRASIL, 2015). Estes valores ainda são bem inferiores quando comparados ao consumo mundial, que atingiu quase 17 kg por pessoa por ano em 2011. A expectativa é de que o consumo mundial chegue a 20 kg por pessoa até o ano de 2030 (FAO, 2013).

### 3.1.1. Atuns e afins

Os atuns são peixes pertencentes à família *Scombridae*, que apresenta diversas espécies, das quais se destacam a Albacora Bandolim (*Thunnus obesus*), Albacora Laje (*Thunnus albacares*), Bonito de Barriga Listrada (*Katsuwonus pelamis*), Albacora Branca (*Thunnus alalunga*) e Albacora Azul (*Thunnus thynnus*). Estas espécies representam cerca de 80% das capturas mundiais dos tunídeos (BRILL et al., 2005).

Os atuns e afins são peixes ósseos, portanto, classificados como teleósteos, muito vorazes, altamente migratórios e podem ser capturados por diversos países (COLLETE, 1995; PEREIRA, 2007). Se forem explorados de forma adequada, podem formar grandes cardumes, devido ao elevado ritmo de reprodução e alta taxa de crescimento, tanto em tamanho quanto em peso (COLLETE, 1995). Os atuns habitam as águas temperadas, tropicais e subtropicais dos oceanos e buscam por temperaturas que variam de 18 a 31 °C (BERTRAND et al., 2002).

As albacoras são os principais representantes do grupo pesqueiro denominado de atuns e afins. Outras espécies também são associadas à sua captura, como os agulhões pertencentes à família *Istiophoridae* e *Xiphiidae*, e os tubarões em sua maioria representantes da família *Carcharhinidae* (OLIVEIRA, 2009). Anualmente, são capturadas cerca de 600.000 toneladas de atuns e afins no Oceano Atlântico. O Brasil não exerce uma participação expressiva neste contexto, afinal sua produção aproxima-se de 40.000 toneladas, representando apenas 6,66% das capturas. Grande parte desta produção é de bonito listrado, que é uma das espécies de menor valor comercial (OLIVEIRA et al., 2007).

As albacoras estão distribuídas em todos os oceanos. Geralmente estas espécies se concentram em águas superficiais, próximas a ilhas e outras massas de terra e em zonas oceânicas de separação ou encontro de correntes. São espécies predadoras e alimentam-se de uma enorme variedade de espécies marinhas como outros peixes, cefalópodos e crustáceos (OLIVEIRA, 2005).

As albacoras bandolim são encontradas em águas com temperaturas que variam de 17 a 22 °C. Esses peixes podem alcançar até 250 cm, mas normalmente são capturados na faixa de 40 a 170 cm. Costumam ser capturados junto com exemplares da albacora laje, principalmente quando a técnica é a rede de cerco. O inconveniente é que, quando jovens, esses atuns são bastante parecidos, dificultando a identificação das espécies. Porém, algumas pessoas mais experientes conseguem fazer a distinção das espécies pela identificação de manchas brancas em linha na região ventral do peixe que

costumam ser retas na albacora bandolim e curvas na albacora laje (FONTENEAU et al., 2005).

A albacora laje pode ser encontrada nas águas tropicais dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. Os peixes adultos buscam temperaturas próximas a 22 °C, e os mais jovens são encontrados em águas superficiais. Geralmente são capturados em comprimentos que podem variar de 30 a 170 cm, porém, podem alcançar até 240 cm (OLIVEIRA, 2009).

A identificação dos exemplares adultos destas duas espécies de atuns é feita pela coloração do corpo. A albacora bandolim é azul-escuro metálico na região dorsal, suas nadadeiras e peitorais são amarelo-escuro, enquanto que a nadadeira anal é prateada. Além disso, existe uma linha azulada nos dois lados do corpo (FIGUEIREDO, 2007; OLIVEIRA, 2009). A albacora laje também possui cor azul-escuro metálica na região dorsal, porém, sua primeira nadadeira dorsal tem uma intensa cor amarela, enquanto a segunda e a anal são amarelo-claras (COLLETE, 1995).

### **3.1.2. Produção de pescado no Brasil e no mundo**

Os países emergentes desempenham um importante papel no abastecimento dos mercados globais com relação ao pescado. Estes países representaram, em 2012, 61% do total das exportações de peixe. As receitas líquidas de exportação (exportações menos importações) atingiram os 35,3 milhões de dólares, acima do valor das exportações de um conjunto de outros produtos agrícolas, incluindo o arroz, a carne, o leite, o açúcar e a banana (FAO, 2015).

O Brasil apresenta um grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura. Possui um extenso território sendo 8.500 km de costa oceânica e, segundo a *Food and Agriculture Organization (FAO)*, a aquicultura brasileira vem tendo destaque nas exportações, com aumento para peixes frescos, especialmente na forma de filés (FAO, 2013). A produção aquícola brasileira tem crescido acima da média mundial desde 1995. Verificou-se também uma valorização do preço do pescado exportado pelo Brasil. Esta valorização foi gerada pelo aumento da exportação de preparações e conservas, filé de peixe, lagosta, polvo, atuns e afins (BRASIL, 2013, VICENTE et al., 2014).

A produção mundial de peixes proveniente da pesca extrativa e da aquicultura atingiu aproximadamente 168 milhões de toneladas em 2010. A produção de peixe no Brasil, no ano de 2011, atingiu quase 1,5 milhão de toneladas, e quando comparado ao ano de 2010, nota-se um aumento de 13,2% em toda a produção nacional. No entanto, a

pesca extrativa marinha foi responsável pela maior fonte de produção de peixe no país (VICENTE et al., 2014).

O Brasil tem uma das maiores biodiversidades em pescado do planeta, como se pode observar em mercados populares e supermercados. A pesca industrial oceânica, aquela voltada para a captura de grandes peixes pelágicos, ainda constitui uma fronteira de desenvolvimento à pesca no Brasil. A pesca dos grandes atuns e albacoras, do bonito listrado entre outras espécies podem representar o futuro da pesca industrial no Brasil (BRASIL, 2013).

Atualmente a pesca dos atuns e afins é regulamentada pela Comissão Internacional para a Conservação do Atum do Atlântico (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas - ICCAT*), do qual o Brasil é signatário, por meio da alocação de cotas de captura aos países. De acordo com o ICCAT, no ano de 2013, foram capturadas mais de 19 mil toneladas de atuns de várias espécies no sudeste do oceano atlântico por embarcações brasileiras. Para os estoques do Atlântico Sul, à exceção do espadarte (*Xiphias gladius*), não foi ainda estabelecido cotas de captura para as demais espécies, o que permite um incremento no esforço de pesca atuante sobre estes recursos (BRASIL, 2013, ICCAT, 2015).

Entre os estados brasileiros o Espírito Santo se destaca por figurar entre os três maiores produtores de atuns e afins e, também, por apresentar a maior frota de barcos de pesca oceânica do Brasil com mais de 900 barcos (BRASIL, 2013). O estado do Rio Grande do Sul está entre os mais importantes na produção artesanal de pescado. No estado a pesca artesanal se desenvolve majoritariamente no município de Rio Grande, onde se concentra grande parte das indústrias de pescado (PASQUOTTO, 2005). Segundo o último boletim estatístico divulgado pelo Ministério da Pesca (BRASIL, 2011), o Rio Grande do Sul foi o sexto maior produtor de pescado oriundo da pesca extrativa marinha em 2011 produzindo mais de 34 mil toneladas.

São utilizados em todo o mundo muitos tipos distintos de embarcações pesqueiras, que se desenvolveram em regiões particulares em função das condições econômicas e ambientais predominantes e dos tipos de peixes capturados (FAO, 2012). Segundo o Código de Práticas da FAO (2012), algumas condições essenciais para uma fácil limpeza e para reduzir ao mínimo os danos, a contaminação e a decomposição que, na medida do possível, todas as embarcações deveriam ser respeitadas a fim de garantir a manipulação higiênica e de boa qualidade do pescado.

Itaipava é um distrito localizado no município de Itapemirim, região sul do Estado do Espírito Santo, a 120 quilômetros de distância da capital Vitória, e possui como

principais atividades econômicas a pesca e o turismo. A região é o porto base de uma frota superior a 400 embarcações de pequena e média escala denominada “Frota de Itaipava” em função da localidade onde grande parte desses barcos foi construída e pela origem de boa parte de seus pescadores (BRASIL, 2013).

Direcionada em quase sua totalidade para a pesca oceânica, a frota de Itaipava tem como principais pescados capturados o Dourado (*Coryphaena hippurus*) e a Albacora Laje (*Thunnus albacares*), o que contribuiu para que o Estado do Espírito Santo fosse o maior responsável pela produção dessas duas espécies no Brasil em 2007, com aproximadamente 2907 toneladas representando 35,7% da produção nacional, seguido pelos estados do Rio de Janeiro (32,3%) e Bahia (11,3%) (BRASIL, 2013). Porém a frota de Itaipava também aporta e desembarca em outros estados dificultando a estatística local. A opção por desembarcar fora de Itaipava se dá por dois motivos principais: melhores estruturas para o desembarque da produção; e proximidade com outros portos com áreas sazonais de pesca.

A pesca de atuns e afins pela frota de Itaipava apresenta ainda um potencial considerável de incremento da produção, considerando que esses pescados estão com capturas totais abaixo do rendimento estimado pelo ICCAT no Atlântico Sul. De acordo com a ICCAT (2015) o total de capturas do atum branco permitido no Atlântico Sul é de 24.000 toneladas para o período de 2014 a 2016 e de 45.000 toneladas para o peixe espada no mesmo período.

Outro estado importante para a pesca de atuns e afins no Brasil é o Rio Grande do Sul. A pesca de bonito-listrado neste estado ocorre nos meses de novembro a maio, e a de atuns e espadartes principalmente nos meses de inverno. O litoral marítimo do estado possui 622 km de extensão. A região onde se localizam as principais pescarias estuarinas (ambiente aquático de transição entre um rio e o mar) e marinhas do Rio Grande do Sul compreende o estuário da Lagoa dos Patos. Nos desembarques das pescarias desta região predominam os peixes demersais como a corvina e os peixes pelágicos como os bonitos e os atuns (ISAAC, 2006).

A frota inclui pequenas embarcações (5 a 10 m) de convés aberto atuando na região estuarina e mais de 300 embarcações de médio porte (15 a 30 m), de madeira ou ferro, aparelhadas para a pesca de cerco, espinhel de fundo e superfície e vara e isca viva. Foi estimada, no Rio Grande do Sul, a existência de 12.201 pescadores artesanais, que atuam e dependem da pesca como principal atividade econômica, sendo que a maior concentração destes (38,5%) está na cidade de Rio Grande (GARCEZ & SÁNCHEZ-BOTERO, 2005; ISAAC, 2006).

### 3.1.3 Deterioração do pescado

Um dos principais fatores causadores da deterioração de peixes é a decomposição bacteriana (TAYLOR, 1986). Uma fonte de contaminação importante do pescado é a sua manipulação, desde o momento da captura até seu destino final, após passar por inúmeras fases de processamento e transporte. O resfriamento é a operação mais crítica na manipulação do pescado. O mesmo deve ser mantido com a temperatura próxima a 0 °C (SOARES & GONÇALVES, 2012; EFSA, 2015). Outro fator que se deve levar em consideração é a deficiência no processo de sanitização dos equipamentos de processamento (RIBEIRO et al., 2009).

Algumas práticas de manuseio são recomendadas para garantir a qualidade do pescado, tais como sangria, evisceração, lavagem, resfriamento, acondicionamento e sanitização. As práticas sanitárias permeiam todos os fatores relativos à contaminação dos alimentos marinhos, incluindo o meio em que são capturados, a manipulação da matéria-prima fresca e o estado das instalações nas quais o pescado é processado. Práticas de higiene adequadas por parte dos manipuladores têm importância fundamental, considerando que o homem pode ser um veículo de microrganismos responsáveis pelas doenças alimentares (VIEIRA, 2004; FAO, 2012).

Após a captura, o peixe passa pelos seguintes estágios: hiperemia e/ou liberação do muco, *rigor mortis*, digestão química, autólise e decomposição bacteriana. A liberação do muco ocorre como uma reação comum do peixe agonizante ao meio ambiente adverso. O muco, constituído principalmente pela mucina, é um excelente substrato para o desenvolvimento de bactérias e deve ser retirado por simples lavagem. O *rigor mortis* ou rigidez cadavérica se instala após a morte. A glicogenólise é pequena nos peixes, resultando em pH entre 5,4 e 6,2, insuficiente para inibir o crescimento de microrganismos, entretanto, ideal para a ativação de enzimas proteolíticas do músculo (catepsinas). No *post rigor*, os músculos amolecem, tem-se o desdobramento da adenosina-trifosfato (ATP) e formação de amônia (além de outros compostos voláteis) a partir da ureia (VIEIRA, 2004). O pH do músculo aumenta até alcançar os valores iniciais (BERAQUET & LINDO, 1985; ASHIE et al., 1996). As enzimas proteolíticas do músculo do pescado e as de origem bacteriana têm um papel mais importante na deterioração do pescado tropical do que nas espécies de águas frias. Peixes tropicais podem deteriorar-se rapidamente em temperatura ambiente (VIEIRA, 2004).

A gordura do pescado é susceptível à hidrólise e à oxidação, o que pode ser causado por bactérias, como também por processos químicos. A deterioração hidrolítica

e oxidativa das gorduras do pescado leva a alterações do odor e diminuição da qualidade, até a deterioração. A temperatura e a umidade, durante o armazenamento, podem proporcionar condições de desenvolvimento de microrganismos lipolíticos (DAMASCENO, 2009).

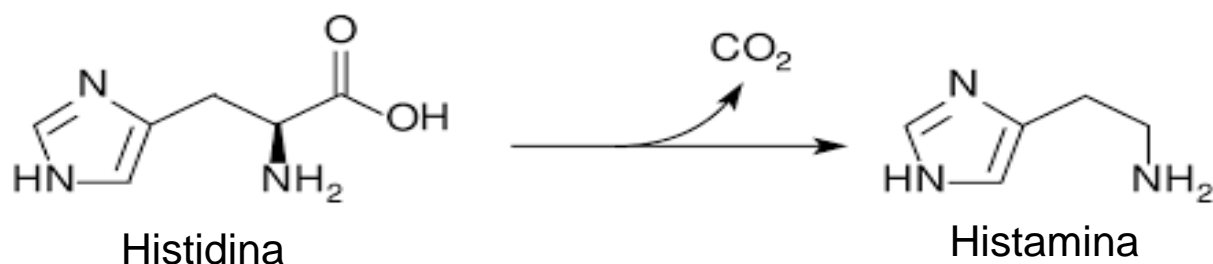
Se forem acrescentados às alterações naturais, alguns fatores externos como a captura do pescado em águas poluídas e a não observação das condições ideais de refrigeração, manuseio e transporte, menor será o tempo de conservação do pescado. Sérios cuidados deverão ser observados pelos técnicos que lidam com pescado, principalmente na observação do trinômio tempo x higiene x temperatura, fatores que, se não forem controlados, poderão comprometer a qualidade desse alimento. O tempo se refere à rapidez com que se desencadeiam as reações autolíticas e/ou bacterianas que, por outro lado, estão relacionadas com o grau de higiene do barco ou instalações frigoríficas e dos manipuladores do pescado. Somados às baixas temperaturas, se devidamente aplicadas, evitarão ou, pelo menos, retardarão as reações acima mencionadas (VIEIRA, 2004).

Para retardar a deterioração bacteriana são indispensáveis a correta conservação do pescado mantendo a temperatura baixa pelo uso de gelo em escamas ou em cubos, ou de câmaras de refrigeração. O tratamento e filtração da água; o cuidado para evitar o esmagamento do pescado no empilhamento; a eliminação de detritos; a higiene e saúde do manipulador e a higienização adequada de equipamentos e das instalações também são procedimentos importantes na conservação do pescado (SILVA, 2008; EFSA, 2015).

#### **3.1.4. Aminas em pescado**

Sob condições fisiológicas normais, os músculos de peixes frescos contêm teores significativos de espermidina e espermina, teores baixos de putrescina e traços de histamina (Tabela 1) (GLÓRIA, 2005).

Peixes escombrídeos, como atum, bonito, cavala, atum azul e *yellowfin*, são particularmente susceptíveis à formação de histamina, uma vez que contêm teores elevados de histidina livre no tecido muscular que, em certas situações, podem sofrer descarboxilação e formar histamina (Figura 1) (KANKI et al., 2007; EFSA, 2011). Entretanto, peixes de outras famílias (*Scomberesocidae*, *Pomatomidae*, *Coryhaenidae*, *Carangidae*, *Clupeidae* e *Engraulidae*) também são susceptíveis à formação desta amina.



**Figura 1.** Reação de descarboxilação do aminoácido histidina com formação da histamina (FDA, 2012).

Os dados disponíveis na literatura são contraditórios com relação aos teores de histidina e histamina em músculos claros e escuros (GLÓRIA et al., 1999). Entretanto, não foi observada diferença significativa nos teores de aminas biogênicas entre amostras de diferentes partes de ambos os músculos de *Thunnus thynnus*, assim como dos músculos superiores e inferiores de *T. alalunga*, respectivamente (VECIANA-NOGUÉS et al., 1997).

**Tabela 1.** Teores médios de aminas bioativas em diferentes tecidos de atum, em atum de diferentes qualidades e em atum armazenado em diferentes condições e submetidos a tratamento térmico

Peixe	Teores médios de aminas (mg/100 g) <sup>1</sup>						
	EPD	EPM	PUT	CAD	HIM	TIM	FEM
Atum albacora							
Músculo claro							
Superior	0,26 <sup>b</sup>	0,68	0,22	0,13	nd	nd	nd
Inferior	0,25 <sup>b</sup>	1,21	0,14	0,11	nd	nd	nd
Músculo escuro	0,79 <sup>a</sup>	2,50	0,06	0,07	nd	nd	nd
Atum							
boa qualidade	0,44	0,95	0,12	0,15	0,38	---	---
intermediário	0,36	0,67	0,23	1,03	2,36	---	---
Decomposto	0,07	0,12	0,25	1,93	25,3	---	---
Atum							
fresco	---	---	0,04	0,02	nd	nd	nd
0 °C/21 dias	---	---	0,52	2,44	10,8	1,38	nd
8 °C/9 dias	---	---	1,11	5,62	368	3,25	0,69
20 °C/3 dias	---	---	0,45	10,84	687	1,71	0,81
Atum albacora							
antes tratamento	0,43	0,73 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,06	0,07 <sup>b</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>
término							
depois tratamento	0,49	0,35 <sup>b</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,04	0,11 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>
término							

<sup>1</sup> nd - não detectado, --- - não determinado. Valores médios com diferentes letras em um mesmo grupo diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ , teste de Tukey). EPD - espermidina, EPM - espermina, PUT - putrescina, CAD - cadaverina, HIM - histamina, TIM - tiramina, FEM - feniletilamina. Fonte: GLÓRIA (2005).



Estudos têm indicado que os teores de espermina e espermidina decrescem e os de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e triptamina aumentam durante o armazenamento e deterioração do atum, truta arco-íris, sardinha, salmão, dentre outros (MIETZ & KARMAS, 1978; GLÓRIA et al., 1999; GLÓRIA, 2005). Mietz & Karmas (1978) observaram que baixos teores de putrescina, cadaverina e histamina e relativamente altos teores de espermidina e espermina foram encontrados em amostras de atum de boa qualidade. Nas amostras de qualidade intermediária foi observado um aumento significativo nos teores de putrescina, cadaverina e histamina e um decréscimo nos de espermidina e espermina. Já no peixe em decomposição, os teores de putrescina, cadaverina e, principalmente, histamina continuaram a subir significativamente, enquanto os de espermidina e espermina decresceram.

A decomposição bacteriana apresenta-se como um dos principais fatores para a deterioração do pescado. Tanto nos peixes marinhos como nos de água doce, as bactérias estão distribuídas no intestino, nas brânquias e no muco superficial. De acordo com Taylor (1985), esta microbiota é influenciada pelo tipo de habitat aquático em que vivem. A partir da captura ou despesca, novas fontes de contaminação (gelo, manuseio, equipamentos, pessoal) modificam ou aumentam a microbiota. Com a morte do animal, as defesas naturais deixam de atuar e as bactérias começam a invadir o corpo (BERAQUET & LINDO, 1985). No estudo realizado por Oliveira et al. (2012) foi demonstrado que os procedimentos de captura e pós-captura do atum que são predominantes na costa nordeste do Brasil incluem o uso de uma rede de arrasto pelágico, insensibilização imediata, sangria, evisceração, lavagem com água do mar gelada e armazenamento em gelo. Estes procedimentos produziram peixes de boa qualidade com baixos níveis de histamina.

Outros fatores que podem influenciar os teores de aminas no peixe incluem local de captura, temperatura do ar e da água, práticas de manuseio pós captura, sistemas e velocidades de resfriamento e congelamento e condições de armazenamento (EFSA, 2011). Diferentes técnicas de manuseio têm sido utilizadas na pesca comercial. De acordo com Dawood et al. (1988), peixes eviscerados continham menores concentrações de aminas biogênicas comparados aos peixes não eviscerados. Vários estudos demonstraram que a temperatura de armazenamento do peixe é um fator crítico na formação de histamina e outras aminas biogênicas no tecido muscular do peixe (GLÓRIA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012).

