

TARLIANE MARIA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2008**

TARLIANE MARIA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO**

Dissertação 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 Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Abreu Glória

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2008**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todos os caminhos destinados.

Aos meus pais Tarcísio e Maria José, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos, não medindo esforços para me proporcionarem o melhor.

À minha irmã, sobrinhas e familiares, pelo carinho e compreensão.

Ao Tiago, pelo amor, companheirismo e apoio.

À Professora Dr^a Maria Beatriz Abreu Glória, pela amizade, apoio e orientação em todas as etapas de realização deste trabalho.

Às amigas Priscila e Adriana, pela amizade e dedicação contínua na finalização deste trabalho.

Aos amigos do LBqA, Juliana, Aline, Cecília, Bruno Dala Paula, Fernanda, Tássia, Cyntia, Warley, Bruno Botelho, Silvia, Renata, Kátia, Letícia, Vivian, Rita, Guilherme, Thaíza, Fabiane, Tânia, Ana Carolina, Flávia Beatriz, Giuliana, Cristina, Flávia Vitorino, Lúcia, Raquel e Lilian, pelos momentos agradáveis, amizade, sugestões.

Ao amigo Roney pela amizade e dedicação no planejamento dos experimentos e análise dos dados.

Aos professores Luis Antonio Minim pelo apoio, da iniciação científica ao mestrado, principalmente no planejamento experimental e análise dos resultados.

Aos professores David Lee Nelson e Edgar Alencar Teixeira pelas sugestões importantes na finalização da dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA	15
1 PEIXE	15
2 AMINAS BIOATIVAS	19
2.1 Definição e classificação	19
2.2 Formação	22
2.3 Funções.....	23
2.4 Aspectos toxicológicos	25
3 AMINAS BIOATIVAS EM PEIXE	27
3.1 Intoxicação por escombrídeos.....	27
3.2 Aminas biogênicas como critério de qualidade	31
4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS À ANÁLISE DE AMINAS BIOATIVAS EM PESCADO	33
4.1 Extração	33
4.2 Detecção	36
4.3 Separação	37
5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	38
5.1 Seletividade	40
5.2 Limite de detecção	41
5.3 Limite de quantificação.....	42
5.4 Linearidade e faixa de aplicação.....	42
5.5 Exatidão	43
5.6 Precisão	43
5.7 Sensibilidade	44
MATERIAL E MÉTODOS	45

1 MATERIAL	45
1.1 Amostras	45
1.2 Reagentes e solventes	45
1.3 Soluções	46
1.3.1 Solução padrão de dez aminas.....	46
1.3.2 Soluções padrão de histamina.....	46
1.3.3 Solução padrão de 1,3-diaminopropano	47
1.3.4 Solução de L-prolina	47
1.3.5 Solução de cloreto de dansila.....	47
1.3.6 Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio	47
1.3.7 Solução derivante	47
1.4 Vidraria	48
2 MÉTODOS.....	48
2.1 Otimização do processo de extração de histamina em pescado.....	48
2.2 Comparação de métodos para determinação de histamina em pescado	51
2.2.1 CLAE com derivação pré-coluna e detecção no UV	52
2.2.2 CLAE com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência	55
2.2.3 Viabilidade da utilização de 1,3-diaminopropano como padrão interno na análise de histamina.....	57
2.3 Validação de método para determinação de histamina em pescado	58
2.3.1 Condições cromatográficas	58
2.3.2 Procedimentos de validação	58
2.4 Determinação de histamina em amostras de pescado do mercado consumidor de Belo Horizonte.....	59
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO ...	61
2 VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE 1,3-DIAMINOPROPANO COMO PADRÃO INTERNO NA ANÁLISE DE HISTAMINA	66
3 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO	73

4	VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO	77
4.1	Condições cromatográficas	77
4.2	Parâmetros de validação	78
4.2.1	Linearidade	78
4.2.2	Efeitos de matriz	81
4.2.3	Seletividade	83
4.2.4	Limites de detecção e de quantificação	83
4.2.5	Exatidão e precisão	84
5	DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM AMOSTRAS DE PESCADO DO MERCADO CONSUMIDOR DE BELO HORIZONTE	86
	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	93

LISTA DE TABELAS

1	Surtos de intoxicação histamínica após consumo de peixes	30
2	Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em pescado	35
3	Planejamento experimental para otimização da extração de histamina em pescado	49
4	Gradiente de eluição para as fases móveis água e acetonitrila empregado na determinação de histamina	54
5	Gradiente de eluição para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação de histamina	56
6	Matriz do planejamento experimental realizado para as variáveis independentes com a resposta em percentual de recuperação	61
7	Análise de variância para a recuperação de histamina em pescado	62
8	Efeito das variáveis de agitação e centrifugação na recuperação de histamina	63
9	Condição ótima para extração de histamina em pescado	66
10	Limites de detecção e quantificação do equipamento e do método de determinação de histamina	84
11	Recuperações médias de histamina e coeficientes de variação obtidos para avaliação da exatidão e precisão	85
12	Teores de histamina em amostras de atum enlatado adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	87
13	Teores de histamina em amostras de atum fresco adquiridos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	90

LISTA DE FIGURAS

1	Etapas das alterações bioquímicas <i>post mortem</i> em pescado.....	16
2	Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.....	20
3	Estrutura química de algumas aminas.....	21
4	Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido.....	22
5	Metabolismo da histamina em humanos.....	26
6	Fatores desencadeadores da intoxicação histamínica.....	29
7	Locais de ocorrência dos surtos de intoxicação histamínica, nos Estados Unidos, de 1998-2002.....	31
8	Reação do OPA e mercaptoetanol com aminas primárias.....	36
9	Avaliação de temperatura da amostra de atum no momento da recepção.....	45
10	Fluxograma das etapas envolvidas na otimização da extração de histamina.....	49
11	Etapas de quarteamento (A), trituração (B) e adição de TCA (C) envolvidas na extração de histamina em pescado.....	50
12	Fluxograma dos processos de extração e derivação da amostra com cloreto de dansila e detecção no UV para análise de histamina por CLAE.....	53
13	Sistema CLAE com detector de arranjo de diodos utilizado na análise de histamina após derivação pré-coluna.....	54
14	Fluxograma do processo de extração de histamina em pescado segundo a otimização realizada.....	55
15	Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise de histamina.....	57
16	Percentual da soma de quadrados das variáveis independentes e suas interações.....	62
17	Estimativa do efeito das variáveis no processo de extração de histamina em pescado.....	64
18	Interação entre tempo e temperatura de centrifugação para avaliação da recuperação.....	64
19	Superfície de resposta para otimização da recuperação de histamina em função do tempo e temperatura e centrifugação.....	65