Geralmente, a produção de aminas aumenta com a temperatura. Por outro lado, este acúmulo é minimizado a baixas temperaturas, por meio da inibição do crescimento

microbiano e a redução da atividade da enzima. A temperatura ótima para a formação de aminas biogênicas por bactérias mesófilas tem sido relatada como sendo entre 20 e 37 °C, enquanto que a produção de aminas biogênicas diminui em temperaturas abaixo de 5 °C ou acima de 40 °C (LEHANE & OLLEY, 2000; EFSA, 2011). A refrigeração rápida e ininterrupta do peixe após a captura é, portanto, primordial para se obter um peixe de boa qualidade.

O *Food and Drug Administration* (FDA, 1995) declara que um resfriamento rápido do peixe imediatamente após a captura é a melhor estratégia para limitar a formação de histamina em peixes. A temperatura interna do peixe deve ser reduzida a 10 °C ou menos em 6 h após a morte. O resfriamento de 10 a 4,4 °C ou menos não deve exceder 18 h. A permanência de peixes em temperaturas superiores a 4 °C reduz significativamente a vida de prateleira.

A manutenção de condições de refrigeração e higiênico-sanitárias adequadas do peixe, por ocasião da captura, transporte e comercialização, é essencial para prevenir a formação de aminas. Falhas eventuais nesta cadeia podem propiciar o crescimento de microrganismos e elevação nos teores de aminas (GLÓRIA et al., 1999).

Para assegurar a proteção à saúde do consumidor, o FDA revisou o guia de conformidade para decomposição e intoxicação histamínica em 1995 (FDA, 1995). Foi estabelecido que o peixe é considerado em decomposição quando os teores de histamina atingem 50 mg/kg. Para a Comunidade Europeia (CE, 1991), um nível aceitável de 100 mg/kg foi estabelecido para histamina em atum e outros peixes pertencentes às famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae*. Além disto, os peixes podem estar implicados em surtos de intoxicação histamínica quando a histamina atinge 500 mg/kg (LEHANE & OLLEY, 2000, EFSA, 2011). No banco de dados do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF) há registro de efeitos adversos para os consumidores que foram acometidos por histamina em diferentes concentrações em amostras de peixes, por exemplo: 50 - 500mg/kg, 102 - 180 mg/kg, 27-152 mg/kg, 147 mg/kg, 5 a 208 e de 10 a 1000 mg/kg (EFSA, 2011).

Um teor médio de histamina de 100 mg/kg foi estabelecido como limite por vários países para aceitação de atum e outros peixes da família *Scombridae* e *Scomberesocidae* (FDA, 1995; CE, 1991; BRASIL, 1997). Para o controle dos teores de histamina em pescado, a Comunidade Europeia (CE) estabeleceu que a análise deve ser realizada por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência, em nove amostras representativas do lote. A aprovação do lote ocorrerá apenas quando nenhuma amostra ultrapassar o limite

máximo de 200 mg/kg ou quando até duas amostras apresentarem teores entre 100 e 200 mg/kg de histamina (CE, 1991).

### 3.1.5. Aspectos toxicológicos das aminas biogênicas

A mais frequente intoxicação causada por aminas biogênicas em alimentos envolve a histamina (CINQUINA et al., 2004). A intoxicação histamínica resulta da ingestão de alimentos que contêm altos teores de histamina. Os principais sintomas são erupções na pele, náuseas, dor de cabeça, palpitações, vômitos, dores abdominais, distúrbios respiratórios e taquicardia (GLÓRIA, 2005). Em casos mais severos pode ocorrer o edema de glote. Os principais alimentos envolvidos nesta intoxicação são os peixes e os queijos (CINQUINA et al., 2004; VISCIANO et al., 2012; DEMONCHEAUX et al., 2012).

A intoxicação histamínica não ocorre apenas em indivíduos suscetíveis, mas também naqueles que apresentam capacidade normal para degradação da histamina (FAO, 2012).

A histamina é uma substância endógena que ocorre naturalmente no corpo humano e é derivada da descarboxilação do aminoácido histidina. Apresenta funções fisiológicas importantes relacionadas a respostas imunitárias locais, secreção de ácido gástrico e neuromodulação (FAO, 2012).

A intoxicação histamínica também tem sido denominada de intoxicação por escombrídeos por estar associada à intoxicação após o consumo de peixes da família *Scombridae* (SILVA, 2008). Vários surtos de intoxicação histamínica foram registrados nos Estados Unidos, Japão, Inglaterra, França, Dinamarca, Brasil, dentre outros (Tabela 2). Os peixes das famílias *Scombridae* (atum, bonito, cavala), *Scomberesocidae* (tiravira), *Pomatomidae* (pomátomo), *Coryphaenidae* ('dolphin-fish, mahi-mahi'), *Carangidae* (olho-de-boi), *Clupeidae* (arenque, sardinha) e *Engraulidae* (anchova) foram os mais implicados nesses casos (GLÓRIA, 2005; TSAI et al., 2007; CHANG, 2008; EVANGELISTA, 2010; WILSON et al., 2012; TAKEMOTO et al., 2014).

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2007, ocorreram 21 surtos em Israel implicando peixes da família *Scombridae* (LAVON et al., 2008). Outro surto aconteceu na Ilha Formosa no ano de 2007 no qual os peixes eram da família *Istiophoridae* (CHEN et al., 2010). Em novembro de 2010 um surto de intoxicação histamínica ocorreu no Senegal, após ingestão de atum (*Thunnus albacares*) e envolveu 71 pessoas (DEMONCHEAUX et al., 2012)

**Tabela 2.** Episódios de intoxicação histamínica em diferentes países

País	Anos	Número de surtos	Número de Casos*	Alimentos incriminados
Canadá	1975 - 1981	6		Atum, mahi-mahi, mackerel
Dinamarca	1976 - 1982	33	-	Atum, mackerel
	1993 - 1998	13	-	-
Finlândia	1993 - 1998	9	> 772	-
França	1980 - 1983	10	> 500	Albacore, atum, sardinha, herring
	1993 - 1997	38	-	-
Alemanha	1971 - 1982			Mackerel, sardinha, atum
Japão	1950 - 1954	14	1215	Saury seco, mackerel enlatado, Iwashi sakuraboshi, frigate tuna
	1970 - 1980	42	4122	Atum, mackerel, sardinha, dourado, marlin, kamaboko, anchova
Nova Zelândia	1973 - 1975			Skipjack tuna, mackerel, kahawai, kingfish, trumpeter fish
Suécia	1993 - 1998	4	12	-
Reino Unido	1976 - 1982	136	439	Mackerel, bonito, sprats, pilchard, sardinha, atum, anchova, kipper, gefilte
	1987 - 1996	105	405	Atum, mackerel, salmão
Estados Unidos da América	1968 - 1981	110	888	Atum, mahi-mahi, mackerel, bonito, albacora, jack, blue fish, snapper, kumu, skipjack, yellow tail, anchova
	1973 - 1987	202	1216	Finfish
	1988 - 1998	5	31	Atum, mahi-mahi, yellow fin tuna, yellow tail
Ilha Formosa	2001 - 2004	1	2	Swordfish, mackerel enlatado
	2007	1	347	Marlin-lança
Israel	2005 - 2007	21	46	Atum
Brasil	2007 - 2009	3	25	Atum
Brasil	2013	1	18	Atum
Canadá	2012	1	1	Atum
Itália	2014	1	2	Atum

Fonte: GLÓRIA (2005); TSAI et al. (2007); CHANG et al. (2008); EVANGELISTA (2010); WILSON (2012); TAKEMOTO et al. (2014); TORTORELLA et al. (2014).

No Brasil, foram relatados três surtos de intoxicação por escombrídeos na região nordeste. Estes casos foram comunicados à Vigilância Sanitária de Natal, RN, que coletou as amostras e as enviou ao LBqA para análise de histamina. Todas as informações sobre os eventos foram fornecidas pela Secretaria Municipal de Saúde de Natal por meio da Vigilância Sanitária. Os peixes envolvidos nos três casos eram atuns. Estes eventos acometeram um total de 25 pessoas. Os principais sintomas apresentados foram febre, cefaleia, diarreia, cólica, manchas vermelhas na pele, náuseas, dispneia e

taquicardia. Nos três eventos os sintomas começaram a aparecer cerca de uma hora após a ingestão do alimento (EVANGELISTA, 2010). Em 2013, o LBqA investigou também um caso de intoxicação histamínica que acometeu 18 crianças de uma escola na cidade de São Paulo. O peixe envolvido neste caso também foi o atum e os sintomas relatados foram os mesmos (TAKEMOTO et al., 2014).

Embora tenha havido uma série de registros na literatura científica acerca da intoxicação histamínica, a grande maioria destes registros são apenas relatos de casos. A dificuldade com relatos de casos é que é muito difícil determinar o nível de histamina a que os sujeitos foram expostos. Estas dosagens são estimadas baseando-se nos níveis detectados em amostras de pescado possivelmente envolvidas nos casos (FAO, 2012). Vários casos de intoxicação histamínica não são registrados, uma vez que os sintomas podem ser relativamente leves, ter curta duração e as pessoas acometidas não procurarem apoio médico. Além disso, muitos médicos não têm conhecimento da intoxicação histamínica, desconsiderando este como possível diagnóstico. Ainda, mesmo quando o diagnóstico é feito, muitos países não mantêm um registro oficial dos surtos. Sendo assim, não se conhece a incidência real de intoxicação histamínica (GLÓRIA, 2005).

Em pacientes com intolerância a histamina, mesmo pequenas quantidades no alimento ingerido podem causar efeitos adversos à saúde, portanto, apenas níveis abaixo dos limites detectáveis podem ser considerados seguros (EFSA, 2011). As amins putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas diaminoxidases (DAO), aumentando o seu transporte através da parede gastrointestinal. A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados e queijos maturados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida sozinha (TAYLOR, 1986; SOARES & GLÓRIA, 1994; GLÓRIA, 2005; FAO, 2012).

Lázaro et al. (2015) observaram que putrescina, cadaverina e tiramina são bons indicadores indiretos da presença de bactérias em alimentos. Entretanto, o pescado pode conter níveis tóxicos de histamina sem apresentar os parâmetros sensoriais que habitualmente caracterizam a decomposição (FAO, 2012).

A tiramina é a segunda amina envolvida em intoxicações alimentares. Em concentrações elevadas pode causar cefaleia, febre, vômito, transpiração, inflamação cutânea, dores de cabeça e aumento da pressão sanguínea. Em pacientes em tratamento com inibidores da monoaminoxidase (IMAO), a tiramina pode causar enxaqueca, induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (MAGA, 1978; SMITH, 1980-

1981; MAIJALA et al., 1993). As aminas triptamina e 2-feniletilamina, da mesma forma que a tiramina, podem provocar dor de cabeça, enxaqueca, aumentar a pressão sanguínea, devido à constrição do sistema vascular, e a taxa da contração cardíaca. A tiramina e serotonina podem causar crises hipertensivas e hemorragia intracraniana (EFSA, 2011).

As principais condições para a existência de aminas biogênicas nos alimentos incluem: disponibilidade de aminoácidos livres, a existência de microrganismos e condições que permitam o seu crescimento (particularmente temperatura e pH). As condições de armazenamento (em especial da temperatura) para alimentos fermentados são variáveis e podem ser relevantes para o acúmulo de aminas biogênicas (EFSA, 2011). A temperatura é o fator individual mais importante que influencia na rapidez de deterioração do pescado e no crescimento de microrganismos. No caso dos pescados susceptíveis à formação de histamina, como é o caso dos atuns e afins, o controle do tempo/temperatura pode ser o método mais eficaz para garantir a inocuidade deste alimento. Portanto, o controle destas condições precisa ser levado em consideração desde a captura até o consumo. O pescado deve ser resfriado imediatamente após sua captura para evitar o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a formação de histamina (FAO, 2012).

### **3.1.6. Aminas biogênicas como critério de qualidade**

Na maioria dos alimentos ricos em proteínas e aminoácidos submetidos a condições favoráveis ao crescimento microbiano pode-se ter a formação de aminas biogênicas. Os tipos e teores de aminas formadas irão depender do alimento e da microbiota presente. Aminas podem ser formadas em alimentos por enzimas de bactérias contaminantes devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade (DONHAUSER et al., 1993), refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênicas prevalentes durante a fabricação de certos produtos (TAYLOR, 1986; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997; EFSA, 2011). Podem também ser utilizadas como um indicador do alimento deteriorado, uma vez que a deterioração microbiana pode ser acompanhada pelo aumento da produção de descarboxilases (HALÁSZ et al., 1994; MOON et al., 2013). Uma vantagem da utilização de aminas como critério de qualidade reside no fato de estas serem termo-resistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Um índice químico baseado nos teores de aminas foi proposto por Mietz & Karmas (1977) para avaliar a qualidade de atum. Este é calculado pela soma dos teores de putrescina, cadaverina e histamina, dividido por espermidina e espermina adicionado de 1. Para valores de 0 a 1, o atum é considerado de boa qualidade, valores de 1 a 10, de qualidade intermediária, e para valores acima de 10, o atum é considerado decomposto.

Existem poucos estudos sobre a qualidade de atuns e afins capturados por embarcações de pequeno e médio portes para o mercado interno. São escassos os dados sobre os teores de aminas em atuns e afins capturados na costa brasileira e sobre os surtos de intoxicação histamínica. Estes dados seriam relevantes para esclarecer se as condições de pesca utilizadas no país são adequadas para a obtenção de pescados livres de histamina.

### **3.2. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS EM PESCADO**

Vários métodos analíticos para determinação de aminas biogênicas em pescado têm sido desenvolvidos. Em uma revisão das abordagens analíticas para análise de aminas biogênicas em amostras de alimentos (BADIA-ERIM, 2013), vários exemplos do uso de cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e eletroforese capilar foram apresentados para a determinação de aminas biogênicas em uma variedade de produtos alimentares, incluindo vinho, peixe, suco de laranja, cerveja, queijo, salsicha e produtos de carne fermentados, bem como produtos lácteos. Em alguns casos, o método cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas ou a um detector de fluorescência induzida por laser para a detecção e identificação dos analitos. Além disso, métodos químicos e biossensores enzimáticos para a detecção de aminas biogênicas, incluindo histamina, foram desenvolvidos (COHEN et al., 2015).

Vários procedimentos estão disponíveis para a detecção e determinação analítica de histamina e outras aminas biogênicas em alimentos. A cromatografia líquida de alta eficiência com diferentes tipos de detectores tem sido o método mais amplamente utilizado. Devido à elevada polaridade da histamina alguns métodos aplicam a cromatografia em fase reversa com derivação pré-coluna; e outros, cromatografia líquida por par iônico juntamente com derivação pós-coluna. O método oficial de análise de histamina (AOAC, 2012) baseia-se na extração utilizando metanol, purificação por coluna de troca iônica, derivação com o-ftalaldeído e medição em fluorímetro. Embora vantajoso

devido à relativa simplicidade e nenhuma exigência de equipamentos sofisticados, estudos (ÖNAL et al., 2013) indicaram que este método tem uma tendência a subestimar os teores de histamina no pescado. Por outro lado, a UE mostrou que o método tem uma tendência a superestimar estes teores (EU, 2014). Além disso, é trabalhoso e demorado, uma vez que a derivação é realizada antes da separação cromatográfica (FERNANDES & GLORIA, 2015).

Os dois métodos cromatográficos recomendados pela UE para a análise de histamina no pescado (MALLE et al., 1996; DUFLOS et al., 1999) fazem uso de extrator susceptível à explosão (ácido perclórico) e possuem etapas de extração, derivação e purificação antes da quantificação por CLAE. Tais procedimentos demandam excessivo tempo, culminando em um longo tempo de análise total, e requerem várias etapas de manipulação da amostra, podendo gerar perdas.

Cada método tem suas vantagens e limitações e estas variam em relação a custo, experiência do operador, tempo para obter um resultado, portabilidade do equipamento, dentre outros. Estas técnicas foram discutidas e revisadas por Lehane & Olley (2000), Dalgaard et al. (2008) e Hungerford & Wu (2012). Pesquisas continuam a ser feitas de forma a desenvolver métodos mais simples, rápidos, sensíveis e de menor custo.

### **3.2.1. Determinação de aminos bioativas por cromatografia líquida de alta eficiência**

As técnicas para determinação de aminos bioativas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) envolvem as etapas de extração, derivação, separação e quantificação (ÖNAL, 2007; BACH et al., 2012).

#### **3.2.1.1. Extração**

A eficiência da extração de histamina e de outras aminos bioativas depende do tipo e natureza das aminos presentes e dos alimentos a serem analisados. Nesta etapa dois parâmetros são importantes: o solvente utilizado, diretamente relacionado com a matriz a ser analisada, e o preparo da amostra (SIMON-SARKADI, 1994; MORET & CONTE, 1996, ÖNAL, 2007; EFSA, 2011).

A extração de aminos de matriz sólida pode ser realizada utilizando-se água à temperatura ambiente ou a temperaturas altas, solventes orgânicos ou reagentes ácidos. Solventes orgânicos, como metanol, acetona, etanol e acetonitrila, são utilizados para extrair aminos livres. Na extração de aminos ligadas a outros componentes da matriz, realiza-se esta etapa com o emprego de reagentes ácidos, como ácido clorídrico, ácido



perclórico e ácido tricloroacético (TCA) (ZEE et al., 1983; OHTA et al., 1993; VALE & GLÓRIA, 1997; ÖNAL, 2007; EFSA, 2011). O uso do ácido perclórico não é muito indicado por requerer cuidados especiais uma vez que é explosivo (WINDHOLZ, 1996). O TCA tem sido o mais indicado para extração de aminas biogênicas em peixes, por ser rápido, simples, não ser explosivo, e fornecer uma boa média de recuperação (ZEE et al., 1983; ÖNAL, 2007; EFSA, 2011).

A complexidade das matrizes alimentares é uma consideração importante na obtenção de recuperações adequadas das aminas (EFSA, 2011).

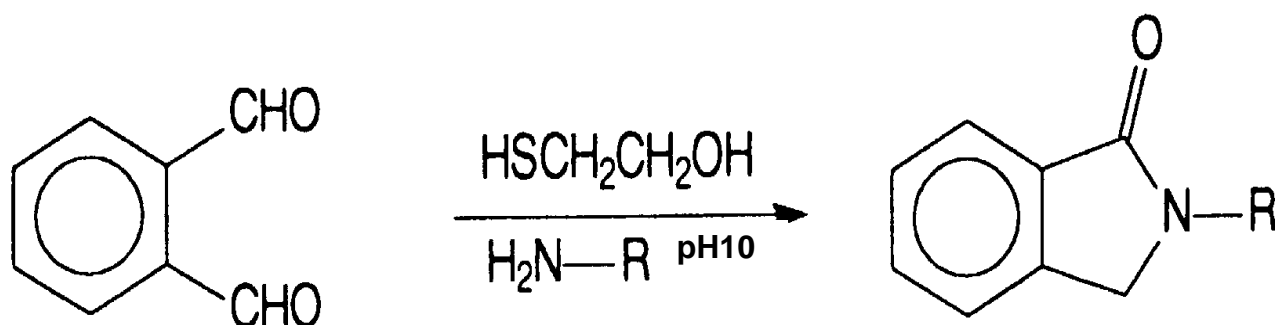
### **3.2.1.2. Detecção**

A detecção de aminas em matrizes complexas torna-se difícil devido ao fato destas estarem geralmente presentes em baixas concentrações. Além disto, a maioria das aminas não apresenta absorção no ultra-violeta (UV) e nem fluorescência, tornando-se necessário um processo de derivação para aumentar a absorbância e, conseqüentemente, diminuir o limite de detecção (BUSTO et al., 1994; KIRSCHABAUM et al., 1994; ÖNAL, 2013)

Os reagentes de derivação empregados na análise de aminas são: 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC), naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (KIRSCHABAUM et al., 1994), cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno sulfonila (cloreto de dansila) (MALLE et al., 1996; DUFLOS et al., 1999; EFSA, 2011), fluorescamina, e *o*-ftalaldeído (OPA) (VALE & GLÓRIA, 1997; DALGAARD et al., 2006).

MIETZ & KARMAS (1978) e HUI & TAYLOR (1983) quantificaram várias aminas por detecção no ultravioleta a 254 nm, após derivação com cloreto de dansila. O cloreto de dansila reage com aminas primárias, secundárias e terciárias em condições extremas. Entretanto, reage também com alcalóides, aminoácidos, fenóis, álcoois alifáticos, bases purínicas e açúcares (MIETZ & KARMAS, 1978; BUSTO et al., 1994; ÖNAL, 2007).

O uso de *o*-ftalaldeído (OPA), ao contrário do cloreto de dansila, é preferido devido à grande seletividade para aminas (Figura 2) e ao aumento da sensibilidade pelo método de fluorescência. O uso de derivação pós-coluna é recomendado por ser o tempo entre a formação do complexo e a detecção curto e padronizado (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993). Glória e Daeschel (1995) utilizaram derivação pós-coluna com OPA para determinar tiramina, agmatina, 2-feniletilamina, espermidina, triptamina, espermina, putrescina, serotonina, cadaverina e histamina em vinho utilizando detector de fluorescência.



**Figura 2.** Reação de amina com o-ftalaldeído (CONCA et al., 2001).

### 3.2.1.3. Separação

Dentre os métodos utilizados para a separação de aminas bioativas em alimentos, estão a cromatografia em papel, em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo a última mais seletiva e sensível, permitindo a detecção de pequenas quantidades de aminas (SHALABY, 1995; LAPA-GUIMARÃES, 2005; ÖNAL, 2007, EFSA, 2011).

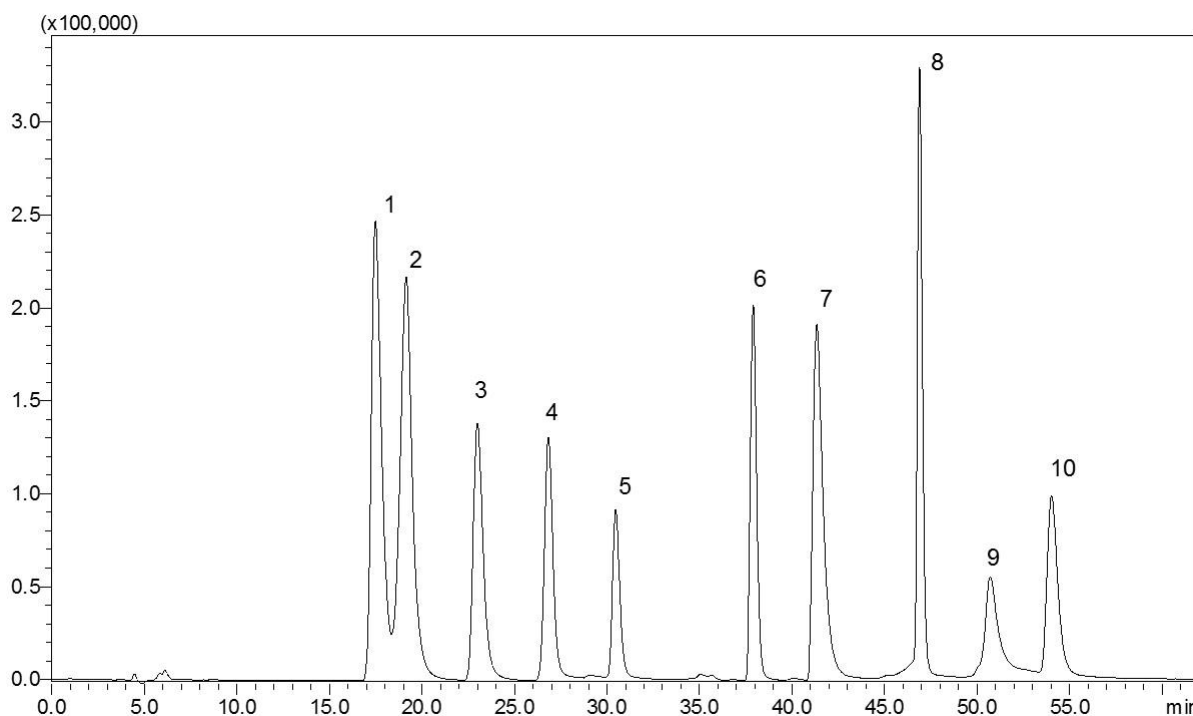
A separação e quantificação das aminas biogênicas por CLAE oferecem maiores vantagens sobre outros métodos, pois permite a separação e quantificação simultânea (TAYLOR, 1985; VALE & GLÓRIA, 1997; EFSA, 2011). A CLAE por fase reversa é considerada a técnica mais adequada para análise de aminas em alimentos (MORET & CONTE, 1996; EFSA, 2011). Hui e Taylor (1983), Izquierdo-Pulido et al. (1993) e Glória e Daeschel (1995) utilizaram as colunas Ultrasphere ODS, Novapack C18 e Bondapack C18, respectivamente, para separar aminas biogênicas por cromatografia líquida.

A introdução do par iônico como octanosulfonato de sódio na fase móvel utilizada na CLAE de fase reversa melhora a separação das aminas. Isto ocorre devido à neutralização das aminas, aumentando o seu tempo de retenção na coluna (LIMA, 1999). Glória e Daeschel (1995), ao introduzir o par iônico à fase móvel, obtiveram os resultados indicados na Figura 3. Observa-se que a resolução foi muito boa e foi possível separar e quantificar dez aminas.

### 3.2.2. Análise de aminas por métodos rápidos

Além das técnicas analíticas tradicionais, kits comerciais baseados em métodos de imunoenensaio estão sendo cada vez mais utilizados devido à rapidez e simplicidade, o que

permite o seu uso no campo. O kit é um teste imunossorvente (ELISA) ligado a enzimas competitivas diretas, que por meio de padrões conhecidos permite quantificar a histamina em amostras analisadas em mg/kg. Estes kits tornaram-se populares devido à sua facilidade de utilização e os requisitos de tempo reduzidos em comparação com as técnicas analíticas tradicionais (KÖSE et al., 2011). Atualmente, já existe um método de imunoensaio para teste quantitativo de histamina aprovado pela AOAC para análise em pescado fresco ou enlatado (HUNGERFORD & WU, 2012).



**Figura 3.** Perfil cromatográfico das dez aminas bioativas mais comumente encontradas nos alimentos. 1 = Putrescina; 2 = Cadaverina; 3 = Histamina; 4 = Tiramina; 5 = Serotonina; 6 = Agmatina; 7 = Espermidina; 8 = Feniletilamina; 9 = Espermina; 10 = Triptamina. (Condições cromatográficas descritas no texto).

Os imunoensaios têm a vantagem de fornecer dados semi-quantitativos e podem analisar simultaneamente várias amostras em 20 minutos a 2 horas. Este formato oferece uma alternativa adequada para a triagem de histamina sem a necessidade de investir em equipamento adicional necessário para os ensaios totalmente quantitativos (EFSA, 2011). Embora esta técnica tenha sido bastante utilizada para a determinação de histamina em atum fresco ou enlatado, existem poucas informações a respeito da sua performance, principalmente para teores elevados. Alguns kits, apesar de serem quantitativos, possuem uma estreita faixa de concentração de histamina (0 a 50 mg/kg). Deste modo,

os teores detectados acima desta faixa não são precisos e necessitam de confirmação pela CLAE, uma vez que altos teores de histamina podem provocar intoxicação alimentar.

### **3.3. GARANTIA DA QUALIDADE DE RESULTADOS ANALÍTICOS**

A acreditação é uma ferramenta estabelecida em escala internacional para gerar confiança na atuação de organizações que executam atividades de avaliação da conformidade. É o reconhecimento formal por um organismo de acreditação, de que um Organismo de Avaliação da Conformidade - OAC (laboratório, organismo de certificação ou organismo de inspeção) atende a requisitos previamente definidos e demonstra ser competente para realizar suas atividades com confiança, garantindo a qualidade do produto (INMETRO, 2013)

A acreditação oferece ao laboratório acreditado diversas vantagens, como: aumento da confiança nos resultados das calibrações ou ensaios oferecidos; auto avaliação e aprimoramento técnico; direito de emitir certificados e relatórios de ensaio com o símbolo da acreditação da Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO (CGCRE); oferece também ao laboratório a conquista de novos mercados (INMETRO, 2010).

No Brasil o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) é o órgão executivo central do (SINMETRO). O Decreto nº 6.275, de 28 de novembro de 2007, estabeleceu que compete à CGCRE atuar como organismo de acreditação de organismos de avaliação da conformidade. A CGCRE é, portanto, dentro da estrutura organizacional do INMETRO, a unidade organizacional principal que tem total responsabilidade e autoridade sobre todos os aspectos referentes à acreditação, incluindo as decisões de acreditação (INMETRO, 2010).

Os laboratórios que realizam análises químicas devem ter o compromisso da geração de resultados confiáveis, uma vez que este é, geralmente, o fator primordial nas tomadas de decisão. Para gerar um resultado confiável é necessário que um laboratório coloque em prática seu programa de gestão da qualidade. Um resultado analítico pode ser considerado aceito se for obtido por meio de referências pré-estabelecidas e métodos validados (JARDIM & SODRÉ, 2009). No Brasil, laboratórios prestadores de serviço têm cada vez mais a necessidade de se engajarem em programas de qualidade. Esta demanda também surge por parte do contratante.

Para conceder a acreditação a um laboratório o INMETRO exige que este laboratório se adeque à norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (Associação Brasileira de

Normas Técnicas - International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission 17025:2005), que estabelece requisitos gerenciais e técnicos para a implantação do sistema de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração (JARDIM & SODRÉ, 2009).

Laboratórios acreditados e não acreditados, mas que se preocupam com a qualidade dos seus resultados, analisam, periodicamente, Materiais de Referência (MR). Ainda, Ensaio de Proficiência (EP) podem ser realizados e, constituem elementos essenciais à confiabilidade dos resultados e são exigidos pela norma NIT-DICLA 026 da CGCRE como um dos requisitos para a acreditação do laboratório (JARDIM & SODRÉ, 2009; INMETRO, 2011).

Junto com a utilização de métodos validados, o ensaio de proficiência é um elemento essencial ao laboratório como controle da qualidade de suas atividades. Materiais de Referência Certificados para análise de histamina em atuns e afins não estão disponíveis no mercado nacional e internacional. Neste caso, Materiais de Referência (MR) não certificados do *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS®) podem ser utilizados nos ensaios de proficiência (FAPAS®, 2012; NOGUEIRA & SOARES, 2013).

No âmbito acadêmico existe uma grande discussão sobre a aplicabilidade dos princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL), porque a acreditação é concedida contra uma determinada agenda de avaliações. Essas avaliações são, além de minuciosas, onerosas, o que acaba por afastar essa acreditação do cenário acadêmico. No entanto, o uso dos conceitos de BPL pelas universidades pode auxiliar na qualidade dos dados gerados. Os princípios não precisam ser implementados na sua totalidade, mas podem nortear as pesquisas. Em teoria, a pesquisa e o desenvolvimento, consistindo em medições objetivas não rotineiras, se devidamente documentados e validados, podem ser credenciados. Em consequência, a pesquisa ganha com essas ações, obtendo maior confiabilidade e integridade dos dados por meio da documentação adequada (RODRIGUES et al., 2012).

A incerteza de medição é uma das mais importantes características metrológicas e de qualidade de um resultado de medição, permitindo a comparabilidade e a avaliação da conformidade do resultado de medição em relação a normas, a limites legais ou contratuais ou a valores de referências. Portanto, a incerteza é a principal característica metrológica do resultado de uma medição para se estabelecer e se verificar o atendimento ao critério de adequação ao uso pretendido. A incerteza de medição deve ser relatada juntamente com todo resultado de medição. Um dos requisitos necessários

para a garantia da qualidade de resultados é a estimativa da incerteza de medição (BRASIL, 2011). Esta estimativa representa um parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mesmo mensurando (ALBANO, 2009, BRASIL, 2011).

Os passos básicos para a estimativa da incerteza são: a especificação do mensurando, a identificação das fontes de incerteza, a quantificação dos componentes da incerteza e seu cálculo. O método tradicional para a estimativa da incerteza para muitos ensaios químicos muitas vezes não é simples, pois as fontes e as equações geradas por alguns equipamentos de medição (cromatógrafos, espectrômetros, etc) não estão absolutamente esclarecidas ou são muito complexas (ALBANO, 2009).

Na prática, a incerteza de um resultado pode provir de muitas fontes possíveis, incluindo definição incompleta, amostragem, efeitos da matriz e interferências, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e a variação aleatória (EURACHEM, 2002).

Na estimativa da incerteza total, pode ser necessário tratar cada fonte de incerteza separadamente para se obter a contribuição de cada fonte. Cada uma das distintas contribuições à incerteza é denominada como um componente de incerteza. Quando expressado como um desvio padrão, um componente de incerteza é conhecido como incerteza padronizada. Se existir uma correlação entre quaisquer componentes, isso deve ser levado em conta pela determinação da covariância. Entretanto, geralmente é possível avaliar o efeito combinado de diversos componentes. Isso pode reduzir o total do esforço envolvido e, quando os componentes cujas contribuições avaliadas conjuntamente são correlacionadas, pode não haver necessidade adicional de se levar em conta a correlação (EURACHEM, 2002).

A incerteza final do resultado de uma medição, resultado de uma combinação das incertezas de múltiplas fontes, é chamada de Incerteza Padrão Combinada, representada pelo símbolo  $u_c(y)$ . Onde  $y$  representa o mensurando, o resultado analítico. Em química analítica, para a maioria dos fins, deve-se usar uma incerteza expandida,  $U$ . A incerteza expandida dá um intervalo dentro do qual acredita-se, com alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando.  $U$  é obtido pela multiplicação de  $u_c(y)$  a incerteza padrão combinada, por um fator de abrangência  $k$ . A escolha do fator  $k$  é baseada no nível de confiança desejado e no grau de liberdade efetivo da incerteza combinada. Para um nível de confiança aproximado de 95%,  $k$  é 2 (EURACHEM, 2002; BRASIL, 2011).

Existem dois tipos de Incerteza Padrão. A do Tipo A que é obtida por métodos que empregam uma análise estatística de uma série de observações repetidas no momento do ensaio/calibração. A incerteza padrão do Tipo A pode ser expressa pelo desvio padrão experimental da média, por exemplo. Já a Incerteza Padrão do Tipo B é obtida por métodos que empregam outros meios que não a análise estatística de uma série de observações repetidas no momento do ensaio/calibração. Nesse caso, a avaliação da incerteza é baseada em outros conhecimentos, tais como: dados históricos de desempenho do método de medição por meio de uma estimativa da incerteza total, não separando as fontes de incerteza de entrada individualmente (ALBANO, 2009).

De acordo com BRASIL (2011) a incerteza combinada padrão ou a expandida do resultado da análise química não deve exceder o limite máximo de incerteza estabelecido por legislação ou norma específica. Na falta do valor deste limite máximo de incerteza, o seguinte critério deve ser adotado: se a incerteza padrão combinada do resultado de análise for calculada incluindo a precisão de reprodutibilidade (incerteza ou desvio-padrão de reprodutibilidade ou incerteza de ensaios interlaboratoriais colaborativos), então a incerteza padrão combinada relativa não deve exceder mais de duas vezes o Coeficiente de Variação de 5%.

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável (por ex. um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade). A estabilidade das soluções por dias ou meses é mais desejável, entretanto em alguns casos, as soluções precisam ser preparadas cada vez que forem realizadas as análises (RIBANI et al., 2004).

A avaliação da estabilidade das soluções utilizadas no método analítico é de suma importância, já que uma degradação do analito ou dos constituintes da matriz durante a estocagem ou análise da amostra podem afetar a exatidão dos resultados (RATH et al., 2008). Segundo BRASIL (2011), a estabilidade do analito nas mais diversas situações deve ser determinada de modo a reproduzir as reais condições de armazenamento, manuseio e análise; levando-se em consideração a matriz específica na qual o analito deverá ser pesquisado. Considera-se um padrão como estável quando for observada uma degradação máxima de até 5% em relação a uma referência recém-preparada.

## PARTE EXPERIMENTAL

Para atender aos objetivos, o conteúdo foi dividido em capítulos, cada um associado a um objetivo específico, os quais estão apresentados a seguir:

- i. validação do método para determinação de histamina em pescado por cromatografia líquida de alta eficiência;
- ii. implantação do sistema de gestão da qualidade de resultado do ensaio de histamina em atuns e afins no Laboratório de Bioquímica de Alimentos;
- iii. acreditação do Laboratório de Bioquímica de Alimentos junto à Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro para a análise de histamina em pescado;
- iv. avaliação da qualidade de atuns e afins comercializados no mercado interno brasileiro segundo os teores de histamina e outras amins bioativas; e
- v. comparação dos teores de histamina em atuns determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e por métodos rápidos.

Os artigos publicados oriundos desta tese estão apresentados no ANEXO I, assim como a relação dos trabalhos apresentados em eventos.



# CAPÍTULO I

## VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

### I.1. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivos validar o método de detecção de histamina por CLAE-par iônico com base nos parâmetros estabelecidos pela Diretiva 2002/657/CE e confirmar a eficiência do método por meio da participação em Ensaio de Proficiência.

### I.2. MATERIAL E MÉTODOS

#### I.2.1. MATERIAL

##### I.2.1.1. Amostras

Postas de atum fresco (n = 117) foram obtidas de entrepostos localizados na costa sul e sudeste do Brasil. Filés de peixes de água doce, tilápia do Nilo - *Oreochromis niloticus* (n = 15) e truta arco-íris - *Oncorhynchus mykiss* (n = 3) foram obtidos a partir de armazéns perto de fazendas de peixes no interior do estado de Minas Gerais, Brasil. As amostras foram congeladas frescas, mantidas sob gelo seco durante o transporte e armazenadas no ultra-freezer a -80 °C até à análise. Amostras de atum enlatado (n = 92) foram adquiridas no mercado e armazenadas à temperatura ambiente. Material de referência, atum enlatado com histamina, do *Food Analysis Performance Assessment Scheme* - FAPAS® também foi utilizado.

##### I.2.1.2. Reagentes e solventes

Os padrões das aminas agmatina (AGM, sal sulfato), cadaverina (CAD, dicloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), tiramina (TIM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) e *o*-ftalaldeído (OPA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Foram utilizados reagentes de grau analítico, com exceção dos solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes aquosos foram filtrados em membrana HAWP e os solventes orgânicos em membrana HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

### **I.2.1.3. Soluções**

As soluções foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar e os padrões de aminas em tubos hermeticamente fechados. Todos foram identificados e armazenados sob refrigeração (temperatura = 4 a 10 °C) para a realização das análises, exceto a solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio, que foi mantida a 22 °C.

#### **I.2.1.3.1. Solução padrão das aminas**

Para o preparo da solução padrão de cada amina considerou-se a massa da base livre (sem a utilização da massa de cloreto ou sulfato) para resultar numa concentração de 1 g de cada amina em 1 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L. A partir de alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções individuais, obteve-se 10 mL de solução padrão contendo dez aminas na concentração de 100 µg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 1; 10; 20; 30; 40; 50; e 60 µg/mL. Estas concentrações correspondem, respectivamente, a 5, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg/kg de histamina em pescado e se enquadram na faixa estabelecida pela União Europeia (100 a 200 mg/kg). Estas soluções foram utilizadas para o preparo da curva de calibração que foi usada para quantificar a histamina.

#### **I.2.1.3.2. Fase móvel para a cromatografia**

Como uma das soluções da fase móvel, empregou-se a solução tampão de acetato de sódio 0,2 mol/L e octanossulfonato de sódio 15 mmol/L, com ajuste de pH para 4,9 em potenciômetro digital (Digimed, SP, Brasil) com ácido acético glacial. Esta solução foi filtrada em membrana HAWP, em éster de celulose, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA) e desgaseificada em aparelho ultrassom (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil). A outra solução era constituída de acetonitrila filtrada em membrana HVWP, em éster de celulose, com 47 mm de diâmetro e

0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). O fluxo total utilizado foi de 0,5 mL/min.

#### **I.2.1.3.3. Solução derivante**

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultrapura, com pH ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio. A esta solução foram adicionados 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvidos em 3 mL de metanol previamente filtrado, 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol. A solução derivante foi preparada imediatamente antes do uso, foi desgaseificada em aparelho ultrassom (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) e mantida sob abrigo da luz. Esta solução foi bombeada a um fluxo de 0,3 mL/min.

## **I.2.2. MÉTODOS**

### **I.2.2.1. Validação do método**

O processo de validação do método foi realizado de acordo com a Diretiva 2002/657/CE e recomendado pela Comunidade Europeia relativo ao desempenho de métodos analíticos e interpretação dos resultados. Foi utilizado também o DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (INMETRO, 2010). Os parâmetros analisados foram: linearidade, precisão, veracidade, especificidade, reprodutibilidade interlaboratorial, robustez, limites de quantificação e detecção, limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ), e os efeitos da matriz.

A linearidade foi avaliada por meio de curvas de calibração utilizando seis pontos em triplicata por três dias consecutivos. As curvas foram construídas por meio da representação gráfica da área do pico da histamina em função da concentração e por meio da regressão linear (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários) e as equações e o coeficiente de correlação foram determinados. O intervalo linear avaliado foi de 1,0 a 50 µg/mL.

A fim de investigar a incidência de efeitos de matriz, a inclinação e o intercepto de equações lineares para as curvas de calibração construídas no solvente e em extratos da matriz, foram comparados pelo teste *t* de Student.

A precisão em termos de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial foi avaliada por meio da análise de um conjunto de amostras de matrizes idênticas fortificadas com o analito para se obter concentrações equivalentes a 0,5; 1,0; e 1,5 vezes

o limite máximo permitido (50, 100 e 150 mg/kg, respectivamente). Para cada nível foram realizadas seis repetições. Cada conjunto de 18 amostras foi analisado três vezes em três dias diferentes e por três analistas diferentes. A concentração de histamina em cada uma foi calculada e a concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas foram avaliados.

Para verificar a especificidade do método, uma solução com as dez aminas em solvente e uma solução com as dez aminas extrato de peixe foram injetadas e os seus respectivos cromatogramas foram comparados. Além disso, um número de amostras brancas representativas (n = 20) foi analisado e foram checadas as interferências (sinais, picos, e vestígios iônicos) na região de interesse, na qual se esperava que o analito alvo pudesse eluir.

A reprodutibilidade interlaboratorial foi realizada pela participação em dois testes de proficiência organizados pelo FAPAS<sup>®</sup>. Um total de 209 laboratórios participou dos dois testes, sendo 98 no primeiro e 111 no segundo. Nestes testes, cada laboratório participante do ensaio de proficiência recebeu material de referência (MR) de amostras de atum em conserva para a determinação da histamina.

O mesmo MR foi utilizado para avaliar a veracidade do método. Seis repetições do MR foram analisadas. Após determinação da concentração de histamina presente em cada uma das repetições, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%). A veracidade foi definida dividindo-se a concentração média detectada pelo valor designado e multiplicando por 100, para exprimir o resultado em porcentagem.