20	Cromatogramas da solução contendo padrão de aminas e 1,3-diaminopropano..	67
21	Cromatogramas da solução contendo padrão de aminas e 1,3-diaminopropano e verificação da co-eluição com a feniletilamina.	68
22	Gradientes de eluição propostos para a separação do padrão interno.	69
23	Cromatogramas das análises dos padrões das 10 aminas (A), com adição de 1,3-diaminopropano (B), do padrão interno isoladamente(C) e adicionado de putrescina (D).	70
24	Gradientes de eluição propostos para separação do 1,3-diaminopropano.	72
25	Curvas analíticas do padrão de histamina no solvente pelos métodos de DUFLOS et al. (1999) e adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), representadas pelas linhas (- - - -) e (————), respectivamente.	73
26	Linhas de regressão obtidas para a histamina no solvente (————) e adicionada à matriz (- - - -), pelo método adaptado de VALE & GLÓRIA (1997) – A, e segundo DUFLOS et al. (1999) – B.	74
27	Cromatogramas obtidos nas análises de histamina nos solventes (A, C) e adicionada à matriz (B, D) pelo método adaptado de VALE & GLÓRIA (1997) – A e B, e segundo DUFLOS et al. (1999) – C e D.	75
28	Percentuais médios de recuperação de histamina obtidos pelos métodos de DUFLOS et al. (1999) e adaptado de VALE & GLÓRIA (1997)..	76
29	Gradiente de eluição empregado na determinação de histamina em pescado.	77
30	Cromatogramas da histamina (————) e das dez aminas (————) adicionadas à matriz, na concentração final de 10 µg/mL.	78
31	Curvas analíticas da histamina no solvente obtidas em dias diferentes, na faixa de 0,2 a 60 µg/mL.	79
32	Resíduos da regressão para as três curvas analíticas da histamina no solvente.	80
33	Curva analítica da histamina adicionada à matriz, na faixa de 0,2 a 60 µg/mL.	81
34	Resíduos da regressão da curva analítica da histamina adicionada à matriz.	82
35	Curvas analíticas da histamina no solvente (————) e adicionada à	

	matriz (- - -) na faixa de 0,2 a 60 µg/mL.....	82
36	Cromatogramas da histamina no solvente (——) e adicionada à matriz (——), na concentração de 30 µg/mL, e da amostra controle (——).	83
37	Cromatogramas da histamina adicionada à matriz, na concentração média final de 0,83 mg/kg.	84
38	Amostras de atum enlatado adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, codificadas por tipo de processamento.	86
39	Percentual de amostras de diferentes tipos de processamento adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, com teores de histamina quantificáveis.	88
40	Teores de histamina em amostras de atum enlatado de diferentes marcas e lotes adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG.....	89
41	Amostras de atum fresco adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, codificadas por fontes.	89
42	Teores médios de histamina em amostras de atum fresco adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG..	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGM: agmatina
ATP: adenosina trifosfato
CAD: cadaverina
CDC: Center for Disease Control
CE: Comunidade Européia
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
DAO: diaminoxidase
DIAM: 1,3-diaminopropano
DnsCl: cloreto de dansila
EPD: espermidina
EPM: espermina
FAO: Food and Agriculture Organization
FDA: Food and Drug Administration
FEM: feniletilamina
FMOC: 9-fluorenilmetil cloroformato
HIM: histamina
HMT: histamina N-metil transferase
IAL: Instituto Adolfo Lutz
LANARA: Laboratório Nacional de Referência Animal
LBqA: Laboratório de Bioquímica de Alimentos
LD: limite de detecção
MAO: monoaminoxidase
ODC: ornitina descarboxilase
OPA: *orto*-ftalaldeído
PAO: poliaminoxidase
PUT: putrescina
SAM: S-adenosilmetionina
SNC: sistema nervoso central
SRT: serotonina
TCA: ácido tricloroacético
TIM: tiramina
TRM: triptamina
UV: ultravioleta

RESUMO

A exportação de pescado fresco para a Europa tem sido limitada pela exigência de análises laboratoriais de histamina. As análises devem ser realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método sugerido, entretanto, faz uso de ácido perclórico, extrator com potencial explosivo, depende de reação de derivação da histamina, a qual exige manipulação morosa e excessiva da amostra, aumentando a possibilidade de perdas em recuperação. Além disso, pelo fato da análise ser demorada, corre-se o risco de prejudicar a exportação do material fresco, cuja vida de prateleira é limitada. Visando atender estas necessidades, teve-se com este trabalho o objetivo de otimizar e validar um método eficiente e rápido por CLAE para determinação de histamina em pescado. A extração de histamina foi otimizada, definindo-se como 70 s o tempo de agitação; 11250 x g, 3 min e 0 °C a velocidade, o tempo e a temperatura de centrifugação, respectivamente; e o tempo de extração foi reduzido de 90 para 15 minutos, em relação à extração originalmente utilizada. O padrão interno 1,3-diaminopropano recomendado por DUFLOS et al. (1999), co-eluiu com a feniletilamina e putrescina, sendo sua utilização inviável. Comparando-se os métodos de DUFLOS et al. (1999) e adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), observou-se que o último é o mais apropriado à análise de histamina em pescado, sendo, portanto, escolhido para otimização e validação. O método validado para determinação de histamina em pescado mostrou-se linear na faixa de trabalho de 0,2 a 60 µg/mL, sem efeito da matriz, seletivo, exato e preciso. Em virtude dos limites estabelecidos pela União Européia se enquadrarem na faixa de 100 a 200 mg/kg, o método é viável para análise de histamina em pescado, apresentando redução do tempo total de análise em relação aos dois métodos comparados. A partir do método otimizado e validado foram avaliados os teores de histamina em amostras de atum fresco e enlatado comercializadas em Belo Horizonte, verificando-se que estes estão de acordo com os limites regulamentados pelo Mercosul, FDA e União Européia.

PALAVRAS-CHAVE: peixe, qualidade, histamina, método analítico, CLAE.

ABSTRACT

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF HISTAMINE IN FISH. The exportation of fresh fish to Europe has been limited by the requirement of certificates with the levels of histamine. The method recommended for the analysis is high performance liquid chromatography (HPLC). Histamine is extracted with perchloric acid and derivatized prior to analysis. However, the extractor is explosive and the derivatization reaction requires excessive handling which can affect negatively the efficiency of the method. Furthermore, since the analysis takes a long time, the exportation of fresh fish is limited. In order to solve such problems, the objective of this work was to optimize and validate an efficient and rapid HPLC method for the determination of histamine in fish. The extraction was optimized and the defined parameters were sample homogenization for 70 s; 11250 x *g*, 3 min and 0 °C for the speed, time and temperature of centrifugation, respectively. Under these conditions, the extraction time was reduced from 90 to 15 minutes, compared to the recommended method. The internal standard (1,3-diaminopropane) recommended by DUFLOS et al. (1999), co-eluted with phenylethylamine and putrescine, and, therefore, could not be used. Comparing the analytical procedures used by DUFLOS et al. (1999) and adapted from VALE & GLÓRIA (1997), the last one was the most appropriate for the analysis of histamine in fish, and it was chosen for further studies. The method was optimized and validated: it was linear in the range of 0.2 to 60 µg/mL; there was no effect of the matrix; and the method was selective, exact and precise. The method was considered viable for the analysis of histamine in fish as recommended by the European Union which requires limits of 100 to 200 mg/kg. Furthermore, it could be performed in a shorter period of time compared to the original method. Using this method, the levels of histamine were determined in fresh and canned tuna samples commercialized in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Every sample analyzed was in compliance with the Mercosur, FDA and European Union standards.