Para verificar a robustez do método, algumas variações foram introduzidas e as consequências observadas na resposta. Os seguintes fatores foram selecionados: analista, marca do reagente, curva de calibração e lote da solução padrão. Esses fatores foram modificados e foi investigado se poderiam influenciar os resultados, avaliando se o método era ou não robusto.

Para o cálculo do limite de detecção (LD), foram injetadas 21 replicatas da matriz branca e multiplicou-se o resultado por três vezes o desvio padrão da concentração encontrada. Para o cálculo do limite de quantificação (LQ), o resultado das 21 replicatas foi multiplicado por 10 vezes o desvio padrão da concentração encontrada (INMETRO, 2011).

Para a determinação do  $CC\alpha$  e do  $CC\beta$ , foram analisadas 20 amostras brancas fortificadas com histamina no limite permitido (100 mg/kg). O  $CC\alpha$  foi calculado com a concentração no limite permitido mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão ( $\alpha =$

5%). O  $CC\beta$  foi calculado com o valor do  $CC\alpha$  mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão ( $\beta = 5\%$ ).

### I.2.2.2 Estimativa da incerteza de medição

A incerteza do método foi calculada de acordo com BRASIL (2011). Para fins de garantia de qualidade, em química analítica, uma incerteza expandida ( $U$ ) deve ser usada.  $U$  fornece um intervalo dentro do qual se acredita que o valor da concentração do analito situa-se dentro de um nível mais alto de confiança ( $p = 95\%$ ).  $U$  foi obtida multiplicando  $u_c(y)$ , a incerteza padrão combinada, por um fator de abrangência  $k$  de acordo com a equação 1. A incerteza combinada  $u_c(y)$  foi calculada a partir da raiz quadrada da soma de vários parâmetros independentes, tais como, a incerteza da precisão intermediária  $u(Pi)$ ; a incerteza de recuperação  $u(C_{rec})$ ; a incerteza da curva de calibração  $u(C_{cal})$ ; o fator de correção da curva de calibração incerteza  $u(fc_{cc})$ ; a incerteza da massa  $u(m)$ ; e a incerteza do volume  $u(V)$  (equação 2).

$$U = k * u_c(y) \quad (1)$$

$$u_c(y) = \sqrt{u^2(Pi) + u^2(C_{rec}) + u^2(C_{cal}) + u^2(fc_{cc}) + u^2(m) + u^2(V)} \quad (2)$$

### I.2.2.3 Determinação de histamina em pescado

Após quarteamento as amostras de atum foram trituradas em processador Arno Magiclean Duetto, utilizando o modo pulsar, até que a amostra apresentasse consistência pastosa. Foram pesados 5 g da amostra triturada. Em seguida, foram adicionados 7 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% e a mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex (Biomatic, Porto Alegre, RS, Brasil) por 70 segundos. O extrato foi separado em centrífuga refrigerada modelo MR23i (Jouan SA, Saint Herblain, França). A centrifugação foi realizada a uma velocidade de 11250 x  $g$ , durante 3 minutos e a uma temperatura de 0 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi filtrado em papel qualitativo. A partir da etapa de adição de ácido, este procedimento foi repetido por mais duas (02) vezes, os extratos foram combinados e o volume final de 25 mL foi completado em balão volumétrico com ácido tricloroacético 5%.

Os extratos foram filtrados em membrana HAWP em éster de celulose, de 13 mm de diâmetro e 0,45  $\mu m$  de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE por pareamento de íons usando coluna de fase

reversa (Nova-Pak® C18, 300 x 3,9 mm, 4 µm) e pré-coluna (Nova-Pak® C18, 20 x 3,9 mm, 4 µm). A detecção foi fluorimétrica a 340 nm de excitação e 450 nm de emissão, após derivação pós-coluna com OPA (VALE & GLÓRIA, 1997; SILVA, 2008).

Para a separação das aminas, foram empregadas como fases móveis solução tampão de acetato de sódio:octanossulfonato de sódio (fase A) e acetonitrila (fase B) em gradiente de eluição. A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando um sistema LC-20AD, um detector RF-10AXL espectrofluorimétrico a 340 e 450 nm de excitação e de emissão, respectivamente, um controlador de CBM-20A e o software LC solution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

A identificação das aminas foi feita por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com o das aminas em solução padrão em ácido clorídrico 0,1 mol/L e pelo aumento dos picos das aminas pela adição de padrão às amostras. Soluções padrão foram analisadas intercaladas a cada três amostras. A quantificação das aminas foi realizada por interpolação em curva analítica externa. Para obter a concentração de cada amina na amostra, multiplicou-se a concentração desta amina prevista na curva de calibração, o volume, o fator de correção da curva de calibração e o fator de correção da recuperação. O resultado obtido foi dividido pela massa da amostra (VALE & GLÓRIA, 1997; SILVA, 2008). Este cálculo foi expresso conforme a equação 3. As análises foram realizadas em triplicata e as médias aritméticas dos resultados foram utilizadas.

A determinação da histamina foi realizada a partir de amostras de peixes escombrídeos conforme descrito anteriormente.

$$C_{HIM} = \left[ \frac{\left( \frac{A_{amt} - b}{a} \right) \times V \times fc_{cc} \times fc_{rec}}{m} \right] \quad (3)$$

sendo:

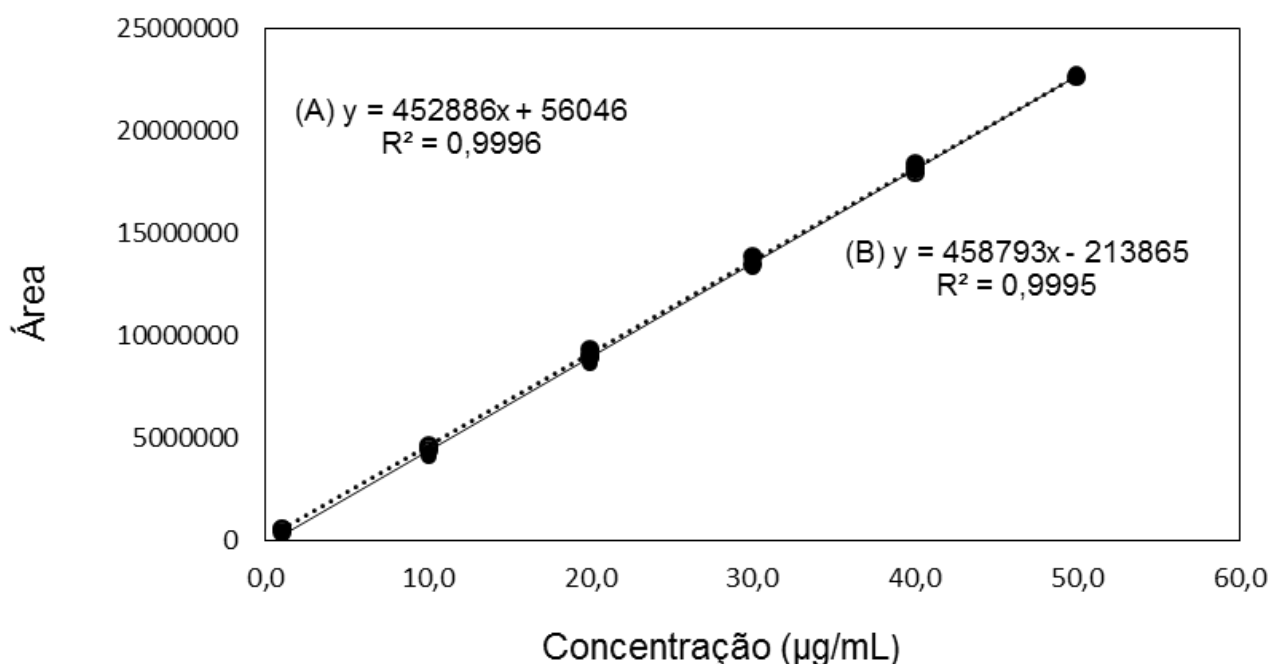
- $C_{HIM}$  - concentração de histamina na amostra (mg/kg);
- $A_{amt}$  - área da amostra;
- $b$  - intercepto da curva de calibração;
- $a$  - inclinação da curva de calibração;
- $fc_{cc}$  - fator de correção da curva de calibração;
- $V$  - volume final do extrato (mL);
- $m$  - massa da amostra (g); e
- $fc_{rec}$  - fator de correção da recuperação.

## I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### I.3.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

As curvas de calibração da histamina foram lineares na faixa de 1,0 - 50,0 µg/mL, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior do que 0,9995. A equação da curva padrão foi:  $y = 452886x + 56046$ . Na Figura I.1 está apresentada a curva de calibração da histamina no solvente e adicionada à matriz, na faixa de concentração de 1 a 50 µg/mL.

Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os interceptos e entre as inclinações das curvas. A faixa de trabalho foi linear para a histamina, tanto na matriz pescado quanto no solvente. Estes resultados confirmaram a ausência do efeito de matriz, portanto, foram utilizadas as curvas de calibração construídas com solvente.



**Figura I.1** – Curva de calibração da solução padrão de histamina no solvente ( \_\_ ) na matriz pescado (....). (A) – Equação da curva da histamina no solvente; (B) – Equação da curva na matriz pescado.

A recuperação média de histamina ( $n = 18$ ) determinada nos três níveis de concentrações diferentes foi 92,1%, o que está dentro do intervalo aceitável (80,0 – 110,0%) estabelecido pela EC (2002). A precisão e a veracidade foram avaliadas e os dados apresentados na Tabela I.1.

De acordo com a Diretiva 2002/657/CE, o CV de reprodutibilidade não deve exceder os 16% para concentrações acima de 1 mg/kg e o CV da repetibilidade deve ser até dois terços do CV da reprodutibilidade. O CV da repetibilidade ( $CV_r$ ) variou de 2,3% a 2,6% e o CV da reprodutibilidade ( $CV_R$ ) variou de 5,0% a 6,2%. Estes resultados confirmam a aplicabilidade do método validado no intervalo selecionado.

**Tabela I.1.** Resultados de precisão e veracidade avaliados por meio de matrizes idênticas fortificadas com histamina nos três níveis de concentração (10, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ).

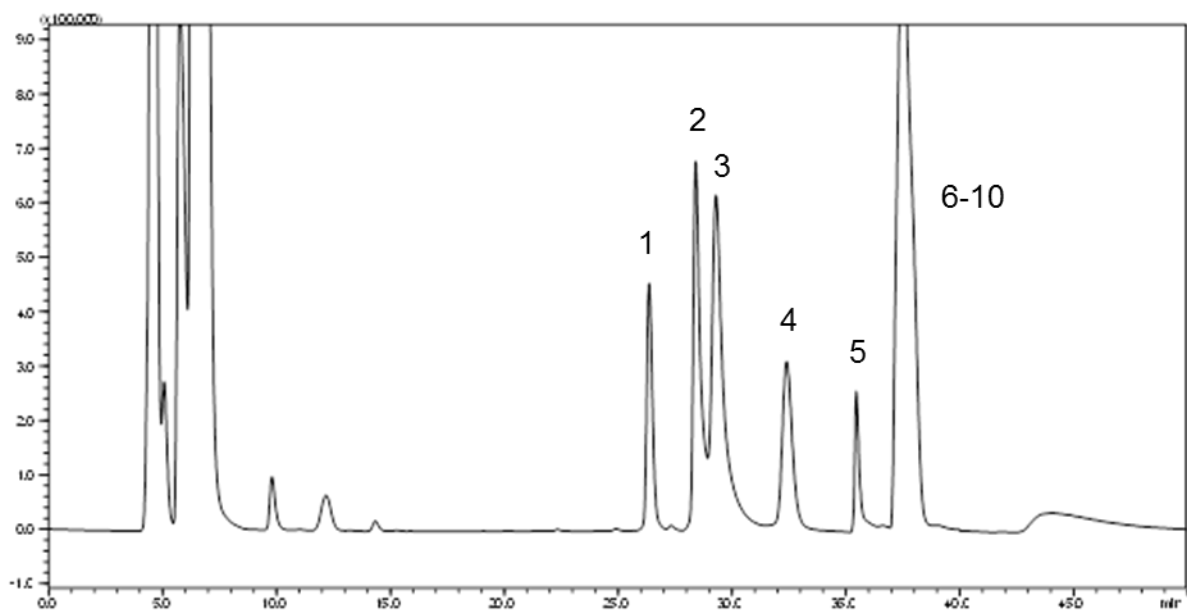
Ensaio	Concentração nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração média ( $\mu\text{g/mL} \pm \text{sd}$ )	Precisão		Veracidade (%)
			$CV_r$ (%)	$CV_R$ (%)	
(n=18)	10	9,03 $\pm$ 0,53	2,3	6,1	90
	20	18,58 $\pm$ 1,14	2,6	6,2	93
	30	27,96 $\pm$ 1,40	2,3	5,0	93

sd – Desvio padrão;  $CV_r$  – Coeficiente de variação da repetibilidade;  $CV_R$  – Coeficiente de variação da reprodutibilidade.

A veracidade foi avaliada também utilizando-se o MR em que o valor designado era 126,7 mg/kg. A concentração média de histamina (n = 6) encontrada foi de 118,17  $\pm$  4,05 mg/kg. O coeficiente de variação calculado foi de 3,4% e a veracidade foi de 92,1%.

A especificidade do método foi verificada pela análise dos cromatogramas obtidos após injeção dos padrões. O tempo de retenção foi de 32,5 minutos para a histamina (k = 5,5), e nenhum interferente foi detectado no tempo de retenção do analito em amostras brancas analisadas (n = 20) (Figura I.2). Além disso, não houve interferência das outras nove aminas bioativas que podem estar presentes simultaneamente no pescado. Soluções padrão de todas as aminas (tiramina, serotonina, 2-feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina) foram injetadas separadas e em conjunto com a histamina para verificar a ocorrência de interferências ou co-eluição, no entanto, os resultados foram negativos e o método foi considerado eficiente para a separação da histamina.





**Figura I.2** – Cromatograma de uma amostra branca adicionada com solução padrão de todas as aminas. 1 = Tiramina; 2 = Putrescina; 3 = Cadaverina; 4 = Histamina; 5 = Serotonina; 6 – 10 (Feniletilamina, Triptamina, Agmatina, Espermidina e Espermina). Condições cromatográficas descritas no texto.

Os valores de histamina designados nos ensaios de proficiência para as amostras foram 311,1 mg/kg e 126,7 mg/kg e os resultados encontrados foram 311,8 mg/kg e 118,2 mg/kg, respectivamente. Assim, o z-escore obtido para o primeiro teste foi de 0,0 e para o segundo teste foi -0,9. De acordo com o ISO Guia 43 e o FAPAS®, para ser considerado adequado o resultado do z-escore deve estar entre -2 e 2. Portanto o método apresenta boa reprodutibilidade interlaboratorial uma vez que os z-escores ficaram dentro da faixa aceitável.

A robustez do método também foi avaliada e nenhum desvio significativo foi observado dentro das alterações propostas.

O limite de detecção para a histamina em pescado foi de 0,03 mg/kg e o limite de quantificação foi de 0,09 mg/kg. O CC $\alpha$  e o CC $\beta$  foram calculados e os valores foram 102,61 mg/kg e 105,23 mg/kg, respectivamente. Estes valores são adequados para a análise de histamina em atuns e afins em relação ao limite estabelecido pela CE e o Mercosul (100 mg/kg).

### **I.3.2. ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO**

A concentração de 100 mg/kg de histamina na amostra foi adotada como referência para a estimativa da incerteza de medição. Os cálculos mostraram que as quatro principais fontes de incerteza foram precisão intermediária, recuperação, curva de

calibração e fator de correção de curva de calibração. A incerteza padrão combinada obtida foi igual a 8,0 e a escolha do fator  $k$  foi baseado no nível de confiança desejado. Para um nível de confiança de 95%,  $k$  é 2. Em seguida, de acordo com a equação 2, a incerteza padrão expandida ( $U$ ) foi igual a 16,0 ( $U = k \times u_c(y) \therefore U = 2 \times 8,0 = 16,0$ ). Portanto, o resultado da concentração de histamina ( $C_{HIM}$ ) com incerteza padrão de 16,0 e probabilidade de abrangência de 95% e  $k = 2$  foi  $C_{HIM} = (100,0 \pm 16,0)$  mg/kg.

### I.3.3. DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO

A fim de assegurar a eficácia da metodologia validada, os teores de histamina foram determinados em diferentes tipos de peixes frescos e atum enlatado. Tal como indicado na Tabela I.2, diferentes tipos de amostras de atum enlatado foram encontrados no mercado de Belo Horizonte. Entre as 92 amostras analisadas, a histamina não foi detectada (LQ = 0,09 mg/kg) em 51 amostras (55,4%); considerando os níveis que variaram de 0,45 a 83,73 mg/kg, a histamina foi detectada em 41 amostras (44,6%). A histamina foi detectada em todos os tipos de atum enlatado com uma prevalência variando de 25% a 75%, exceto para o atum ralado com molho à base de ervas que não apresentou histamina em nenhuma amostra. A presença de histamina em algumas destas amostras pode estar relacionada à utilização de partes menos nobres do atum ou que não estivessem mantidas sob condições higiênico-sanitárias adequadas. A histamina não foi detectada em 100% dos atuns e filés de peixes frescos de água doce.

**Tabela I.2.** Teores de histamina em diferentes tipos de atum enlatado adquiridos no mercado de Belo Horizonte

<b>Tipo de atum enlatado</b>	<b>Amostras (n+/n)</b>	<b>Ocorrência (%)</b>	<b>Teores de histamina (mg/kg)</b>
Sólido em sal e água	10/22	45	nd – 81,43
Sólido em óleo	4/16	25	nd – 11,06
Ralado em sal e água	4/12	33	nd – 2,06
Ralado em óleo	8/12	67	nd – 56,02
Ralado ao molho de ervas	0/9	0	nd
Ralado ao molho de tomate picante	6/9	67	nd – 19,40
Ralado ao molho de tomate	9/12	75	nd – 83,30
<b>Total</b>	<b>41/92</b>	<b>45</b>	<b>nd – 83,73</b>

n = número de amostras analisadas; n+ = amostras positivas; nd = não detectado (LQ = 0,09 mg/kg).

## I.4 CONCLUSÕES

O método de CLAE-par iônico foi validado para a quantificação de histamina em atum fresco e enlatado, atendeu aos critérios de desempenho estabelecidos pela Decisão 2002/657/CE e se enquadra na faixa de 100 a 200 mg/kg. O método também foi submetido a ensaios de proficiência, a incerteza foi calculada e a estabilidade de soluções e padrões foi investigada. O LD, LQ, CC $\alpha$  e CC $\beta$  foram 0,03; 0,09; 102,61; e 105,23 mg/kg, respectivamente. Não houve efeito da matriz, permitindo que a quantificação fosse realizada por meio de padrões preparados em solvente. O método mostrou-se adequado para o propósito e os dados gerados pelo laboratório foram confiáveis para a garantia da qualidade.

## **CAPÍTULO II**

### **GARANTIA DA QUALIDADE DE RESULTADO DO ENSAIO DE HISTAMINA EM ATUNS E AFINS DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS**

#### **II.1. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi implantar as técnicas de controle da qualidade previstas na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 para garantir a qualidade dos resultados do ensaio de histamina em atuns e afins no Laboratório de Bioquímica de Alimentos. O trabalho visou também realizar o estudo da estabilidade das soluções utilizadas na análise da histamina em atuns e afins.

#### **II.2. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **II.2.1. MATERIAL**

###### **II.2.1.1. Amostras**

O estudo do controle da qualidade dos resultados foi realizado com base em análises feitas no período de janeiro de 2012 a junho de 2014. Para isto foram utilizadas amostras de atuns. Estas amostras foram obtidas em postas congeladas, com aproximadamente 500 gramas cada.

###### **II.2.1.2. Reagentes e solventes**

Os padrões das aminas agmatina (AGM, sal sulfato), cadaverina (CAD, dicloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), tiramina (TIM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) e o *o*-ftalaldeído (OPA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Foram utilizados reagentes de grau analítico, com exceção dos solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes aquosos foram filtrados em membrana HAWP e os solventes orgânicos em membrana HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford,

MA, EUA). Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura – tipo 1, obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

## II.2.2. MÉTODOS

### II.2.2.1. Determinação da histamina

A determinação da histamina foi realizada conforme descrito no capítulo I.

### II.2.2.2. Técnicas de controle da qualidade

#### II.2.2.2.1. Ensaio de recuperação/adição de padrão

A recuperação da histamina foi estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas da mesma (*spike*), denominadas de controle interno da matriz fortificada (CIMF) e de um material de referência (MR) adquirido do FAPAS®. A quantidade de padrão de histamina adicionado foi igual ao valor do ponto médio da curva de calibração, ou seja, 30 µg/mL. Este valor equivale a 150 mg/kg, que é a média dos limites estabelecidos pelas legislações brasileira e europeia. O MR apresentava uma faixa de concentração estabelecida no certificado (194,4 a 258,4 mg/kg) com valor médio de 226,4 mg/kg. O cálculo do percentual de recuperação para a amostra fortificada foi obtido por meio da seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação} = [(CIMF - CIMB)/150 \text{ mg/kg}] \times 100, \quad (4)$$

sendo:

CIMF = controle interno da matriz fortificada; e

CIMB = controle interno da matriz branca.