KEYWORDS: fish, quality, histamine, analytical method, HPLC.

INTRODUÇÃO

A aquicultura vem se impondo mundialmente como atividade pecuária (FAO, 2008). O Brasil apresenta um grande potencial natural para desenvolvimento da aquicultura, além de mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado (MERCADO DA PESCA, 2008).

A aquicultura brasileira tem também se destacado nas exportações, com aumento para peixes frescos principalmente na forma de filés, enquanto que os pescados congelados, salgados e enlatados apresentaram pequenas reduções (FAO, 2008). Além disso, verificou-se uma valorização do preço de pescado exportado pelo Brasil, gerado diretamente pelas crescentes exportações de preparações e conservas, filé de peixe, lagosta, polvo e de atuns e afins (SEAP, 2008).

O peixe constitui uma fonte abundante de proteína de alta qualidade, vitaminas A, D, E e do complexo B e certos minerais, dentre eles cálcio, fósforo e ferro. Em sua fração lipídica os peixes contêm ainda ácidos graxos ômega-3, protetores contra doenças do coração e inflamatórias (BAYLISS, 1996; BELINSKY et al., 1996; MÉNDEZ et al., 1996). Entretanto, o peixe é altamente susceptível à deterioração (SASSAKI & RIBEIRO, 1991; ASHIE et al., 1996), e assim, à formação de histamina (TAYLOR, 1990; RODRIGUEZ-JÉREZ et al., 1994).

Teores elevados de histamina e de outras aminas biogênicas em alimentos podem causar intoxicação alimentar (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994). Por este motivo, vários índices de qualidade química já foram propostos para alimentos baseados nos teores de aminas bioativas, dentre eles pescados (MIETZ & KARMAS, 1977; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997), carne de frango e produtos derivados (SILVA & GLÓRIA, 2002).

A qualidade dos produtos exportados pelo Brasil para a Europa tem sido o fator determinante no estabelecimento de barreiras à exportação do pescado brasileiro. O regulamento adotado pela União Européia exige certificados de testes laboratoriais para constatar aos exportadores de peixe fresco os níveis de metais pesados, antibióticos e histamina, substâncias estas relacionadas à segurança do consumidor (SEAP, 2008).

Para a análise de histamina, a União Européia estabelece o limite de 100 a 200 mg/kg (CE, 1991), uma amostragem de nove peixes por lote, e exige o uso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os dois métodos cromatográficos recomendados (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 possuem várias etapas de manipulação da amostra, gerando perdas. Devido às exigências de análises de histamina pela União Européia aos exportadores de pescado, estas necessitam ser realizadas num período curto, já que os peixes não podem ser liberados para exportação até a obtenção dos resultados de análise.

No Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia, UFMG, está validado e padronizado um método analítico para a determinação de histamina e outras nove aminas bioativas em diversos alimentos (VALE & GLÓRIA, 1997; SANTOS et al., 2003; CACCIOPPOLI et al., 2006). Neste método, faz-se uma extração com ácido e análise direta da amostra por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorimétrica. Este método apresenta a vantagem de ter o mínimo de manipulação da amostra, ser seletivo, e sensível. Entretanto, o tempo de corrida é longo, pois objetiva a análise e quantificação de outras nove aminas além da histamina.

De forma a se obter um método mais rápido e seletivo para a determinação de histamina em amostras de atuns para exportação à União Européia, este trabalho teve como objetivo geral otimizar e validar um método eficiente, seletivo e rápido por CLAE para determinação de histamina em pescado.

Os objetivos específicos foram: (i) otimizar o processo de extração de histamina em pescado; (ii) comparar dois métodos para determinação de histamina; (iii) validar o melhor método e (iv) determinar os teores de histamina em amostras de pescado do mercado consumidor de Belo Horizonte, MG.

REVISÃO DA LITERATURA

1 PEIXE

Peixe fresco é aquele que não sofreu qualquer processo de conservação, exceto resfriamento, e que mantém suas características sensoriais essenciais inalteradas (SÃO PAULO, 1978). O peixe fresco deve se apresentar íntegro, com odor e sabor próprios, e aspecto geral sem alterações, mutilações, deformações e traumas, livre de parasitas, doenças microbianas e lesões (NUNES, 1994). Deve, ainda, apresentar olhos vivos e destacados; escamas brilhantes e bem aderentes à pele; curvatura natural do corpo; nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados; carne firme, de consistência elástica e cor própria da espécie; vísceras íntegras e perfeitamente diferenciadas; e a musculatura da parede intestinal não deve apresentar sinais de autólise (LANARA, 1981; IAL, 1985).

Entretanto, entre os produtos de origem animal, o peixe é um dos mais susceptíveis à deterioração (SASSAKI & RIBEIRO, 1991; ASHIE et al., 1996), e, assim, à formação de aminas biogênicas, como a histamina (TAYLOR, 1990; RODRIGUEZ-JÉREZ et al., 1994), pois a própria composição físico-química do pescado, o torna um dos alimentos de maior perecibilidade. Isso se deve ao pH próximo à neutralidade, à elevada atividade de água nos tecidos, ao alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis e de lipídeos insaturados e à rápida ação destrutiva das enzimas naturalmente presentes nos tecidos (BALDINI, 1982; LEITÃO, 1984; BERAQUET & LINDO, 1985; ABABOUCHE et al., 1991). A deterioração do pescado poderá ser resultante de alterações bioquímicas (oxidação lipídica ou hidrólise de proteínas) ou da atividade metabólica de microrganismos da microbiota natural ou contaminante. O mecanismo predominante, entretanto, dependerá da composição química do peixe, da ecologia microbiana e das condições de manuseio e armazenamento (LEITÃO, 1988; ASHIE et al., 1996).

Após a captura ou despesca, o peixe passa pelos seguintes estágios: hiperemia e/ou liberação do muco, *rigor mortis*, digestão química, autólise e decomposição bacteriana (Figura 1). A liberação do muco ocorre como uma reação peculiar do organismo agonizante ao meio ambiente adverso. O muco, constituído principalmente pela mucina, é um excelente substrato para o desenvolvimento de bactérias. Este deve ser retirado por simples lavagem, exceto naqueles peixes em que o muco contém também substâncias antimicrobianas (lisozima). 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 uréia. O pH do músculo aumenta até alcançar os valores iniciais (HULTIN, 1984; 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 temperaturas ambientes (VIEIRA, 2004).