O percentual de recuperação calculado utilizando-se o MR foi obtido (considerando o teor médio da amostra) utilizando a equação 5:

$$\% \text{ Recuperação} = [(MR - AB)/226,4 \text{ mg/kg}] \times 100, \quad (5)$$

sendo:

MR = material de referência; e

AB = amostra branca.

O critério de aceitação para o percentual de recuperação foi o estabelecido pela União Europeia que é de 80 a 110% para concentrações  $\geq 10 \mu\text{g/kg}$  (EC, 2002). Os percentuais de recuperação foram utilizados para elaboração de uma carta controle.

#### II.2.2.2.2. Carta controle para a porcentagem de recuperação

Uma carta controle foi elaborada utilizando o percentual de recuperação da histamina baseado no CIMF e no MR. Este parâmetro permitiu acompanhar a reprodutibilidade intralaboratorial dos resultados do ensaio. Os dados foram coletados no período de janeiro de 2012 a junho de 2014.

Os limites de controle superior e inferior foram determinados com base nos limites estabelecidos pela Comunidade Europeia (2002), sendo 110% de recuperação para o limite superior e 80% de recuperação para o limite inferior. Os parâmetros utilizados na avaliação crítica da carta controle estão descritos na Tabela II.1.

**Tabela II.1.** Critérios de avaliação da técnica baseados nos limites de controle superior (110% de recuperação) e inferior (80% de recuperação) utilizados na análise crítica da carta controle para tomada de decisão

<b>Eventos</b>	<b>Prováveis causas</b>	<b>Ações requeridas</b>
Um (1) ponto fora do limite de controle	Falha humana. Troca de reagentes. Contaminação de materiais. Problemas no equipamento de medição (perda de sensibilidade).	Repetir a análise imediatamente. Se o próximo resultado obtido estiver dentro dos limites de controle, continuar as análises. Caso contrário, descontinuar as análises e corrigir o problema.
Dois (2) pontos consecutivos fora do limite de controle	Falha humana. Troca de reagentes Contaminação de materiais. Problemas no equipamento de medição (perda de sensibilidade).	Repetir a análise. Se o próximo resultado estiver dentro dos limites de alerta, continuar as análises. Caso contrário, avaliar e corrigir o problema.
Cinco (5) pontos consecutivos ascendentes ou descendentes	Medições erradas Erros na projeção de cálculos dos limites de controle.	Descontinuar a análise e corrigir o problema.
Cinco (5) pontos consecutivos acima ou abaixo da média	Mau funcionamento do equipamento. Lote não uniforme de reagentes Mudança de técnico ou de equipamento.	Descontinuar a análise e corrigir o problema.

Fonte: Fidélis, 2013.

### II.2.2.2.3. Cálculo do fator de correção do padrão

Uma solução padrão (ponto médio da curva de calibração) foi intercalada a cada seis amostras numa corrida cromatográfica. As áreas obtidas foram utilizadas para o cálculo do fator de correção do padrão (f.c. pa).

O fator de correção do padrão foi utilizado para corrigir a concentração obtida do analito em função da curva de calibração. Utilizou-se a equação 6 para o cálculo do fator de correção:

$$f.c. pa = (C_t/C_{real}) = [C_{pa}/(A_{pa}-b/a)] \quad (6)$$

sendo:

$C_t$  = concentração teórica,

$C_{real}$  = concentração média encontrada do padrão,

$C_{pa}$  = concentração teórica do padrão,

$A_{pa}$  = área média do padrão,

$b$  = intercepto, e

$a$  = inclinação.

### II.2.2.2.4. Estudo de estabilidade de soluções

Além das técnicas de controle da qualidade previstas na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, foram realizados também estudos de estabilidade de algumas soluções padrão e fases móveis utilizadas no ensaio de histamina em atuns e afins. Foram avaliadas as seguintes soluções: solução tampão, solução de KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ácido tricloroacético 5% e solução padrão de histamina. A análise de cada solução foi descrita abaixo.

#### SOLUÇÃO TAMPÃO - FASE MÓVEL A

- Acetato de sódio tri-hidratado PA
- Acido acético glacial PA
- Água ultrapura (resistividade = 18,2 MΩ.cm a 25 °C)
- Octanossulfonato de sódio para CLAE

**Finalidade:** atua como fase móvel para que ocorra a separação das aminas.

**Condições de armazenamento:** frasco âmbar a temperatura ambiente ±22 °C.

**Estudo:** a solução tampão (fase móvel A) foi armazenada por 30 dias. Durante o período de armazenamento, monitorou-se o pH três vezes por semana.

**Critério de aceitação:** pH 4,90 ± 0,05.

#### SOLUÇÃO DE KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

- Acido bórico PA
- Água ultrapura (resistividade = 18,2 MΩ.cm a 25 °C)
- Hidróxido de potássio PA

**Finalidade:** diluente para o preparo da solução derivante.

**Condições de armazenamento:** Frasco de polietileno escuro a temperatura ambiente ±22 °C.

**Estudo:** a solução KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> foi armazenada por 30 dias. Durante o período de armazenamento, monitorou-se o pH três vezes por semana.

**Critério de aceitação:** pH 10,5 a 11,0.

#### SOLUÇÃO DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO 5% (p/v)

- Acido tricloroacético
- Água ultrapura (resistividade = 18,2 MΩ.cm a 25 °C)

**Finalidade:** solução ácida utilizada na extração das aminas.

**Condições de armazenamento:** frasco âmbar em temperatura ambiente.

**Estudo:** realizou-se levantamento do percentual de recuperação do controle interno - CI [faixa aceitável: 80% a 110% (EC, 2002)] e dos lotes da solução de TCA 5% (p/v) utilizados na extração da histamina, nas amostras analisadas em 2012 e 2013 (período 02/01 até 05/07). Obteve-se o número de dias de armazenamento da solução de TCA por meio das datas de preparo da solução e de extração de histamina na amostra. Estabeleceu-se a validade da solução de TCA após análise dos dados.

#### SOLUÇÃO PADRÃO DE HISTAMINA

- Ácido Clorídrico – HCl 0,1 mol/L
- Dicloridrato de histamina

**Finalidade:** construir a curva de calibração; calcular a concentração da histamina na amostra; comparar o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com o da histamina da solução padrão; fortificação de amostras para análise de recuperação.

**Condições de armazenamento:** refrigerado (4 a 10 °C) em frasco de polietileno.

**Estudo:** O estudo de estabilidade foi realizado de acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011).



A estabilidade da solução padrão foi estudada nas condições e no período de armazenamento nos quais a solução padrão foi armazenada no laboratório. Recomenda-se comparar a resposta instrumental gerada por uma solução padrão armazenada, com a resposta instrumental gerada por uma solução padrão recém-preparada. As soluções padrão foram preparadas e injetadas no cromatógrafo líquido no 1º dia e nos intervalos de 1 mês após o preparo da solução. Foram avaliadas as áreas obtidas de cada replicata.

Foram analisadas seis réplicas das soluções preparadas e armazenadas periodicamente, em intervalos de tempo predeterminados, e definiu-se o tempo máximo de estabilidade dos analitos estudados procedendo a testes *t* de Student utilizando o programa SISVAR®. As soluções foram consideradas estáveis quando não se observou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas.

A concentração da solução padrão do “pool” de aminas utilizada foi de 30 µg/mL (concentração intermediária da curva de calibração).

## **II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **II.3.1. CARTA CONTROLE PARA A RECUPERAÇÃO**

Os resultados referentes aos ensaios de recuperação são apresentados na carta controle (Figura II.1). Foram realizadas 28 análises no período de janeiro de 2012 a junho de 2014. Destas análises, quatro apresentaram recuperação fora dos limites estabelecidos pela Comunidade Europeia. A maioria das análises (86%) apresentou recuperação dentro dos limites máximos e mínimos estabelecidos.

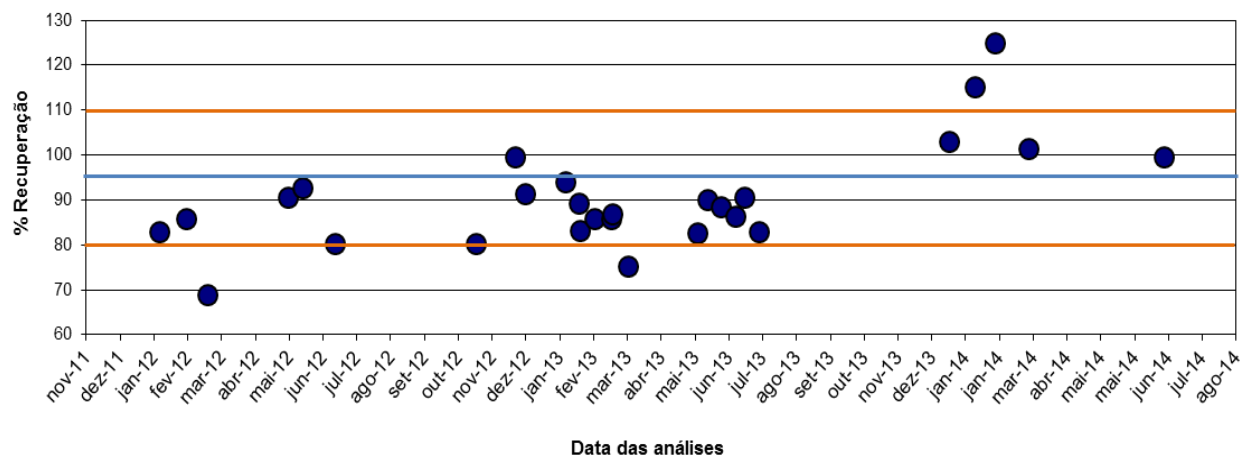
Os pontos que ficaram fora dos limites de controle foram tratados conforme especificado na Tabela II.1, ou seja, como os eventos apresentaram no máximo dois pontos fora dos limites de controle, as análises foram repetidas. Nestes casos os resultados obtidos por meio da repetição das análises apresentaram-se dentro dos limites de controle. Portanto deu-se prosseguimento às análises sem alteração no procedimento.

### **II.3.2. ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES**

#### **II.3.2.1. Solução Tampão usada como fase móvel**

Durante o armazenamento da solução tampão da fase móvel A por 30 dias, o pH permaneceu dentro da faixa aceitável (4,87 a 4,97). Portanto, foi estabelecida a validade

de 30 dias, conforme dados de pH registrados. O estudo também permitiu estabelecer uma nova faixa aceitável de pH (4,87 a 4,97) para a fase móvel A, uma vez que o pH variou dentro desta faixa e não interferiu nos resultados das análises.

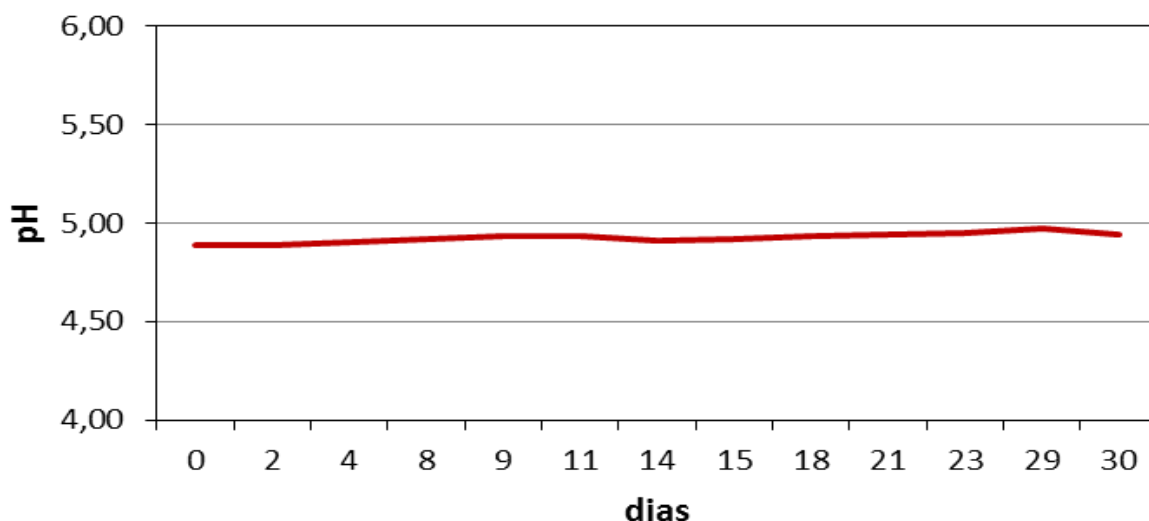


**Figura II.1.** Carta controle referente ao percentual de recuperação obtido para histamina na análise de material de referência por meio das análises de histamina em atuns e afins (Valor médio 95% - Linha azul; Limites inferior (80%) e superior (110%) - Linha laranja).

Na Figura II.2, está representado o monitoramento do pH da solução tampão no período de 30 dias de armazenamento. Pode-se observar que, durante o período de armazenamento, o pH da solução tampão foi estável, ou seja, permaneceu dentro da faixa aceitável ao longo do tempo. Os ensaios de avaliação da estabilidade da Fase Móvel A foram importantes, uma vez que esta solução é responsável pela interação das aminas com a coluna cromatográfica interferindo na separação destas. Sendo assim, uma alteração do pH desta solução poderia acarretar prejuízo para a análise. A estabilidade das soluções é importante também para evitar o desperdício e a produção de resíduos em excesso, além de diminuir o custo das análises.

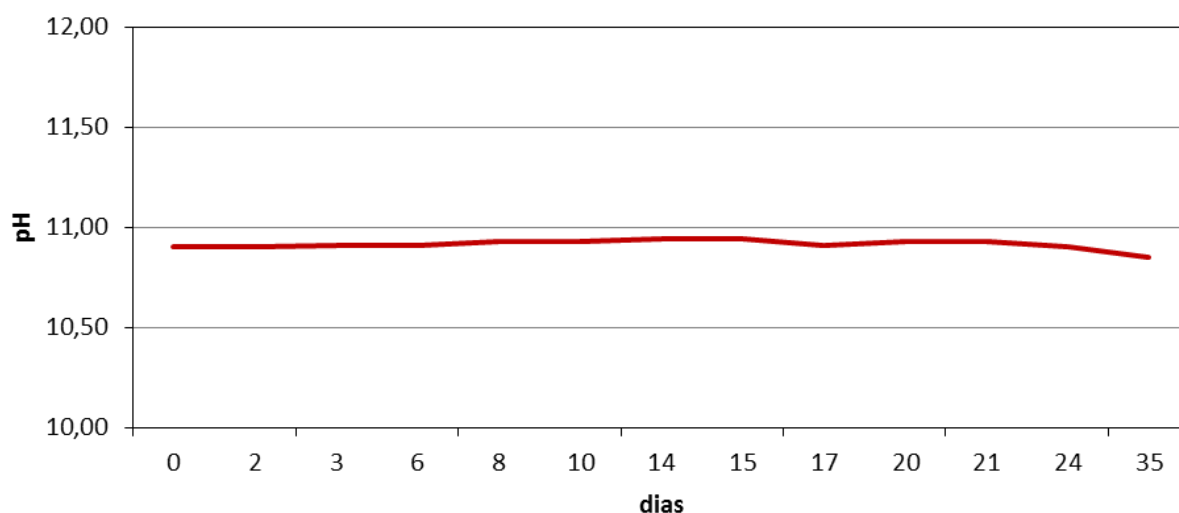
### II.3.2.2. Solução de KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Durante o período de armazenamento da solução de KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, que é usada para o preparo da solução derivante, o pH permaneceu dentro da faixa aceitável (10,5 a 11,0). Portanto, a validade foi definida para 30 dias. A faixa de aceitação do pH foi mantida.



**Figura II.2.** Avaliação do pH da solução tampão (Fase Móvel A) durante 30 dias de armazenamento (Linha vermelha - faixa de pH em que a solução foi medida).

Na Figura II.3, apresenta-se o monitoramento do pH da solução KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> no período de 30 dias de armazenamento. A avaliação da estabilidade da solução de KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> foi importante, uma vez que esta solução é utilizada como diluente no preparo da solução de derivação das aminas bioativas. Neste caso, uma alteração do pH desta solução poderia acarretar prejuízo na qualidade e eficácia da solução derivante e, conseqüentemente, interferir reação de derivação e na detecção das aminas.



**Figura II.3.** Avaliação do pH da Solução KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> durante 30 dias de armazenamento (Linha vermelha - faixa de pH em que a solução foi medida).

### II.3.2.3. Solução de TCA 5%

Foi utilizado o percentual de recuperação obtido a partir de análises do controle interno da matriz fortificada para avaliar a eficiência da extração da solução de TCA 5% (Tabela II.2). O TCA foi utilizado para extração da histamina nestas amostras.

O percentual de recuperação permaneceu dentro da faixa aceitável (80% a 110%) durante o período de 33 dias. Entretanto, a análise realizada no 33º dia de armazenamento do TCA apresentou percentual de recuperação no limite inferior da faixa aceitável (80%). Sendo assim, o tempo previsto de armazenamento foi mantido em 30 dias.

A importância de se avaliar a estabilidade da solução de TCA 5% é que esta solução é responsável pela extração das aminas presentes na amostra. Caso esta solução não esteja de acordo, poderá comprometer a eficiência da extração e, conseqüentemente, interferir na recuperação da histamina.

**Tabela II.2.** Estudo de estabilidade da solução de TCA 5% baseado no percentual de recuperação do controle interno

Tempo de armazenamento (dias)	Recuperação (%)
0	100,0
1	92,8
2	94,2
7	85,9
8	82,9
9	91,3
10	86,0
14	90,7
15	89,1
16	83,2
21	90,6
23	87,4
33	80,0

TCA: Ácido tricloroacético.

### II.3.2.4. Solução padrão de histamina

Foram preparados cinco lotes de soluções padrão de histamina que receberam as seguintes identificações: 001/15, 002/15, 003/15, 004/15 e 005/15. A solução 001/15 foi preparada no mês 1; a solução 002/15 foi preparada no mês 2; a solução 003/15 foi

preparada no mês 3; a solução 004/15 foi preparada no mês 4 e a solução 005/15 foi preparada no mês 5.

A cada mês, a média das áreas das replicatas de uma solução recém preparada eram comparadas à média das áreas das replicatas da solução 001/15, que foi a primeira solução padrão preparada. Observou-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao realizar a comparação de médias das áreas de cada solução à solução de lote 001/15.

Como o tempo de preparo entre a solução 001/15 e 005/15 foi de 150 dias, este foi o período considerado apto para a utilização da solução padrão. Ou seja, o prazo de validade estabelecido para a solução padrão de histamina foi de 150 dias.

## **II.4. CONCLUSÃO**

As técnicas de controle da qualidade previstas na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 foram desenvolvidas e implantadas no LBqA e foram eficazes para garantir a qualidade do ensaio de histamina em atuns e afins. O estudo de estabilidade das soluções permitiu estabelecer prazos de validade de 30 dias para as soluções da fase móvel A, da solução de KOH/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e da solução derivante e de 150 dias para a solução padrão de histamina.

# CAPÍTULO III

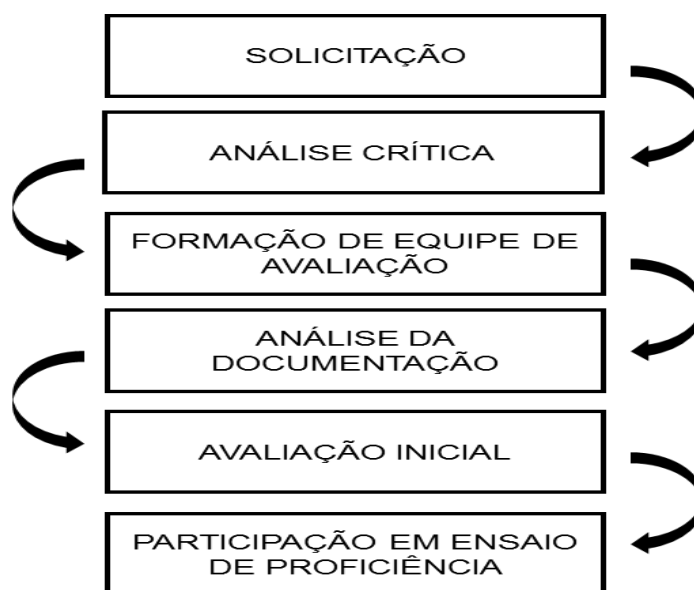
## ACREDITAÇÃO DO LABORATÓRIO JUNTO À COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO DO INMETRO TENDO COMO ESCOPO A ANÁLISE DE HISTAMINA EM PESCADO

### III.1. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi descrever o processo de acreditação do Laboratório de Bioquímica de Alimentos junto à Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) segundo requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, tendo como escopo a análise de histamina em pescado.

### III.2. MATERIAL E MÉTODOS

Para obter a acreditação do laboratório foi necessário seguir as etapas exigidas pela CGCRE conforme indicado na Figura III.1 (INMETRO, 2013). As etapas de “análise crítica”, “formação de equipe de avaliação” e “análise da documentação” foram realizadas pela CGCRE.



**Figura III.1.** Etapas do fluxo operacional definidas pela CGCRE para obtenção da acreditação.

### III.2.1. AMOSTRAS PARA REALIZAÇÃO DE ENSAIO PARA AVALIAÇÃO INICIAL PELA CGCRE

A avaliação inicial consistiu de uma auditoria da equipe de avaliação definida pela CGCRE às instalações do Laboratório com o objetivo de verificar por meio de evidências objetivas:

- a) a implementação do sistema de gestão estabelecido no Manual da Qualidade e na documentação associada, que deve atender aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005;
- b) a competência técnica do laboratório para realizar os serviços para os quais solicitou a acreditação.