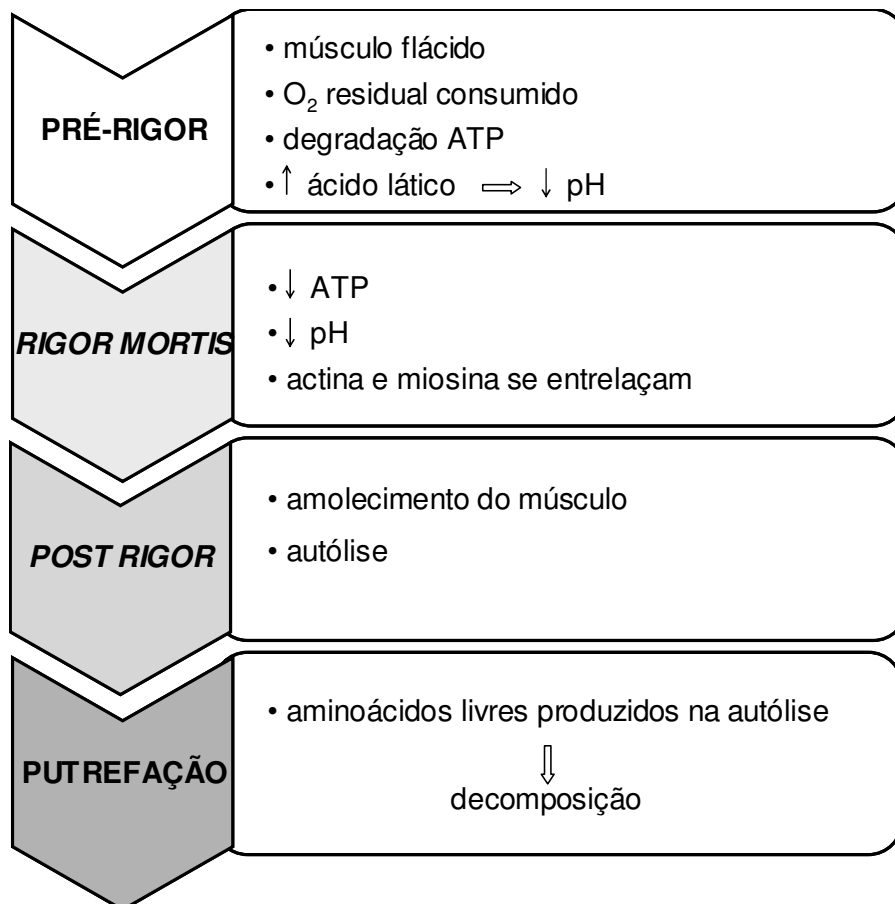


FIGURA 1. Etapas das alterações bioquímicas *post mortem* em pescado (MACHADO, 2008).

Os métodos de captura têm uma influência acentuada com relação ao intervalo de tempo necessário para que o *rigor mortis* se instale. Assim, o pescado submetido a um forte estresse durante o processo de captura, que antecede sua morte, terá o período de *rigor mortis* reduzido devido ao gasto excessivo de glicogênio. Os peixes de hábitos ativos como o atum e a cavala podem debater-se muito antes de sua morte, quando capturados por redes ou anzóis, prejudicando assim a sua qualidade e o tempo de estocagem em gelo (VIEIRA, 2004).

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).

Assim, o peixe passa a apresentar escamas opacas, que se soltam facilmente; olhos turvos com pupilas branco-leitosas; brânquias pálidas ou escuras; carne amolecida, cinzenta, sem brilho e sem elasticidade; cheiro desagradável de amônia, tornando-se impróprio para o consumo (NUNES, 1994). Segundo JAY (2005), a parte mais susceptível do peixe às contaminações bacterianas é a região branquial. Os sinais mais precoces de alteração sensorial podem ser detectados pelo mau odor que se percebe ao examinar as brânquias. Se o pescado não for eviscerado imediatamente, as bactérias intestinais atravessam rapidamente as paredes do intestino e chegam aos tecidos internos da cavidade intestinal. É possível que esse processo seja favorecido pela ação de enzimas proteolíticas no intestino, que podem ser naturais do intestino do peixe, de origem bacteriana ou de ambas as fontes.

O trinômio tempo x higiene x temperatura torna-se essencial para assegurar a qualidade do pescado. O tempo se refere à rapidez com que se desencadeiam 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; a higienização adequada de equipamentos e das instalações (HATHCOCK, 1982; LISTON, 1990; LUCAS, 1995; PANETTA et al., 1995).

Algumas práticas de manuseio recomendadas para aumentar a qualidade do pescado são sangria, evisceração, lavagem, resfriamento, acondicionamento e sanitização (VIEIRA, 2004). CHAKRABARTI (1988) e ASHIE et al. (1996) citam, ainda, o aumento da vida de prateleira de peixes, utilizando métodos químicos de preservação (sorbato de potássio, benzoato de sódio, nisina, etc.); irradiação; alta pressão; e armazenamento sob atmosfera modificada.

O *rigor mortis* demora mais para se iniciar e dura mais tempo, quanto mais baixa for a temperatura de armazenamento do pescado. A ação deterioradora das bactérias é dificultada, enquanto o *rigor mortis* não terminar. Desta forma, a refrigeração faz com que a deterioração, causada por bactérias, seja adiada. É de grande importância na conservação do pescado, durante todos os estágios da estocagem, seja a bordo ou durante o seu transporte e comercialização, e durante as etapas do processamento industrial com um tempo de espera, que o pescado esteja sempre adequadamente refrigerado. Temperaturas de resfriamento envolvem gelo ou refrigeração mecânica. Tanto pode ser usado como o principal método de conservação, como numa preservação temporária até que outro processo seja aplicado. O gelo, na indústria alimentícia, tem um dos mais importantes papéis, uma vez que evita e/ou retarda contaminações bacterianas (VIEIRA, 2004).

Alguns parâmetros, como ácidos e bases voláteis, pH, aminas voláteis, trimetilamina, álcoois e ácido succínico têm sido utilizados para avaliar o grau de decomposição ou qualidade do peixe. Estes valores aumentam com a decomposição do pescado, apesar de não serem considerados bons índices de qualidade de peixes. A avaliação sensorial do peixe é considerada um bom critério de qualidade; porém, o método é subjetivo e requer treinamento exaustivo. MIETZ & KARMAS (1977) e YAMANAKA (1990) observaram que a relação matemática entre cinco aminas bioativas (histamina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina) é um bom índice de qualidade para atum e sardinha.

2 AMINAS BIOATIVAS

2.1 Definição e classificação

As aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular. São, também, definidas como compostos nitrogenados, em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia foram substituídos por grupos alquila ou arila, como a histamina, que é uma molécula hidrofílica, apresentando um anel imidazólico e um grupo amino conectados por dois grupos metileno. As aminas são formadas por processos bioquímicos e participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas. São encontradas em alimentos de origem animal, vegetal, bem como em alimentos fermentados (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994; CINQUINA et al., 2004a; GLÓRIA, 2005).

A denominação das aminas bioativas, em sua maioria, é em função dos aminoácidos precursores (Figura 2), como por exemplo, a histamina, tiramina e triptamina que originam-se da histidina, tirosina e triptofano, respectivamente. Os nomes cadaverina e putrescina originam-se do fato destas aminas terem sido encontradas em produtos em decomposição ou putrefação. Já a espermina e espermidina se referem ao fluido seminal, de onde foram isoladas pela primeira vez (GLÓRIA, 2005).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química (Figura 3), da via biossintética e da função que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (GLÓRIA, 2005).

Com relação à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Ainda, em relação à estrutura química, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e como imidazolaminas (histamina) (SMITH, 1980-81; BARDÓCZ, 1995, SILLA-SANTOS, 1996).

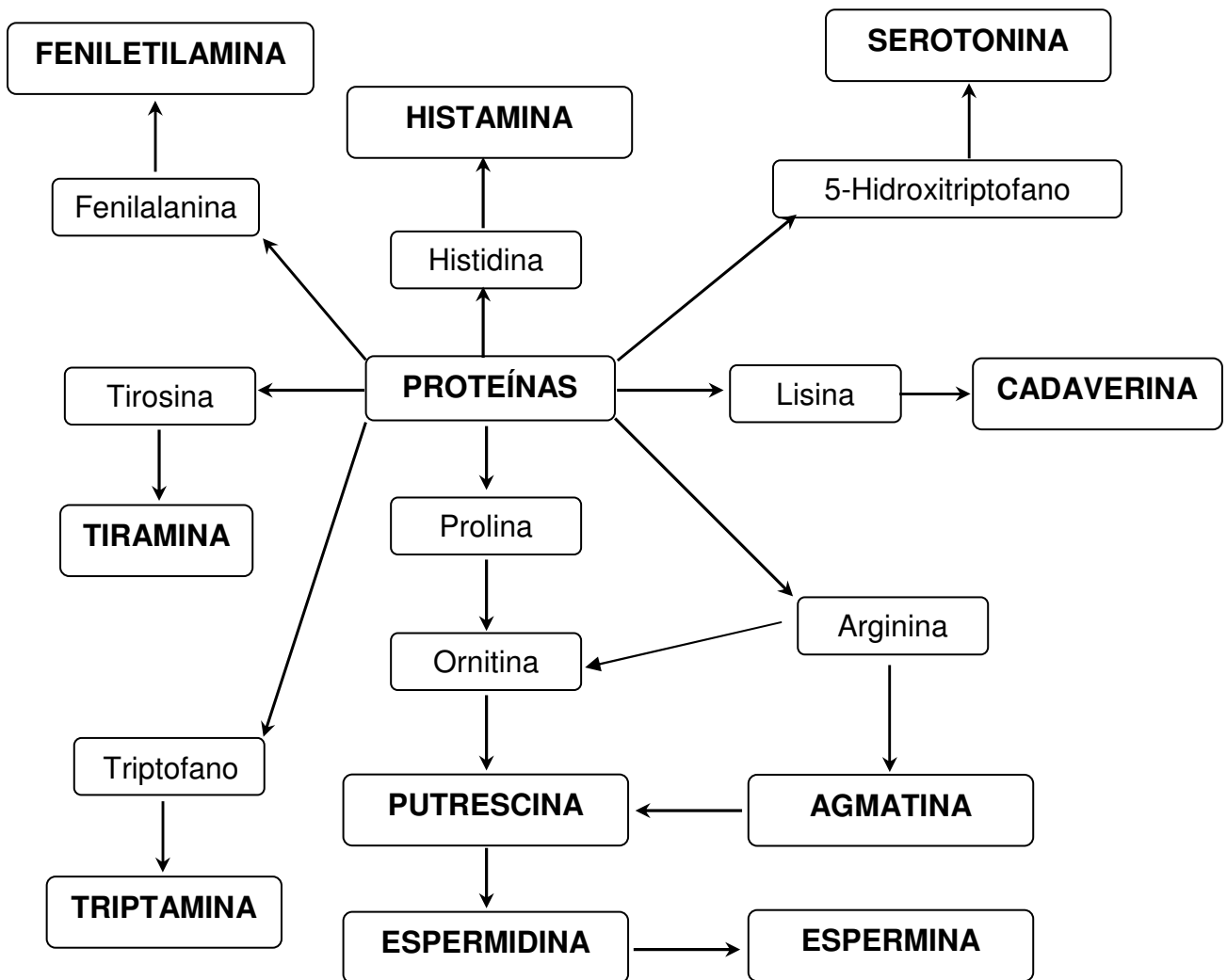


FIGURA 2. Vias metabólicas para formação de aminas bioativas (NAGATSU, 1991; HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005).

Quanto à via biossintética, as aminas se classificam em naturais, que são formadas durante a biossíntese *“in situ”*, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina). Por outro lado, as aminas biogênicas são formadas por reações de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de aminas nos alimentos (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005).

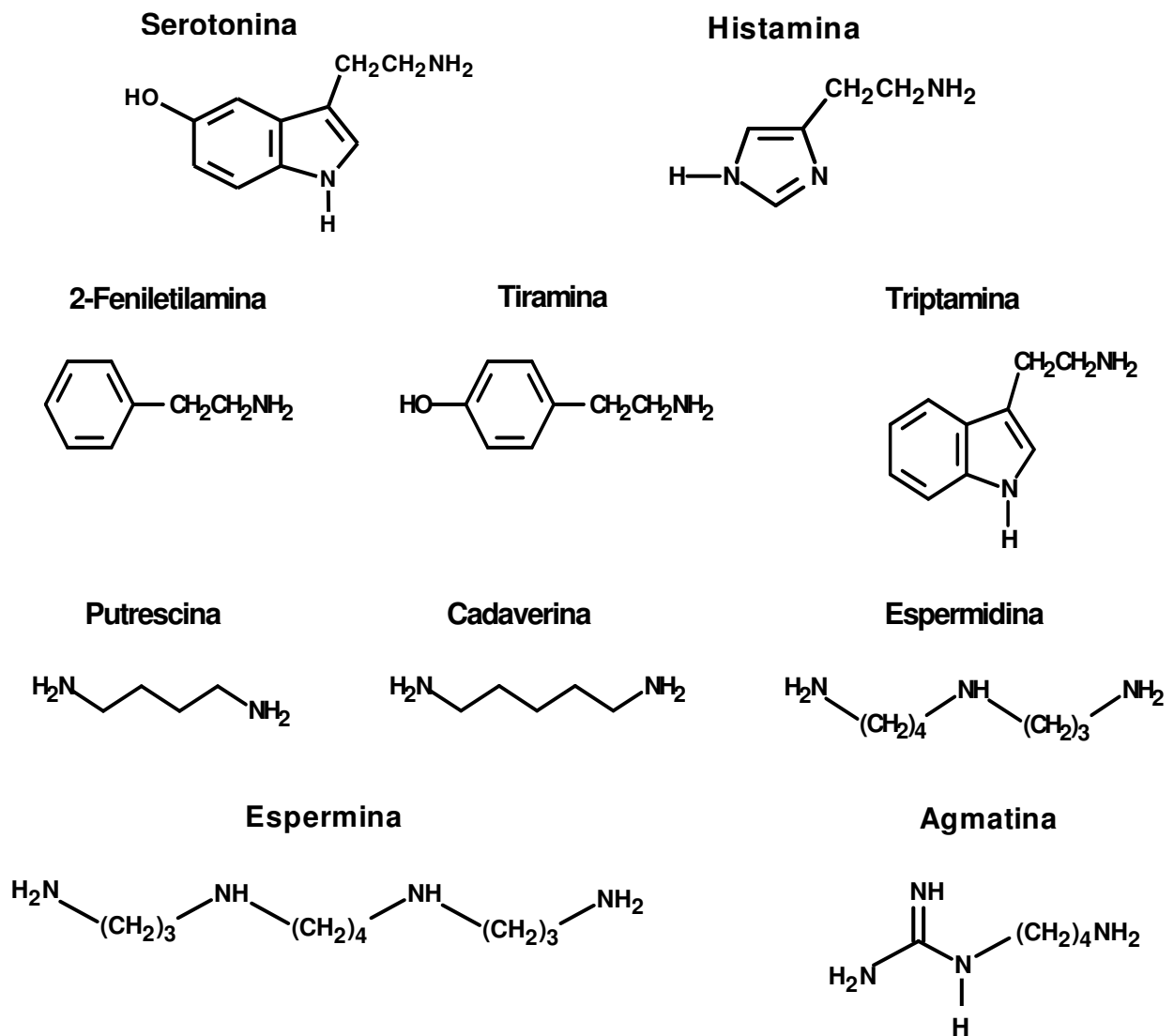


FIGURA 3. Estrutura química de algumas aminas.