Foram utilizadas nove amostras conforme procedimentos documentados do LBqA. Estas amostras foram codificadas como 0146A/12, 0146B/12, 0146C/12, 0146D/12, 0146E/12, 0146F/12, 0146G/12, 0146H/12, 0146I/12. Neste ensaio foram analisadas também amostras fortificadas com solução padrão de histamina na concentração de 150 mg/kg denominadas de Controle Interno da Matriz Fortificada (CIMF) e amostras do Material de Referência (MR) adquiridas do FAPAS® para obtenção do percentual de recuperação. O MR apresentava uma concentração média de 226,4 mg/kg. O percentual de recuperação utilizando-se amostra fortificada foi obtido por meio da equação 7:

$$\% \text{ Recuperação} = [(CIMF - CIMB)/150 \text{ mg/kg}] \times 100, \quad (7)$$

sendo:

CIMF: controle interno da matriz fortificada; e

CIMB: controle interno matriz branca.

Já o percentual de recuperação utilizando-se MR foi obtido (considerando o teor médio da amostra) por meio da equação 8:

$$\% \text{ Recuperação} = [(MR - AB)/226,4 \text{ mg/kg}] \times 100, \quad (8)$$

sendo:

MR: Material de Referência;

AB: amostra branca.

Este ensaio foi acompanhado pela equipe de avaliadores desde o recebimento das amostras até a emissão dos resultados.

### **III.2.2. AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE PROFICIÊNCIA**

A participação em ensaio de proficiência (EP) é uma exigência da CGCRE para concessão da acreditação. O LBqA participou da rodada número 27101 conduzida pelo FAPAS® em 2012. Foi utilizada uma amostra de atum enlatado (150 g), com teor de histamina desconhecido pelos laboratórios participantes do EP. O LBqA codificou esta amostra com o número 0152/12.

### **III.2.3. AMOSTRAS PARA CONTROLE DA QUALIDADE**

Para certificar a eficácia do método por meio do percentual de recuperação foi realizado, paralelamente, análise do MR (atum enlatado, FAPAS®) com teor de histamina conhecido. Esta amostra foi adquirida para controle de qualidade interno do laboratório e apresentava concentração média de 226,4 mg/kg.

### **III.2.4. REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS**

Dicloridrato de histamina e *o*-ftalaldeído (OPA) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Foram utilizados reagentes de grau analítico, com exceção dos solventes utilizados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes aquosos foram filtrados em membrana HAWP e os solventes orgânicos em membrana HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

### **III.2.5. DETERMINAÇÃO DA HISTAMINA**

A determinação da histamina foi realizada conforme descrito no capítulo I.



### **III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **III.3.1. RELATO DAS ETAPAS DO PROCESSO DE ACREDITAÇÃO**

##### **III.3.1.1. Solicitação da acreditação**

A primeira etapa do processo de acreditação consistiu em solicitar um *login* e uma senha para acesso ao sistema “ORQUESTRA” pelo *e-mail* “[planav@inmetro.gov.br](mailto:planav@inmetro.gov.br)”, cujo endereço é “<http://orquestra.inmetro.gov.br>”. Este sistema permitiu o acesso do laboratório às informações do seu processo de concessão da acreditação. Os formulários relacionados ao escopo da proposta de solicitação da acreditação foram preenchidos e enviados à Divisão de Acreditação de Laboratórios (DICLA).

##### **III.3.1.2. Análise crítica da solicitação da acreditação**

Foi realizada uma análise crítica da solicitação de acreditação pela CGCRE para assegurar de que esta dispõe dos recursos necessários para o início imediato do processo de avaliação. Foi então designado um Gestor de Acreditação (GA) como responsável pelo gerenciamento do processo e contatos com o laboratório.

##### **III.3.1.3. Formação da equipe de avaliação**

A equipe de avaliadores foi formada pela CGCRE a partir de um cadastro de avaliadores e especialistas treinados e qualificados para esta atividade. Estes profissionais vinculados ao INMETRO ou a outras organizações possuem especializações em diferentes grupos de calibração, classe de ensaios, e áreas de atividade.

Inicialmente foram indicados dois avaliadores, sendo um especialista e um avaliador líder. Cabe ao especialista fornecer conhecimento específico com respeito ao escopo de acreditação a ser avaliado e ao avaliador líder a responsabilidade geral sobre atividades de avaliação (INMETRO, 2013).

##### **III.3.1.4. Análise da documentação**

A equipe de avaliação analisou toda a documentação encaminhada, com base nos requisitos estabelecidos pela CGCRE. Esta análise consistiu em verificar a consistência

do Sistema de Gestão da Qualidade e a conformidade da documentação com os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 e com as Normas Internas (NIT-DICLA).

### III.3.1.5. Avaliação inicial pela CGCRE

Os teores de histamina encontrados nas amostras destinadas à avaliação inicial estão descritos na Tabela III.1. Apenas uma amostra apresentou histamina. Para todas as outras amostras a histamina não foi detectada.

**Tabela III.1.** Teor de histamina nas amostras utilizadas para a realização da avaliação inicial pela CGCRE

Amostra	Teor de histamina (mg/kg)
0146A/12	nd
0146B/12	4,31
0146C/12	nd
0146D/12	nd
0146E/12	nd
0146F/12	nd
0146G/12	nd
0146H/12	nd
0146I/12	nd

nd = não detectado (LQ = 0,09 mg/kg).

Os teores de histamina e o percentual de recuperação encontrados no ensaio para avaliação inicial pela CGCRE podem ser observados na Tabela III.2. Foram encontrados 80,4% de recuperação para o CIMF e 82,6% de recuperação para MR do FAPAS®. Estes resultados estão dentro da faixa de aceitação para o percentual de recuperação que é de 80% a 110% para concentrações  $\geq 10 \mu\text{g/kg}$  (EC, 2002). A determinação do percentual de recuperação é importante, pois tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração e das perdas advindas de todas as etapas da análise, realizadas até a leitura da resposta instrumental (BRASIL, 2011).

**Tabela III.2.** Teores médios de histamina no Controle Interno da Matriz Fortificada (CIMF) e no Material de Referência (MR) utilizados na avaliação inicial e percentual médio de recuperação obtido

<b>Amostra</b>	<b>Teor de histamina (mg/kg)</b>	<b>Concentração Teórica (mg/kg)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
CIMF	120,67	150,00	80,4
MR	187,17	226,40	82,6

Na Tabela III.3 estão apresentados os teores de histamina obtidos na análise da amostra do EP (triplicata), assim como o valor médio e o desvio padrão. O teor médio encontrado foi de 278,81 mg/kg, o desvio padrão foi 2,9 e o coeficiente de variação encontrado foi de 1%. De acordo com BRASIL (2011), para ser considerado adequado, o CV para concentrações entre 100 mg/kg e 1000 mg/kg deve estar abaixo de 5,3%. Portanto, considera-se o resultado adequado. Foi realizada também análise do MR paralelamente à análise da amostra do EP (Tabela III.4). O percentual de recuperação obtido nesta análise foi de 89,4%.

**Tabela III.3.** Teor de histamina na amostra utilizada para o Ensaio de Proficiência (FAPAS®)

<b>Amostra FAPAS®</b>	<b>Teor de histamina (mg/kg)</b>
0152/12-Repetição 1	282,06
0152/12-Repetição 2	276,48
0152/12-Repetição 3	277,88
Média ± desvio padrão	278,81 ± 2,9

**Tabela III.4.** Teor de histamina no Material de Referência (MR) e percentual de recuperação obtido

<b>Amostra</b>	<b>Teor de histamina (mg/kg)</b>	<b>Concentração teórica (mg/kg)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
MR	202,40	226,40	89,4

Considerando estas recuperações, o teor de histamina da amostra do EP corrigido foi de 311,8 mg/kg. O resultado do EP foi divulgado pelo FAPAS® posteriormente por meio do relatório (FAPAS® Report 27101). De acordo com este relatório, o valor designado da amostra do Ensaio de Proficiência foi de 311,1 mg/kg. Desta forma o resultado encontrado pelo LBqA foi considerado excelente.

Dentre os laboratórios participantes (98), o LBqA foi o que obteve melhor desempenho ( $-2 \leq z \leq 2$ ), uma vez que o z-escore obtido foi zero. A técnica de z-escore é adotada quando se deseja avaliar o desempenho técnico de laboratórios, principalmente em testes de proficiência (CHUI et al., 2004). Os dez laboratórios com melhor desempenho foram selecionados e destacados na Tabela III.5.

**Tabela III.5.** Teores de histamina e z-escores obtidos pelos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência FAPAS® Report 27101

<b>Laboratório</b>	<b>Resultado (mg/kg)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Limite de Detecção (mg/kg)</b>	<b>z-escore</b>
A	309,00	NA	3,00	-0,1
B	308,90	89,7	2,30	-0,1
C	310,00	92,0	5,00	-0,1
D	308,00	NA	40,00	-0,1
LBqA*	311,80	89,4	0,09	0
E	313,00	103,0	NA	0,1
F	312,40	88,7	7,00	0,1
G	316,00	NA	5,00	0,2
H	316,50	81,2	5,00	0,3
I	318,00	100,0	20,00	0,3

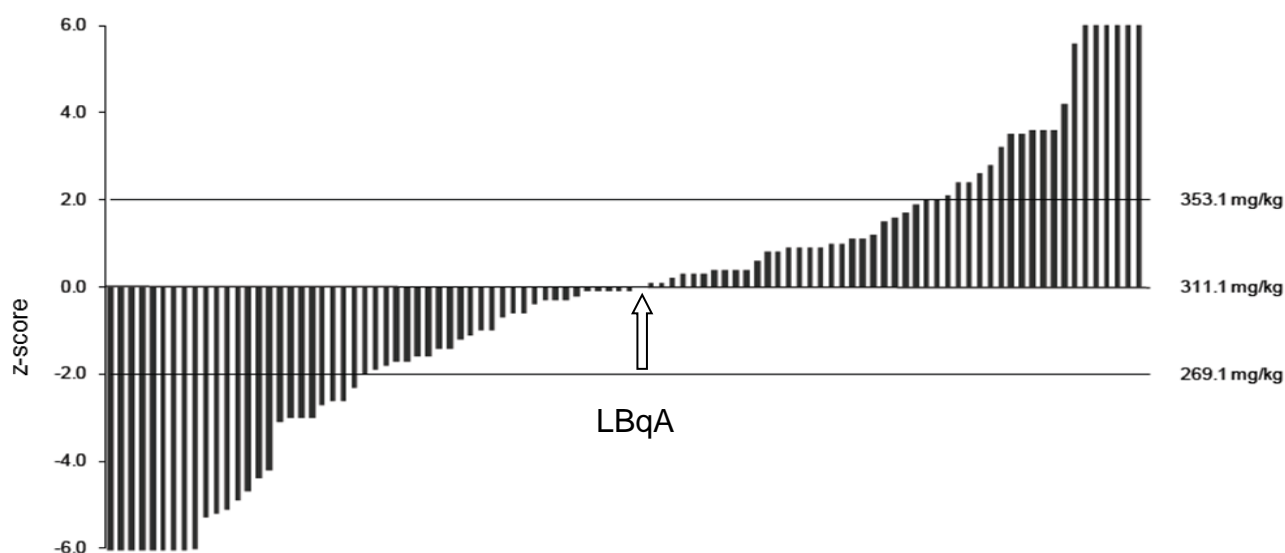
NA - Não apresentado. \*LBqA - Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Dos 98 laboratórios participantes, 56% obtiveram desempenho satisfatório ( $-2 \leq z \leq 2$ ) e 44% apresentaram desempenho insatisfatório sendo:  $|z| > 2$ . O z-escore foi considerado satisfatório quando os teores de histamina ficaram entre 269,10 e 353,10 mg/kg e insatisfatório quando estiveram abaixo de 269,10 mg/kg ou acima de 353,10 mg/kg. Os resultados referentes ao desempenho dos laboratórios baseado no z-escore podem ser visualizados na Figura III.2.

Interessante observar que dentre os dez laboratórios com melhor desempenho, o método de análise utilizado por 100% destes laboratórios foi a CLAE. Destes, 50% utilizaram detector de fluorescência, 30% utilizaram detector de arranjo de diodos e 20% utilizaram detector ultravioleta. Além disso, 70% destes laboratórios que apresentaram os melhores resultados eram acreditados, o que comprova a eficácia da CLAE e a importância da acreditação de laboratórios para a confiabilidade de resultados analíticos.

### III.3.2. DECISÃO DA ACREDITAÇÃO

A decisão sobre a concessão da acreditação foi tomada pelo Coordenador da CGCRE, com base nas recomendações da equipe de avaliação, do Gestor de Acreditação, do Chefe de Núcleo e da Comissão da Acreditação. Esta decisão foi tomada considerando que o sistema de gestão estabelecido no Manual da Qualidade e na documentação associada atenderam aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, NIT-DICLA 026 e NIT-DICLA 031 e que o LBqA é competente tecnicamente para realizar os serviços para os quais solicitou a acreditação.



**Figura III.2.** Desempenho dos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência realizado no ano de 2012 para concessão da acreditação – Fonte: FAPAS® Report 27101. z-score satisfatório ( $-2 \leq z \leq 2$ ).

### III.3.3. FORMALIZAÇÃO DA ACREDITAÇÃO

A formalização da acreditação ocorreu por meio de ofício enviado ao LBqA, acompanhado do Certificado de Acreditação e do Escopo da Acreditação, emitidos pela

CGCRE. Também foram encaminhados o Símbolo da Acreditação para seu uso nos certificados de análise emitidos.

### III.3.4. MANUTENÇÃO DA ACREDITAÇÃO

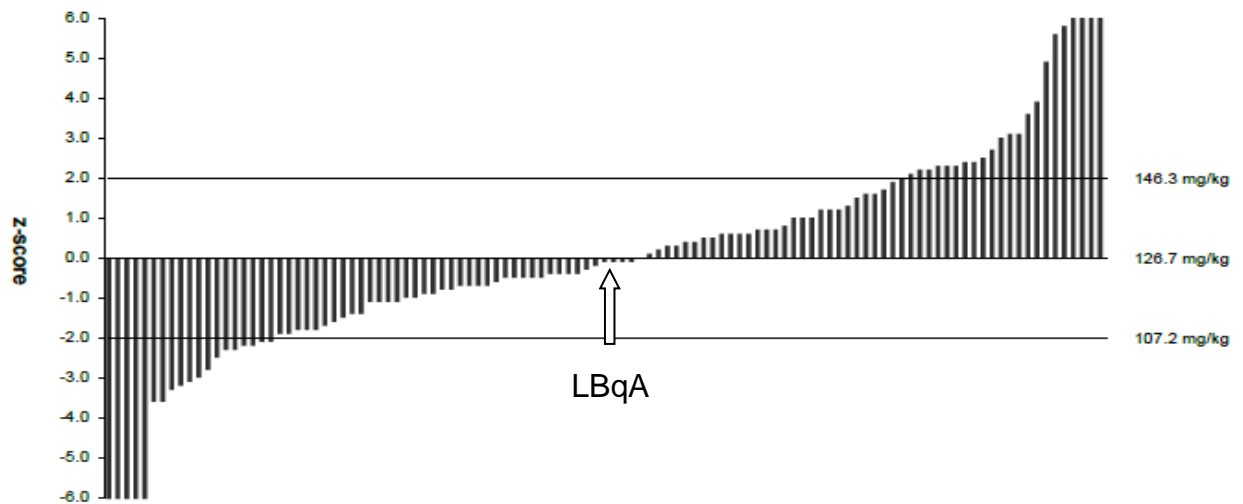
A CGCRE realiza reavaliações periódicas para verificar se os requisitos estabelecidos para a acreditação continuam sendo atendidos pelo laboratório. A primeira reavaliação do LBqA ocorreu doze meses após a acreditação inicial, e as reavaliações subsequentes ocorrerão em intervalos de dois anos a partir da data da última reavaliação. As não conformidades constatadas foram registradas em relatórios que foram encaminhados pelo Gestor de Acreditação por meio de *e-mail* ao LBqA para a implementação de ações corretivas. Os prazos para realização das ações corretivas referentes às não-conformidades constatadas durante a primeira reavaliação foram acordados entre a CGCRE e o LBqA.

A CGCRE detém a prerrogativa de realizar reavaliações em intervalos diferentes dos prescritos, bem como avaliações extraordinárias, quando julgar necessário. Nos períodos compreendidos entre as reavaliações, a CGCRE também pode realizar o monitoramento do laboratório, por meio de análise de documentos e o Ensaio de Proficiência (INMETRO, 2013).

Em março de 2014 foi realizada nova rodada do EP no qual o LBqA participou, juntamente com outros 110 laboratórios. O LBqA codificou a amostra com o número 0052/14.

Foi realizada análise do MR paralelamente ao EP para se obter um percentual de recuperação. O percentual de recuperação encontrado foi 100,5%. Considerando esta recuperação, o teor de histamina na amostra do EP corrigido foi de 118,20 mg/kg. O resultado do EP foi divulgado pelo FAPAS<sup>®</sup> posteriormente por meio de relatório (FAPAS<sup>®</sup> Report 27132). De acordo com este relatório, o valor designado foi 126,70 mg/kg. O LBqA obteve z-escore de -0,9. Desta forma o resultado encontrado pelo LBqA para este EP foi também considerado excelente.

Dos 111 laboratórios participantes deste ensaio de proficiência, 63% apresentaram desempenho satisfatório ( $-2 \leq z \leq 2$ ). O z-escore foi considerado satisfatório quando os teores de histamina ficaram entre 107,20 a 146,30 mg/kg e insatisfatório quando estiveram abaixo de 107,20 mg/kg e/ou acima de 146,30 mg/kg. Na Figura III.3 foi apresentado o desempenho destes laboratórios baseado no z-escore.



**Figura III.3.** Desempenho dos laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência realizado no ano de 2014 para manutenção da acreditação – Fonte: FAPAS® Report 27132. z-escore satisfatório ( $-2 \leq z \leq 2$ ).

### III.4. CONCLUSÃO

O processo de acreditação do Laboratório de Bioquímica de Alimentos junto à CGCRE/INMETRO segundo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, tendo como escopo a análise de histamina em pescado foi descrito.

# **CAPÍTULO IV**

## **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ATUNS E AFINS COMERCIALIZADOS NO MERCADO INTERNO BRASILEIRO SEGUNDO OS TEORES DE HISTAMINA E OUTRAS AMINAS BIOATIVAS**

### **IV.1. OBJETIVO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade de atuns e afins destinados ao mercado interno brasileiro, utilizando-se como critério, os teores de aminas e o índice de Mietz & Karmas. Objetivou também apresentar os resultados aos representantes das empresas de pesca.

### **IV.2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **IV.2.1. MATERIAL**

##### **IV.2.1.1. Amostras**

Foi utilizado um total de onze (11) amostras de peixes atum coletadas de forma aleatória em quatro empresas de pesca localizadas na região sul do estado do Espírito Santo. A empresa “A” forneceu cinco amostras, a empresa “B” duas amostras, a empresa “C” três e a empresa “D” forneceu uma amostra. Estas amostras foram capturadas por pequenas embarcações e eram destinadas ao mercado interno brasileiro. As amostras foram limpas e evisceradas imediatamente, mantidas congeladas e levadas ao Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

##### **IV.2.1.2. Reagentes e solventes**

Os padrões das aminas agmatina (AGM, sal sulfato), cadaverina (CAD, dicloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), serotonina (SRT,



cloridrato), tiramina (TIM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) e o o-ftalaldeído (OPA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Foram utilizados reagentes de grau analítico, com exceção dos solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes aquosos foram filtrados em membrana HAWP e os solventes orgânicos em membrana HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura – tipo 1, obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

## **IV.2.2. MÉTODOS**

### **IV.2.2.1. Determinação das aminas bioativas**

A determinação da histamina foi realizada conforme descrito no capítulo I.

### **IV.2.2.2. Determinação do índice de qualidade baseado nos teores de aminas bioativas**

Considerando que a histamina por si só nem sempre é útil como um indicador da qualidade do pescado, Mietz & Karmas (1977) propuseram um índice de qualidade químico para estabelecer o grau de decomposição deste alimento.

O índice é dado por meio da seguinte equação (9):

$$\text{Equação 9} \quad \text{Índice Mietz \& Karmas} = (\text{PUT} + \text{HIM} + \text{CAD}) / (1 + \text{EPD} + \text{EPM}),$$

sendo:

PUT: putrescina; HIM: histamina; CAD: cadaverina; EPD: espermidina e EPM: espermina.

A técnica empregada para a determinação dos teores das aminas biogênicas foi a cromatografia líquida de alta eficiência.

A interpretação do índice é realizada da seguinte forma: para valores de 0 a 1, o pescado é considerado de boa qualidade, valores de 1 a 10, de qualidade intermediária, e para valores acima de 10, o atum é considerado decomposto.

### IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### IV.3.1. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ATUNS E AFINS CAPTURADOS POR PEQUENAS EMBARCAÇÕES POR MEIO DA ANÁLISE DE HISTAMINA E DE OUTRAS AMINAS BIOATIVAS

O desembarque da produção em Itaipava/ES é realizado diretamente na praia, onde o pescado é transportado manualmente por carregadores do barco até as peixarias ou até caminhões estacionados na orla. Este procedimento de desembarque, a estrutura física dos barcos, bem como a manipulação do pescado nesta região do Espírito Santo foram apresentados no Anexo II por meio de fotos feitas no local. Apesar das precárias condições higiênico-sanitárias durante manipulação do pescado, as amostras analisadas apresentaram-se com excelente qualidade com relação aos teores de aminos.