Com relação à função que exercem, as aminas bioativas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento, por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular e, em vasoativas e neuroativas devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ et al., 1993).

2.2 Formação

As aminas biogênicas podem ser formadas por hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos (Figura 4), sendo a última a principal via de formação (MAIJALA et al., 1993; BARDÓCZ, 1995).



FIGURA 4. Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido (GLÓRIA, 2005).

A formação de aminas biogênicas nos alimentos está condicionada à disponibilidade de aminoácidos livres, presença de microrganismo descarboxilase positivo e, também, às condições favoráveis para o crescimento bacteriano, síntese e ação de enzimas descarboxilantes (SHALABY, 1996).

Os microrganismos com atividade descarboxilante sobre os aminoácidos podem fazer parte da microbiota associada ao alimento, serem introduzidos para obtenção de produtos fermentados, ou ainda por contaminação antes, durante ou depois do processamento. A quantidade e o tipo de aminas nos alimentos em geral, dependem da natureza, origem, etapas de processamento e microrganismos presentes (HALÁSZ et al., 1994).

Dentre os gêneros bacterianos capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos estão incluídos os *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Streptococcus*. Espécies de *Enterobacteriaceae* produzem histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (MARINO et al., 2000). Em peixes, *Morganella morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Hafnia alvei* são consideradas importantes formadoras de histamina (GLÓRIA, 2005).

Fatores como temperatura, pH do meio, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e coenzimas, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis podem influenciar na produção de aminas pelos microrganismos. Em meio ácido (pH 2,5 a 6,5), a produção de aminas é estimulada como mecanismo de

proteção da bactéria (GLÓRIA, 2005), devido ao fato de que altas concentrações do íon H^+ tornam-se prejudiciais ao microrganismo fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases (SILLA-SANTOS, 1996). Com relação à temperatura, as descarboxilases são mais ativas em temperaturas inferiores a 30 °C, acima de 40 °C são inativadas e, na faixa de 0 a 10 °C, a atividade dependerá da microbiota presente (HALÁSZ et al., 1994).

As aminas em alimentos podem estar naturalmente presentes no produto, ou serem formadas por microrganismos adicionados (culturas iniciadoras) ou contaminantes, introduzidos devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitárias durante a fabricação de certos produtos (HALÁSZ et al., 1994; KALACĚ et al., 2002; GLÓRIA, 2005).

Para formação das poliaminas, os aminoácidos ornitina e arginina atuam como precursores, sendo a putrescina um composto intermediário obrigatório. Para formar a putrescina, a arginina é transformada em ornitina pela ação da enzima arginase e, em seguida, a ornitina sofre a ação da ornitina descarboxilase (ODC) formando a putrescina (HILLARY & PEGG, 2003; MOINARD et al., 2005). A putrescina pode ser formada por diferentes vias dependendo do organismo vivo. Em animais e fungos, a formação da putrescina ocorre via descarboxilação da ornitina; em células bacterianas, porém, por via alternativa, ocorre descarboxilação da arginina formando agmatina para posterior formação da putrescina. Em vegetais pode ocorrer tanto via agmatina quanto via ornitina (BARDÓCZ, 1995).

Na síntese da espermidina, é adicionado à putrescina um grupo aminopropil derivado da metionina, via S-adenosilmetionina (SAM), e este mesmo grupo é adicionado à espermidina para formar a espermina. As enzimas espermidina e espermina sintases e SAM descarboxilase participam destas reações (GLÓRIA, 2005).

2.3 Funções

Estudos com microrganismos, animais e plantas têm demonstrado a importância das aminas bioativas no metabolismo e crescimento (SMITH, 1984). As aminas atuam como reservas de nitrogênio, substâncias naturais de crescimento de microrganismos e de vegetais, atuam como hormônios ou fatores de crescimento, aceleram o processo

metabólico, participam na regulação da secreção gástrica, na contração e relaxamento do músculo liso, são biomoduladores e estimulam os neurônios sensoriais, motores e cardiovasculares (SMITH, 1980-1981; STRATTON et al., 1991; BAUZA et al., 1995).

As poliaminas são indispensáveis às células vivas, desempenhando papel importante em diversas funções fisiológicas de humanos e animais (KALAČ & KRAUSOVÁ, 2005). Espermidina, espermina estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e de proteínas, na estabilização das membranas, e são essenciais no crescimento e duplicação das células (BARDÓCZ et al., 1993; JEEVANANDAM et al., 1997; MOINARD et al., 2005). Espermina e espermidina também têm implicações na renovação e funcionalidade do trato digestivo e na maturação da mucosa intestinal (BARDÓCZ, 1995; MOINARD et al., 2005).

Algumas aminas são psicoativas ou vasoativas. A histamina, serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina são psicoativas e atuam como neurotransmissoras no sistema nervoso central. Os neurônios que contêm histamina podem participar na regulação da ingestão de água, da temperatura corporal e da secreção de hormônio antidiurético, bem como no controle da pressão arterial e da percepção da dor (GOODMAN, 2003). As aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras (pressoras) ou vasodilatadoras. Tiramina, feniletilamina, isoamilamina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e triptamina causam um aumento na pressão sanguínea por constrição do sistema vascular e aumento da velocidade e da força da contração cardíaca. A serotonina é vasoconstritora, broncoconstritora, reduz o volume e a acidez do suco gástrico, tem efeito antidiurético, estimula o músculo liso e afeta o metabolismo de carboidratos (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Tipicamente, a histamina provoca dilatação dos pequenos vasos sanguíneos, resultando em rubor, diminuição da resistência periférica total, queda da pressão arterial sistêmica, aumento da contração e velocidade do batimento cardíaco e aumento da permeabilidade capilar (GOODMAN, 2003). Além disso, atua na contração e relaxamento do músculo liso, na regulação da secreção gástrica e como estimulante dos neurônios dos sistemas motor e sensorial (SMITH, 1980-1981; TAYLOR, 1986; STRATTON et al., 1991; GLÓRIA, 2005).

2.4 Aspectos toxicológicos

As aminas bioativas são substâncias importantes na dieta humana, pois desempenham funções fisiológicas essenciais. As aminas presentes nos alimentos são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação, ou mediante reações de oxidação por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO) (SMITH, 1980-1981). Sendo assim, as aminas geralmente não apresentam risco à saúde humana. Entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das aminas é inibido, podem causar efeitos tóxicos (HALÁSZ et al., 1994; LANGE et al., 2002).

A histamina pode ser catabolizada por diferentes reações (Figura 5). As duas principais rotas são a oxidação a imidazol-acetaldeído, pela DAO e metilação a 1,4-metil-histamina, pela histamina N-metil transferase (HMT). Em mamíferos, 60 a 80% dos metabólitos de histamina são derivados da desaminação oxidativa. As aminoxidases estão envolvidas em ambas as rotas; convertem 1,4-metil-histamina ao aldeído correspondente e têm um menor papel na conversão de histamina a imidazol-acetaldeído. Inibidores da MAO podem interferir em qualquer destes estágios, embora o metabolismo da 1,4-metil-histamina seja um dos mais afetados, já que a DAO está primariamente envolvida na conversão de histamina a imidazol-acetaldeído. Esses metabólitos têm pouca ou nenhuma atividade e são excretados na urina (GLÓRIA, 2005).

Dentre os fatores que interferem no catabolismo das aminas, tem-se a deficiência genética, a ação de agentes farmacológicos inibidores da MAO ou de substâncias potencializadoras como as aminas putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermidina e espermina (HALÁSZ et al., 1994). Segundo BAUZA et al. (1995), o etanol também pode atuar como inibidor da MAO, intervindo no metabolismo das catecolaminas, tiramina e feniletilamina.

A mais freqüente intoxicação causada por aminas biogênicas em alimentos envolve a histamina (CINQUINA et al., 2004b). 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 edema de glote. Os principais alimentos envolvidos nesta intoxicação são peixes e queijos (STRATTON et al., 1991; CINQUINA et al., 2004b).

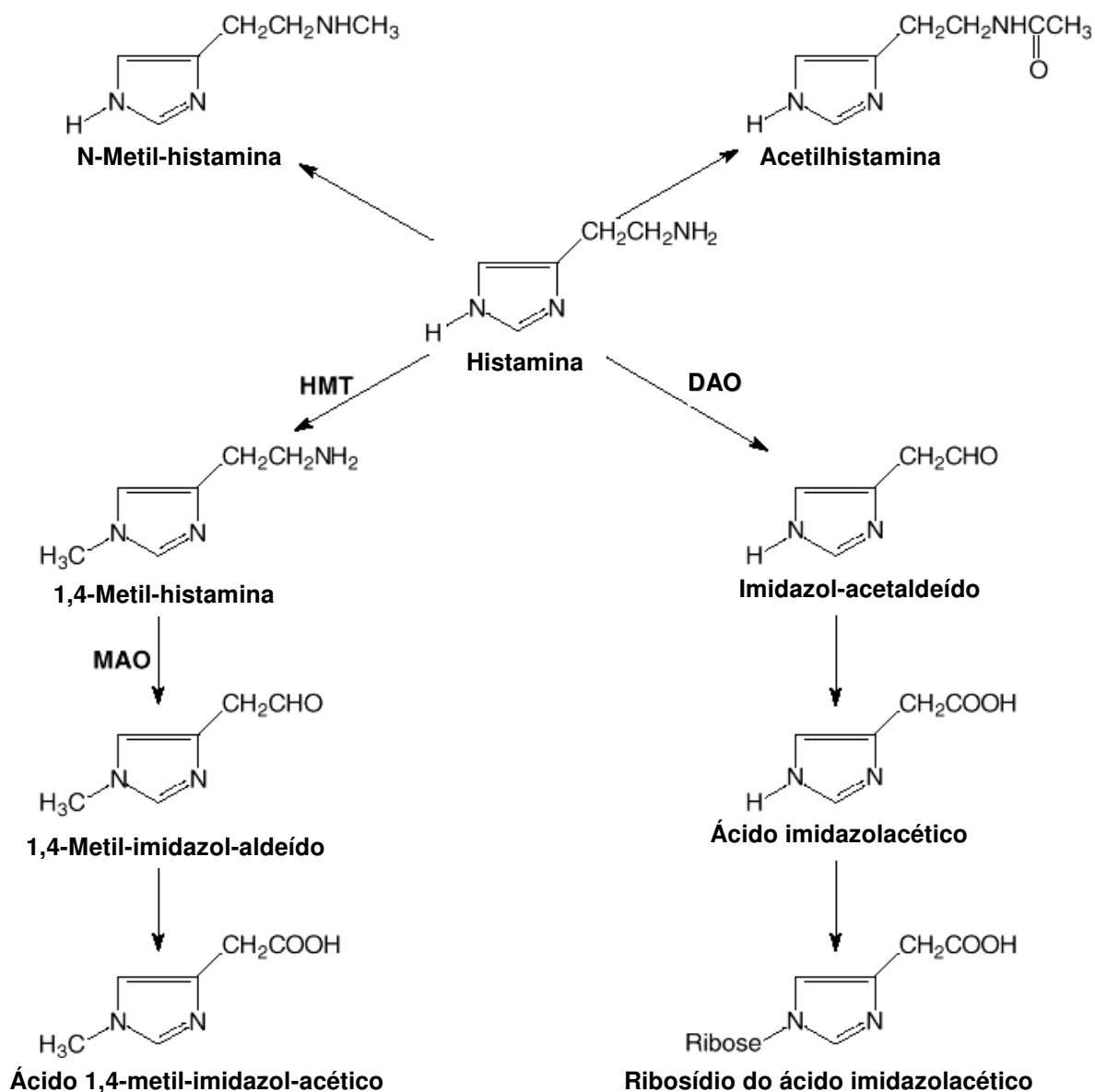


FIGURA 5. Metabolismo da histamina em humanos (GLÓRIA, 2005).

As aminas putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO, aumentando o seu transporte através da parede gastrointestinal (TAYLOR, 1986). 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 (SOARES & GLÓRIA, 1994; GLÓRIA, 2005). Após liberação dos grânulos de armazenamento, a histamina exerce um papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas. As ações sobre o músculo liso brônquico e sobre os vasos sanguíneos respondem por muitos sintomas da reação alérgica (GOODMAN, 2003).

Os níveis tóxicos das aminas bioativas para humanos são ainda incertos, porém limites são sugeridos. A dose tóxica para histamina em alimentos situa-se na ordem de 100 mg/kg de alimento e em bebida alcoólica 2 mg/L (BRINK et al., 1990; LIMA & GLÓRIA, 1999). Entretanto, indivíduos sensíveis à histamina, asmáticos ou portadores de úlcera são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da histamina (HALÁSZ et al., 1994).

A tiramina é a segunda amina envolvida em intoxicações alimentares. Em concentrações elevadas pode causar cefaléia, febre, vômito, transpiração, inflamação cutânea, dores de cabeça e aumento da pressão sanguínea. Em pacientes em tratamento com inibidores da MAO, a tiramina pode causar enxaqueca, induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (MAGA, 1978; SMITH, 1980-1981; MAIJALA et al., 1993; LEHANE & OLLEY, 2000).