Das dez aminos analisadas não foi detectada a presença de histamina, serotonina e triptamina em nenhuma das amostras (Tabela IV.1). O teor de aminos biogênicas é útil para estimar o frescor e o grau de deterioração do pescado e outros produtos da pesca. Foram encontrados baixos teores de algumas aminos biogênicas nas amostras de pescado capturados por pequenas embarcações da região sul do Espírito Santo.

**Tabela IV.1.** Teores de aminos por amostras de pescado capturados por pequenas embarcações da região sul do estado do Espírito Santo

AMOSTRAS	Teores de aminos em mg/kg									
	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM
001	0,65	nd	nd	nd	nd	nd	2,99	nd	11,77	nd
002	1,15	nd	nd	nd	nd	nd	8,39	1,24	23,42	nd
003	3,28	4,22	nd	1,86	nd	5,45	8,59	1,56	18,53	nd
004	1,22	0,57	nd	nd	nd	nd	2,24	nd	12,01	nd
005	1,00	0,40	nd	nd	nd	nd	5,02	nd	17,25	nd
006	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,03	0,48	20,21	nd
007	1,07	nd	nd	nd	nd	nd	6,45	nd	18,02	nd
008	0,47	nd	nd	nd	nd	nd	4,59	nd	17,01	nd
009	2,13	3,51	nd	1,96	nd	3,79	5,36	nd	14,60	nd
010	0,46	nd	nd	nd	nd	nd	3,79	nd	13,25	nd
011	2,95	2,12	nd	1,24	nd	1,21	7,36	nd	17,80	nd

PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, TIM – tiramina, SRT – serotonina, AGM – agmatina, EPD – espermidina, FEM – feniletilamina, EPM – espermina, TRM – triptamina. nd: não detectado (< 0,40 mg/kg).

As aminas associadas a condições higiênico-sanitárias inadequadas como putrescina e cadaverina estavam presentes em baixos teores. Nas amostras que continham putrescina, os teores variaram de 0,46 a 3,28 mg/kg. A cadaverina foi encontrada nas amostras 003, 004, 006, 009 e 011 e os teores variaram de 0,40 a 4,22 mg/kg. Estas aminas, em teores elevados, são indesejáveis visto que são encontradas em produtos em decomposição e putrefação, além disto podem potencializar o efeito adverso da histamina no homem (GLÓRIA, 2005).

Tiramina e agmatina foram encontradas nas amostras 003, 009 e 011. Os teores de tiramina variaram de 1,24 a 1,96 mg/kg e os de agmatina variaram de 1,21 a 5,45 mg/kg. Apenas as amostras 002, 003 e 006 apresentaram feniletilamina e seus teores variaram de 0,48 a 1,56 mg/kg.

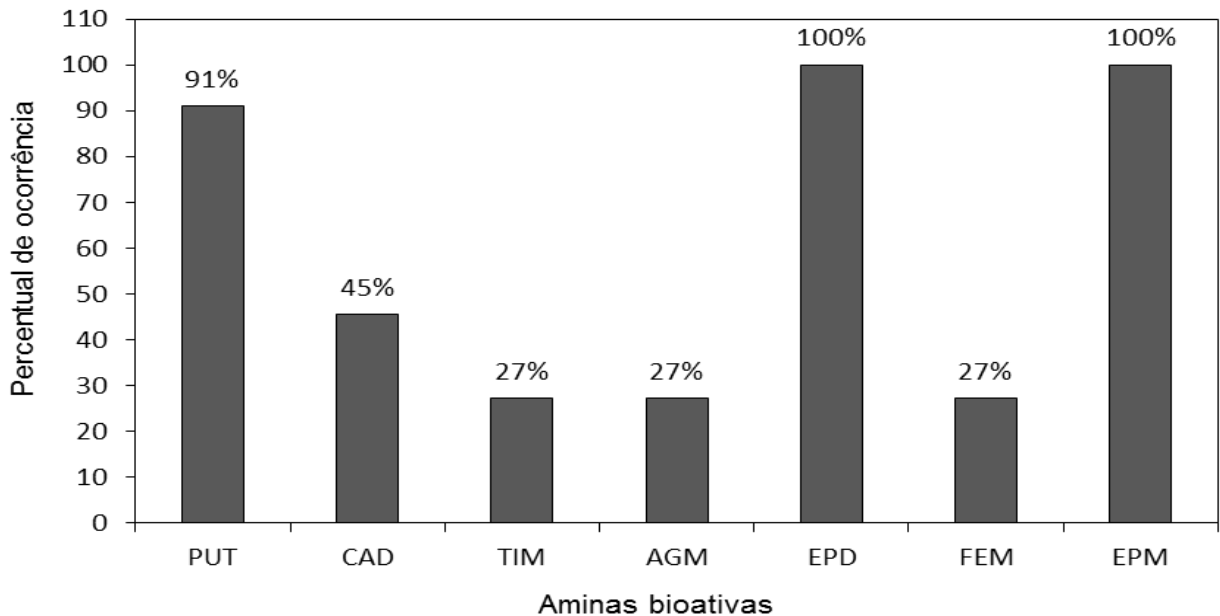
A espermidina e a espermina foram encontradas em todas as amostras analisadas. Os teores de espermidina variaram de 2,24 a 8,59 mg/kg e os teores de espermina variaram de 11,77 a 23,42 mg/kg.

De acordo com a Figura IV.1 a presença de espermidina e espermina foi detectada em 100% das amostras analisadas. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados por OLIVEIRA et al. (2012) que detectaram espermidina e espermina em todas as amostras de atuns e afins provenientes da costa do Rio Grande do Norte. A presença de espermidina e espermina era esperada, uma vez que estas poliaminas desempenham um papel essencial no crescimento e saúde dos organismos vivos. Também se esperava a presença de putrescina em baixos níveis, uma vez que esta é precursora obrigatória destas poliaminas (KRÍZEK, 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

Putrescina e cadaverina estavam presentes em 91% e 45% das amostras, respectivamente. No trabalho de Oliveira et al. (2012), a putrescina foi detectada em 100% das amostras analisadas. Estes autores também detectaram a presença de tiramina, agmatina e feniletilamina em 27% das amostras analisadas.

#### **IV.3.2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ATUNS E AFINS ANALISADOS POR MEIO DO ÍNDICE DE MIETZ & KARMAS**

Os teores de aminas bioativas foram utilizados para calcular os índices de Mietz e Karmas (1977) das amostras de pescado capturados por pequenas embarcações e destinadas ao mercado interno brasileiro. Os índices variaram de 0 (zero) a 0,27 (Figura IV.2).

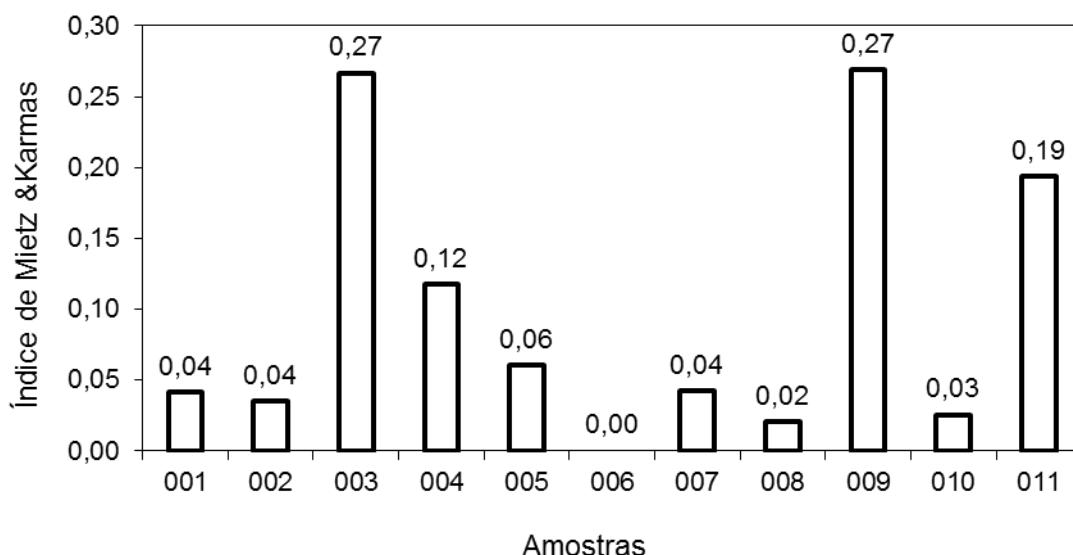


**Figura IV.1.** Percentual de ocorrência das aminas bioativas nas amostras de pescado provenientes do litoral sul do estado do Espírito Santo (PUT – putrescina, CAD – cadaverina, TIM – tiramina, AGM – agmatina, EPD – espermidina, FEM – feniletilamina, EPM – espermina).

Estudos de amostras coletadas e decompostas em condições controladas mostraram que o índice químico gerado com a equação proposta por Mietz e Karmas (1977) foi comparado à análise sensorial e, portanto, com as mudanças ocorridas pela decomposição da amostra. Em geral o uso de mais de uma amina biogênica é aconselhado para superar as possíveis variações na concentração de uma amina e tem sido considerado como o mais apropriado indicador de qualidade.

Os resultados obtidos qualificam o atum capturado por pequenas embarcações e destinado ao mercado interno brasileiro, como sendo da Classe 1, ou seja, atum de excelente qualidade. Estes dados estão de acordo com os resultados apresentados por Oliveira et al. (2012) que também encontraram baixos índices nos pescados capturados na costa do Rio Grande do Norte e classificaram o pescado como de excelente qualidade.

Com base nestes resultados, todas as amostras analisadas foram consideradas de excelente qualidade, mostrando níveis significativos de espermina e espermidina, e baixos níveis de histamina e outras aminas, levando portanto a baixos Índices de Mietz e Karmas.



**Figura IV.2.** Índices de Mietz & Karmas das amostras de atuns e afins provenientes da região sul do estado do Espírito Santo.

#### **IV.3.3. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS AOS REPRESENTANTES DAS EMPRESAS DE PESCA E TREINAMENTO DOS PESCADORES E MANIPULADORES DO PESCADO DO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Ainda que o pescado analisado tenha sido considerado de excelente qualidade quanto aos teores de amins e quanto ao Índice de Mietz & Karmas, observou-se a necessidade de orientar os pescadores e os representantes das empresas pesqueiras quanto à manipulação do pescado, tanto no momento da captura quanto no momento pós-captura como forma de prevenir e melhorar as boas práticas de manipulação do pescado. Portanto, foram realizadas uma palestra com a apresentação dos resultados das análises de amins das amostras coletadas (Anexo III), um treinamento de boas práticas na manipulação do pescado, e a distribuição de uma cartilha elaborada contendo informações sobre histamina e qualidade de atuns e afins (Anexo IV). Esta etapa do trabalho foi realizada em uma associação dos pescadores e contando com a participação dos trabalhadores de toda a região sul do Espírito Santo.

Os participantes apresentaram-se satisfeitos com os resultados dos teores de histamina, uma vez que esta é a grande preocupação com relação aos atuns e afins. Apesar disto, como esta é uma das principais regiões de desembarque deste tipo de pescado no Brasil, deve-se ter atenção e cuidados especiais, para manter e garantir a qualidade da produção e, possivelmente, aumentar seu potencial produtivo alcançando também o mercado de exportação. De acordo com o Código de Práticas para o Pescado

da FAO (2012), devem-se manter constantes programas de controle da higiene pessoal e dos estabelecimentos, dos veículos de transporte, além de capacitação dos manipuladores. Portanto, o trabalho de investigação das condições de captura e processamento pós captura deve ser mantido, bem como as intervenções na cadeia produtiva do pescado para garantir a qualidade deste quanto aos teores de amins bioativas.

#### **IV.4. CONCLUSÃO**

Os atuns e afins capturados por pequenas embarcações da região sul do estado do Espírito Santo e destinados ao mercado interno brasileiro apresentaram excelente qualidade quanto aos teores de histamina e aos Índices de Mietz & Karmas.

# **CAPÍTULO V**

## **COMPARAÇÃO DOS TEORES DE HISTAMINA EM ATUNS DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E POR KITS RÁPIDOS**

### **V.1. OBJETIVO**

Este trabalho teve como objetivo comparar o método por cromatografia líquida de alta eficiência com os kits para teste rápido por meio dos teores de histamina detectados em amostras de atum enlatado.

### **V.2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **V.2.1. MATERIAL**

##### **V.2.1.1. Amostras**

Para realização da comparação foram utilizadas 31 amostras de atum enlatado. Estas amostras foram analisadas pelo kit Veratox<sup>®</sup> e, posteriormente pela CLAE. Das 31 amostras, sete eram atum enlatado adquiridos no mercado de Belo Horizonte, 22 foram fornecidas por um entreposto de pesca da região Sul do Brasil e duas eram material de referência do FAPAS<sup>®</sup>.

##### **V.2.1.2. Reagentes e solventes**

Os padrões das aminas agmatina (AGM, sal sulfato), cadaverina (CAD, dicloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), tiramina (TIM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) e o *o*-ftalaldeído (OPA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Foram utilizados reagentes de grau analítico, com exceção dos solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes aquosos foram filtrados em membrana HAWP e os solventes orgânicos em membrana

HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura – tipo 1, obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os reagentes utilizados para a determinação da histamina pelo teste rápido foram: o Kit Veratox<sup>®</sup> composto por tampão fosfato e tampão de lavagem.

## **V.2.2. MÉTODOS**

### **V.2.2.1. Determinação da histamina por CLAE**

A determinação da histamina foi realizada conforme descrito no capítulo I.

### **V.2.2.2. Determinação da histamina por kit rápido**

O kit de histamina é um teste imunossorbente ligado a enzimas competitivas diretas, que por meio de padrões conhecidos permite quantificar a histamina em amostras analisadas em mg/kg. O teste foi realizado conforme proposto pelo fabricante do kit.

#### **V.2.2.2.1. Preparo do extrato concentrado da amostra**

Para o preparo do extrato foram pesados 10 g de amostra. Estas amostras foram trituradas e adicionadas à água ultrapura – tipo 1 na proporção de 1:9, ou seja, 10 g de amostra para 90 mL de água. Posteriormente foram homogeneizadas por 15 a 20 segundos, e colocadas em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. As etapas de homogeneização e repouso foram repetidas por mais duas vezes.

Após esta etapa a solução foi filtrada em papel qualitativo nº 1 com auxílio de uma seringa.

#### **V.2.2.2.2. Diluição do extrato concentrado da amostra**

Foram adicionados em um béquer devidamente identificado, 10 mL do tampão fosfato e 100 µL do extrato concentrado da amostra. Esta solução foi homogeneizada com movimentos circulares para a realização do teste.

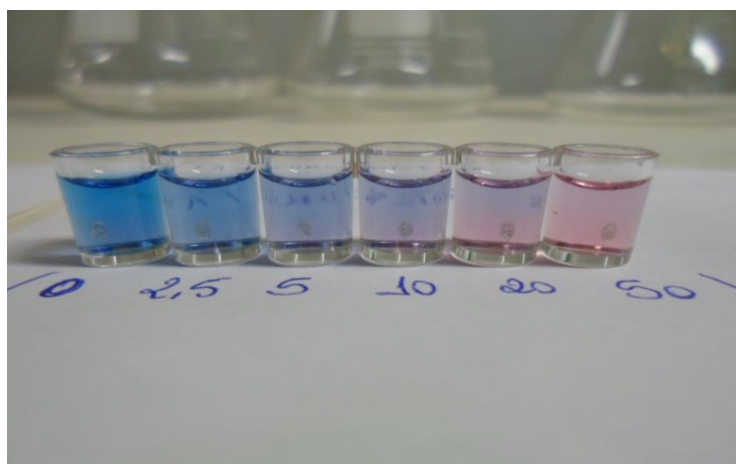
#### **V.2.2.2.3. Realização do teste**

Foram adicionados 100 µL do reagente conjugado nos tubos com marca vermelha. Após este procedimento foram acrescentados 100 µL dos controles e 100 µL da amostra nos mesmos tubos com marca vermelha. Transferiu-se 100 µL destes tubos para os



tubos transparentes e, posteriormente, colocou-se em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. O líquido dos tubos transparentes foi descartado e estes foram lavados com solução tampão de lavagem por quatro vezes. O excesso foi retirado da solução com papel absorvente, invertendo os tubos sobre o papel e deixando absorver o líquido. Foram transferidos 100  $\mu$ L da solução de substrato para os tubos transparentes e, posteriormente, colocados em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram transferidos 100  $\mu$ L da solução de parada para os tubos para realização da leitura.

Os resultados podem ser lidos visualmente ou por um leitor ELISA. Uma coloração azul mais intensa indica menor teor de histamina na amostra e uma coloração azul menos intensa indica aumento no teor de histamina na amostra/controle. A coloração rosa indica maior teor de histamina na amostra (Figura V.1). Os teores de histamina nos controles foram 0; 2,5; 5; 10; 20 e 50 mg/kg.



**Figura V.1.** Soluções controle utilizadas para comparação dos teores de histamina (concentrações: 0; 2,5; 5; 10; 20 e 50 mg/kg).

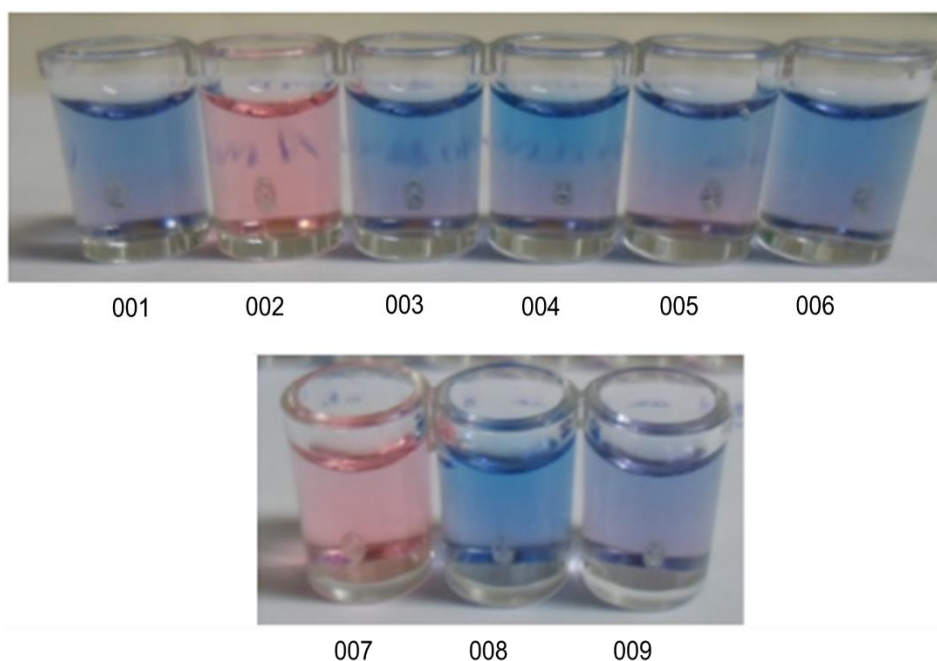
Os teores de histamina nas amostras foram calculados usando os cinco controles obtidos. A partir daí os valores de cada amostra foram comparados com os controles para estimar a concentração da histamina.

#### **V.2.2.3. Análise estatística**

O coeficiente de correlação de Pearson foi determinado pelo programa Microsoft Excel 2013.

### V.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de atum enlatado e os materiais de referência foram analisados por CLAE e pelo kit de histamina. Ao comparar os teores da solução controle do Kit Veratox<sup>®</sup> com os resultados das amostras de atum enlatado, pôde-se estimar os teores de histamina com base na coloração obtida por meio da adição do substrato no tubo contendo a amostra. Na Figura V.2 pode-se observar a diferença de coloração das sete amostras adquiridas no mercado e dois materiais de referência analisados e, conseqüentemente, a estimativa dos teores de histamina em cada amostra em comparação com os controles. Na Tabela V.1 estão apresentados os teores de histamina encontrados por meio do kit em comparação com os teores encontrados pela CLAE.



**Figura V.2.** Resultados de análises das amostras de atum enlatado utilizando o kit Veratox<sup>®</sup>.

O limite de quantificação do kit foi 2,5 mg/kg e o limite de quantificação do método utilizado na CLAE é 0,09 mg/kg. Pode-se observar por meio da Tabela V.1 que as amostras do mercado de Belo Horizonte com menores teores de histamina (001, 003, 004, 005, 006, 008 e 009) obtidas por meio do kit Veratox<sup>®</sup>, não apresentaram teores detectáveis quando analisadas pela cromatografia. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Köse et al. (2011) que observaram valores superestimados pelo kit Veratox<sup>®</sup> na faixa entre 2,5 a 20 mg/kg. Já as amostras 002 e 007 (material de

referência), que apresentaram o maior teor detectável pelo kit (50 mg/kg), apresentaram teores acima deste quando analisados pela CLAE.

Das 22 amostras provenientes do entreposto e analisadas pelo kit, 9% apresentaram teores até 2,5 mg/kg, 14% apresentaram teores de 5 e 10 mg/kg, 5% apresentaram teores até 20 mg/kg e 59% apresentaram teores até 50 mg/kg.

**Tabela V.1.** Teores de histamina em amostras de atum enlatado obtidos por meio do Kit e da cromatografia líquida de alta eficiência

Amostra	Teores de histamina (mg/kg)	
	Kit Veratox	CLAE
001	5	nd
002	50	311,1
003	2,5	nd
004	2,5	nd
005	5	nd
006	2,5	nd
007	50	126,7
008	2,5	nd
009	5	nd
010	2,5	2,47
011	2,5	10,01
012	5	15,37
013	5	4,84
014	5	0,92
015	10	18,98
016	10	105,11
017	10	11,14
018	20	5,05
019	50	3,80
020	50	0,67
021	50	nd
022	50	nd
023	50	nd
024	50	81,43
025	50	75,11
026	50	202,55
027	50	175,67
028	50	649,34
029	50	583,7
030	50	420,97
031	50	67,8

nd = não detectado (LQ = 0,09 mg/kg).

Das 13 amostras com teores até 50 mg/kg determinadas pelo kit, 8 (62%) apresentaram resultados acima deste valor quando analisados pela CLAE. Estes resultados variaram de 75,11 a 649,34 mg/kg. Pode-se observar que a maioria das amostras com teores acima 50 mg/kg foram subestimadas pelo kit. Por outro lado, algumas amostras que apresentaram 50 mg/kg pelo kit (38%), ao serem analisadas pela CLAE os resultados encontrados foram de não detectado a 3,80 mg/kg. Ou seja, o kit de histamina não apresentou resultados confiáveis ao ser comparado à CLAE. Este fato é preocupante, uma vez que teores elevados podem provocar a intoxicação.

O coeficiente de correlação de Pearson ( $\rho = 0,4037$ ) indicou fraca correlação positiva entre os dois métodos utilizados. Observou-se a importância de confirmar a análise de histamina por meio da técnica de CLAE, uma vez que o kit de histamina é limitado ao teor de 50 mg/kg e o limite permitido pela legislação europeia está entre 100 e 200 mg/kg. Portanto, o kit deve ser utilizado apenas como “screening”, principalmente ao serem detectados altos teores de histamina no pescado.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os teores de histamina em atum enlatado encontrados por meio do kit rápido foram confirmados pela cromatografia líquida de alta eficiência. Em concentrações acima de 20 mg/kg é necessária a confirmação do resultado pela CLAE, uma vez que o limite máximo de detecção do kit é de 50 mg/kg.

## CONCLUSÕES INTEGRADAS

O método de CLAE-par iônico foi validado para a quantificação de histamina em pescado, atendendo aos critérios estabelecidos pela Decisão 2002/657/CE. Para a garantia da qualidade das análises foi também realizada a estimativa da incerteza de medição e o estudo de estabilidade das soluções utilizadas na análise.

Os parâmetros de desempenho avaliados como linearidade, efeito matriz, precisão, especificidade, reprodutibilidade, robustez, LD, LQ, CC $\alpha$  e CC $\beta$  foram apropriados. O método mostrou-se adequado para o propósito e os dados gerados pelo laboratório foram confiáveis para a garantia da qualidade.

Como exigência para acreditação junto ao INMETRO o método foi submetido a dois testes de proficiência conduzidos pelo FAPAS<sup>®</sup> nos quais obteve excelente desempenho.

As técnicas de controle da qualidade previstas na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 foram desenvolvidas e implantadas no LBqA e foram eficazes para garantir a qualidade do ensaio de histamina em pescado.

O Laboratório de Bioquímica de Alimentos foi acreditado junto à CGCRE/INMETRO segundo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 para a análise de histamina em pescado.

Amostras de atuns e afins provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil foram analisadas e apresentaram excelente qualidade quanto aos teores de histamina e aos Índices de Mietz & Karmas

Os kits de histamina foram comparados à técnica de CLAE e foi observado que estes subestimam os teores de histamina, tornando importante a confirmação desta por meio da CLAE.

A aplicação do método por meio de análises de amostras de atum fresco, enlatado e de peixes de água doce foi fundamental para comprovar a eficácia do método em várias matrizes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. Official methods 977.13. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 19<sup>th</sup> edition. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). ABNT ISO/IEC GUIA 43-1: Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais. Parte 1: Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência. Rio de Janeiro, 1999.
- ALBANO, F.M.; RAYA-RODRIGUES, M.T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009. 136 p.
- ASHIE, I.N.A.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 36, n. 182, p. 87–121, 1996.
- BACH, B.; LE QUERE, S.; VUCHOT, P.; GRINBAUM, M.; BARNAVON, L. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 114–119, 2012.
- BADIA-ERIM F. Recent analytical approaches to analysis of biogenic amines in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 239–247, 2013.
- BERAQUET, N.J.; LINDO, M.M.K. Transformações bioquímicas “post mortem” em pescado. **Boletim ITAL**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 169–192, 1985.
- BERTRAND, A.; BARD, F.X.; JOSSE, E. Tuna food habits related to the micronekton distribution in French Polynesia. **Marine Biology**, v. 140, p. 1023–1037, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. Ministério da Agricultura Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 185 de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 de maio de 1997, Seção 1, p. 10282.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. 60p. 2011.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>> Acesso em 18/04/2013.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>> Acesso em 28/02/2015.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília, 210p, 2008.
- BRILL, R.W.; BIGELOW, K.A.; MUSYL, M.K.; FRITSCHES, K.A.; WARRANT, E.J. Bigeye tuna behavior and physiology and their relevance to stocks assessments and fishery biology. **ICCAT Collective Volume of Scientific Papers**, v. 57, n. 2, p. 141–161, 2005.
- BUSTO, O.; VALERO, Y.; GUASCH, J.; BORRUL, F. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. **Chromatography**, v. 38, n. 9/10, p. 571–578, 1994.
- CE (Conformite Europeene). Directiva de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas aplicables a la produccion y puesta en el Mercado de los productos pesqueros (91/439/EEC). **Diario Oficial de las Comunidades Europeas**, v. 286, p. 15–34, 1991.
- CHANG, S.-C.; KUNG, H.-F.; CHEN, H.-C.; LIN, C.-S.; TSAI, Y.-H. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. **Food Control**, v. 19, p. 16–21, 2008.
- CHEN, H.C.; HUANG, Y.R.; HSU, H.H.; LIN, C.S.; CHEN, W.C.; LIN, C.M.; TSAI, Y.H. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. **Food Control**, v. 21, p. 13–18, 2010.
- CHUI, Q.S.H.; BISPO, J.M.A.; IAMASHITA, C.O. O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 993–1003, 2004.
- CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; SEVERONI, A.; ABBALE, F. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 73–77, 2004.
- COHEN, G.; RUDNIK, D.D.; LALOUSH, M.; YAKIR, D.; KARPAS, Z. A novel method for determination of histamine in tuna fish by ion mobility spectrometry. **Food Analytical Methods**, doi 10.1007/s12161-015-0129-3, Fev. 2015.
- COLLETE, B.B. Scombridae, atunes, bacoretas, bonitos, caballas, estorninos, melva, etc: Guia FAO para identification de espécies para los fines de la pesca. v. 125, n. 2, 137p., Roma, 1995.
- CONCA, R.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; HAJOS, P. Ion chromatographic separation of polyamines: putrescine, spermidine and spermine. **Analytica Chimica Acta**, v. 439, p. 107–114, 2001.
- DALGAARD, P.; MADSEN, H.L.; SAMIEIAN, N.; EMBORG, J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified

- atmosphere packaging and previous frozen storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 80–95, 2006.
- DAMASCENO, A. **Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte – MG**. Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG. 2009. 48 p. (Dissertação, mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal).
- DAWOOD, A.A.; KARKALAS, R.N.; ROY, R.N.; WILLIAMS, C.S. The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored rainbow trout (*Salmo irideus*). **Food Chemistry**, v. 27, p. 33–45, 1988.
- DEMONCHEAUX, J.P.; MICHEL, R.; MAZENOT, C.; DUFLOS, G.; IACINI, C.; DELAVAL, F. A large outbreak of scombroid fish poisoning associated with eating yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) at a military mass catering in Dakar, Senegal. **Epidemiology Infection**, v. 140, p. 1008-1012, 2012.
- DONHAUSER, S.; WAGNER, D.; GEIGER, E. Biogenic amines: significance, occurrence and assessment. **Brauwelt International**, v. 11, p. 100–107, 1993.
- DUFLOS, G.; DERVIN, C.; MALLE, P.; BOUQUELET, S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 5, p. 1097–1101, 1999.
- EC (European Commission). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L 221, p. 8–36, 2002.
- EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. **European Food Safety Authority Journal**, v. 9, 93 p. doi:10.2903/j.efsa.2011.2393. Disponível em: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>. 2011.
- EFSA. Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level. **European Food Safety Authority Journal**, v. 13, n. 7, doi:10.2903/j.efsa.2015.4162. Disponível em: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>. 2015.
- EU. European Union. Report EUR 26605 EN. Equivalence testing of histamine methods - Final Report. Administrative Arrangement N° SANCO/2011/G4/ JRC32515/ SI2.611754 between DG Health and Consumers (DG SANCO) and Joint Research Centre (JRC). Report EUR 26605 EN, by STROKA, J.; BOUTEN, K.; MISCHKE, C.; BREIDBACH, A.;



- ULBERTH, F. **Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements**, 2014.
- EURACHEM. CITAC guia: Determinando a Incerteza na Medição Analítica. 2 ed. Primeira Edição Brasileira. 2002.
- EVANGELISTA, W.P. **Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2010. 70 p. (Dissertação, mestrado em Ciência de Alimentos).
- FAO. Code of practice for fish and fishery products. Rome, 2<sup>nd</sup> ed. 243p, 2012.
- FAO. Disponível em <<http://www.fao.org/home/es/>> Acesso em 22/10/2013.
- FAO. Disponível em <<http://www.fao.org/news/story/pt/item/214518/icode/>> Acesso em 02/03/2015.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. **Meeting Report**. 138 p. 2013.
- FAPAS® - Food Analysis Performance Assessment Scheme – Proficiency Test Report 27101 – Histamine in Canned Fish, 2012.
- FDA (Food and Drug Administration, USA). **Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**. 2<sup>nd</sup> ed. 292 p. 2012.
- FDA (Food and Drug Administration, USA). Decomposition and histamine – raw frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related species; availability of revised compliance policy guide. **Federal Register**, v. 149, p. 39754–39756, 1995.
- FERNANDES, C.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In: NOLLET, L.M.L.; TOLDRA, F. **Handbook of Food Analysis**. 3<sup>rd</sup> ed. v. 2, p. 301-328, 2015.
- FIDÉLIS, G.C. **Guia prático: controle estatístico de processo aplicado nas calibrações, medições e ensaios**. Florianópolis, CECT, 2013.
- FIGUEIREDO, M.B. **Biologia reprodutiva da Albacora Bandolim *Thunnus obesus* (Lowe, 1839) no Oceano Atlântico tropical**, Recife: Departamento de Pesca e Aquicultura, UFRPE. 2007. 62 p. (Dissertação, Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura).
- FONTENEAU, A.; ARIZ, J.; DELGADO, A.; PALLARES, P.; PIANET, R. A comparison of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) stocks and fisheries in the Atlantic, Indian and Pacific ocean. **ICCAT Collective Volume of Scientific Papers**, v. 57, n. 2, p. 41–66, 2005.
- GARCEZ, D.S.; SÁNCHEZ-BOTERO, J.I. Comunidades de pescadores artesanais no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. v. 27, n. 1, p. 17-29, Rio Grande, **Atlântica**, FURG, 2005.

- GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A. Metodologia para a determinação de aminas biogênicas em bebidas. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 9, 1995, João Pessoa. **Livro de Resumos**. João Pessoa: UFP, 1995, p. 137.
- GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A.; CRAVEN, C.; HILDERBRAND Jr., K.S. Histamine and other biogenic amines in albacore tuna. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 8, n. 4, p. 55–69, 1999.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H Hui; LL Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v. 4, p. 1–38, 2005.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42–49, 1994.
- HARDMAN W.E. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. **The Journal of Nutrition**. v. 134, p. 3427S–3430S, 2004.
- HUI, J.Y.; TAYLOR, S.L. Decomposition in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 66, p. 853–857, 1983.
- HUNGERFORD, J.; WU, W.H. Comparison study of three rapid test kits for histamine in fish: BioScientific MaxSignal enzymatic assay, Neogen Veratox ELISA, and the Neogen Reveal Histamine Screening test. **Food Control**, v. 25, p. 448–457, 2012.
- ICCAT. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas. Disponível em <<https://www.iccat.int/es/>>. Acesso em 04/03/2015.
- INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação para a acreditação de laboratórios de calibração e de ensaio: documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro, 2010. 20p. DOQ-CGCRE-001. Revisão 04.
- INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2010. 20p. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03.
- INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. NIT-DICLA-026 – Revisão 08. Requisitos sobre a participação dos laboratórios de ensaio e de calibração em atividades de ensaio de proficiência. 2011.
- INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em 26/08/2013.
- ISAAC, V.N.; HAIMOVICI, M.; MARTINS, S.A.; ANDRIGUETTO, J.M. **A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais**. 188 p. Belém: Editora Universitária UFPA. 2006.

- ISO/IEC 17025. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. **International Organization for Standardization**. ISO, Geneva. Switzerland. 2005.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post column derivatization. **Journal of AOAC International**, v. 76, p. 1027–1032, 1993.
- JARDIM, W.F., SODRÉ, F.F. Desempenho analítico de laboratórios prestadores de serviço na determinação de metais em água. **Química Nova**. v. 32, n. 4, p. 1083–1088, 2009.
- KANKI, M.; YODA, T.; TSUKAMOTO, T.; BABA, E. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 73, n. 5, p. 1467-1473, 2007.
- KIRSCHABAUM, J.; LUCKAS, B.; BEINERT, W.D. HPLC analysis of biogenic amines and amino acids in food after automatic pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **American Laboratory**, v. 26, p. 280–288, 1994.
- KRÍZEK, M. Biogenic amines in fish. In G. Dandriofosse. **Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates**. Kerala, India: Transworld Research Network, p. 311–325, 2009.
- KÖSE, S.; KAKLIKKAYA, N.; KORAL, S.; TUFAN, B.; BURUK, C. K.; AYDIN, F. Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1490–1497, 2011.
- LAPA-GUIMARÃES, J. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor de pescado**. Campinas: UNICAMP. 2005. 125 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).
- LAVON, O.; LURIE, Y.; BENTUR, V. Scombroid fish poisoning in Israel, 2005-2007. **Israel Medical Association Journal**, v. 10, p. 789–792, 2008.
- LÁZARO, C.A.; CONTE-JÚNIOR, C.A.; CANTO, A.C.; MONTEIRO, M.L.G.; COSTA-LIMA, B.; GOMES DA CRUZ, A.; MÁRSICO, E.T.; FRANCO, R.M. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, p. 15–21, 2015.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 1-37, 2000.

- LIMA, A.S. **Metodologia para a determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência – par iônico**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 1999. 77 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 33, p. 70–79, 1999.
- MAGA, J.A. Amines in foods. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 10, p. 373–403, 1978.
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.H.; AHO, M.A.; HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.125–129, 1993.
- MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 1, p. 43–49, 1996.
- MIETZ, J.L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 155–158, 1977.
- MIETZ, L.J.; KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. **Journal of AOAC International**, v. 61, n. 1, p. 139–145, 1978.
- MOON, J.S.; KIM, S.Y.; CHO, K.J.; YANG, S.J.; YOON, G.M.; EOM, H.J.; HAN, N.S. Isolation and characterization of histamine-producing bacteria from fermented fish products. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 881–885, 2013.
- MORET, S.; CONTE, L.S. High performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods: an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 363–369, 1996.
- NOGUEIRA, R.; SOARES, M.A. Accreditation and recognition programs in Brazil: current situation and perspectives. 2013. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 18, p. 217–223.
- OHTA, H.; YOZA, K.I.; TAKEDA, Y.; NOGATA, Y. Influence of storage temperature on the polyamine level and ethylene production in broccoli (*Brassica oleraceae*, Italica group). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 831–831, 1993.
- OLIVEIRA, G.M. Pesca e aquicultura no Brasil, 1991-2000: produção e balança comercial/Geovânio Milton de Oliveira. Brasília: **Ibama**, 2005. 260 p.
- OLIVEIRA, I.M.; HAZIN, F.; OLIVEIRA, V.S.; GEBER, F.; OLIVEIRA, G.J.; BARRADAS, R. Distribuição e abundância relativa de peixes capturados com espinhel de fundo na costa de Pernambuco, Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 33, n. 2, p. 183–193, 2007.

- OLIVEIRA, R.B.A. **Qualidade de atuns tipo exportação capturados pelo espinhel pelágico no litoral de Pernambuco e Rio Grande do Norte, Brasil**. Recife, Departamento de Ciências Domésticas, UFRPE. 2009. 107 p. (Dissertação, mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- OLIVEIRA, R.B.A.; EVANGELISTA, W.P.; SENA, M.J.; GLORIA, M.B.A. Tuna fishing, capture and post-capture practices in the northeast of Brazil and their effects on histamine and other bioactive amines. **Food Control**, v. 25, p. 64–68, 2012.
- ÖNAL A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1475–1486, 2007.
- ÖNAL, A.; TEKKELE, S.E.K.; ÖNAL, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 138, p. 505–509, 2013.
- PASQUOTTO, V.F. **Pesca artesanal no Rio Grande do Sul: os pescadores de São Lourenço do Sul e suas estratégias de reprodução social**. Porto Alegre: Faculdade de Ciências Econômicas, UFRGS. 2005. 164 p. (Dissertação, mestrado em Desenvolvimento Rural).
- PEREIRA, A.A. **Comportamento da albacora lage *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788) no Arquipélago de São Pedro e São Paulo**. Recife, Centro de Tecnologia e Geociências, UFPE. 2007. 39 p. (Dissertação, mestrado em Oceanografia).
- PHILIBERT, A.; FILLION, M.; DEGUIRE, J.R.; WEILER, H.A.; PASSOS, C.J.S.; LEMIRE, M.; MERGLER, D. Plasma Phospholipid Omega-3 Fatty Acids and Freshwater Fish Consumption in the Brazilian Amazon. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 137-149, 2013.
- RATH, S.; PASCHOAL, J.A.R.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, A.L.M.S.; OLIVEIRA, G.M.; FERREIRA, V.M.; PEREIRA, M.M.D.; SILVA, P.P.O. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 109–122, 2009.
- RODRIGUES, N.R.; SOUZA, A.P.F.; WATANABE, M. Implantação e implementação das normas das Boas Práticas Laboratoriais (BPL) no Laboratório de Análise de Resíduos

- da Universidade Estadual de Campinas. **Química Nova.**, v. 35, n. 6, p. 1276–1280, 2012.
- SHALABY, A.R. Multidetecção, semiquantitativa method for determining biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 52, p. 367–372, 1995.
- SILVA, T.M. **Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2008. 103 p. (Dissertação, mestrado em Ciência de Alimentos).
- SIMON-SARKADI, L. Methods for detection and quantification of biogenic amines. In: **Biogenic amines in foods and beverages symposium**. Oregon State University, Corvallis Oregon, EUA, 1994.
- SMITH, T.A. Amines in food. **Food Chemistry**, v. 6, p. 169–200, 1980-1981.
- SOARES, K.M.P. GONÇALVES, A.A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1–10, 2012
- SOARES, V.F.M.; GLÓRIA, M.B.A. Histamine levels in canned fish available in the retail market of Belo Horizonte, MG, Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 7, p. 102–107, 1994.
- SOUZA, F.C.A.; GARCIA, N.P.; SALES, R.S.A.; AGUIAR, J.P.L.; DUNCAN, W.L.P.; CARVALHO, R.P. Effect of fatty Amazon fish consumption on lipid metabolism. **Revista de Nutrição**, v. 27, n. 1, p. 97-105, 2014.
- TAKEMOTO, E.; EVANGELISTA, W.P.; MINAZZI-RODRIGUES, R.S.; MARSIGLIA, D.A.P.; OLIVEIRA, C.A.F.; GLÓRIA, M.B.A. Histamine intoxication outbreak associated to canned tuna intake in the state of São Paulo, Brazil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 11, n. 126, p. 29-32, 2014.
- TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. Genebra. **World Health Organization**, p. 1–45, 1985.
- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Critical Review Toxicology**, v. 17, p. 91–128, 1986.
- TORTORELLA, V.; MASCIARI, P.; PEZZI, M.; MOLA, A.; TIBURZI, S.P.; ZINZI, M.C. Histamine poisoning from ingestion of fish or scombroid syndrome. **Case Reports in Emergency Medicine**, id 482531, 2014 (doi: 10.1155/2014/482531). 2014.
- TSAI, Y.-H.; HSIEH, H.-S.; CHEN, H.-C.; CHENG, S.-H.; CHAI, T.-J.; HWANG, D.-F. Histamine level and species identification of billfish meats implicated in two food-borne poisonings. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1366–1371, 2007.
- VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 1006–1012, 1997.

- VECIANA-NOGUÉS, M.C.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-K compounds, volatile amines and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2036–2041, 1997.
- VICENTE, I.S.T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C.E. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 393–398, 2014.
- VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 370 p. 2004.
- VISCIANO, P.; SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; SUZZI, G. Biogenic amines in raw and processed seafood. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–10, 2012.
- WILSON, B.J.; MUSTO, R.J.; GHALI, W.A. A case of histamine fish poisoning in a young atopic woman. **Journal of General Internal Medicine**, v. 27, n. 7, p. 878-881, 2012.
- WINDHOLZ, M. (Ed.) **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 10<sup>a</sup> ed. Rahway: Merck, 1996. 2066 p.
- ZEE, J.A.; SIMARD, R.E.; L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 12, p. 1044–1049, 1983.