As aminas triptamina e 2-feniletilamina, da mesma forma que a tiramina, podem provocar dor de cabeça, enxaqueca, aumentar a pressão sanguínea, devido a constrição do sistema vascular e a taxa da contração cardíaca (VANDERKERCKHOVE, 1977; SMITH, 1980-1981). A tiramina e serotonina podem causar crises hipertensivas e hemorragia intracraniana (GARCIA-MORENO et al., 1978).

As poliaminas espermidina e espermina podem acelerar o crescimento de tumores. Sendo assim, para pacientes em tratamento de câncer recomenda-se uma dieta com reduzidos teores destas substâncias de forma a diminuir o crescimento e progresso do tumor (BARDÓCZ, 1995; LIMA & GLÓRIA, 1999). A espermidina, espermina, putrescina e cadaverina podem reagir com nitrito sob condições ácidas para formar nitrosaminas, muitas das quais apresentam atividade cancerígena (HALÁSZ et al., 1994; SILLA-SANTOS, 1996; ELIASSEN et al., 2002).

3 AMINAS BIOATIVAS EM PEIXE

3.1 Intoxicação por escombrídeos

A intoxicação histamínica também tem sido denominada de intoxicação por escombrídeos por estar associada à intoxicação após o consumo de peixes da família *Scombridae*.

A histamina distribui-se amplamente, embora de modo desigual, por todo o reino animal, sendo encontrada em muitos venenos, bactérias e plantas. Quase todos os

tecidos dos mamíferos contêm histamina em quantidades que variam de menos de 1 µg/g a mais de 100 µg/g. As concentrações no plasma e em outros líquidos corporais geralmente são muito baixas, mas o líquido cefalorraquidiano humano contém quantidades significativas.

O principal local de armazenamento da histamina na maior parte dos tecidos é o mastócito e no sangue é o basófilo. Essas células sintetizam histamina e a armazenam nos seus grânulos secretórios. A concentração de histamina é particularmente alta nos tecidos que contêm grande número de mastócitos, como a pele, a mucosa da árvore brônquica e a mucosa intestinal. Outros locais de formação ou armazenamento que não os mastócitos incluem a epiderme, a mucosa gástrica, os neurônios do sistema nervoso central (SNC) e células de tecidos que se regeneram ou crescem rapidamente (GOODMAN, 2003).

A taxa de renovação da histamina é rápida nestes locais, pois nestes, é liberada continuamente, ao invés de armazenada. A histamina ingerida não contribui para as reservas corporais, pois nas quantidades normalmente ingeridas ou formadas por bactérias no trato gastrintestinal, esta é rapidamente metabolizada e eliminada na urina (GOODMAN, 2003).

O envolvimento da histamina como o principal agente da intoxicação histamínica (escombrídeos) é comprovado por: sintomas idênticos àqueles da administração intravenosa de histamina ou reação alérgica; a eficácia da terapia com anti-histamínicos; e a presença de níveis elevados de histamina em peixes deteriorados que causam a síndrome (LEHANE & OLLEY, 2000).

Há variações individuais quanto à susceptibilidade, e sinais clínicos são mais severos em pessoas sob tratamento com medicamentos tal como a isoniazida, inibidora de enzimas que normalmente detoxificam a histamina no intestino (LEHANE & OLLEY, 2000). De acordo com a Figura 6, observa-se que, além de medicamentos, outros agentes podem potencializar os efeitos tóxicos, pelo bloqueio das aminoxidases (MAO, DAO).

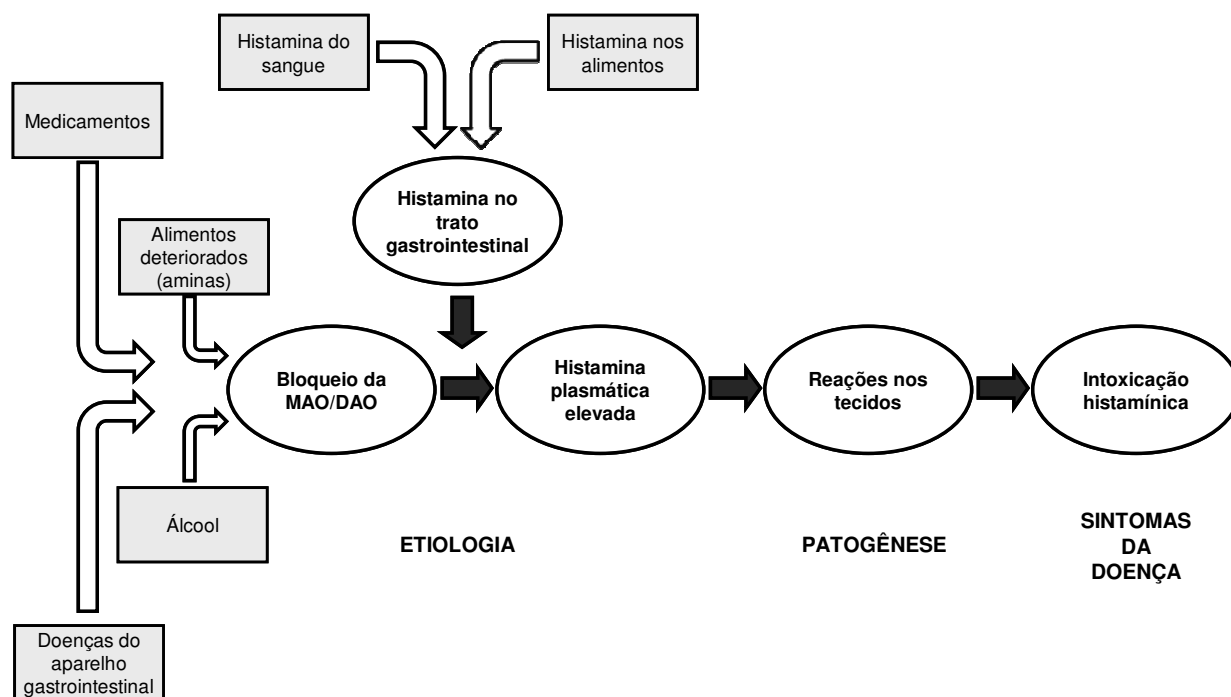


FIGURA 6. Fatores desencadeadores da intoxicação histamínica (adaptado de SATTLER & LORENZ, 1990).

A histamina é produzida por ação bacteriana, especialmente quando os peixes são expostos a altas temperaturas por um determinado período de tempo (HALÁSZ et al., 1994). Várias espécies de microrganismos, naturais ou contaminantes, são capazes de produzir histamina, dentre elas, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *K. oxytoca*, *Hafnia alvei*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Serratia liquefaciens*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Pseudomonas putrefaciens*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophyla* (VECIANA-NOGUÉS et al., 1997). Entretanto, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* e *Klebsiella pneumoniae* são as principais bactérias produtoras de histamina, e aquelas frequentemente isoladas de peixes incriminados em intoxicação histamínica (TAYLOR, 1986).

De acordo com TAYLOR (1986), vários surtos de intoxicação foram registrados nos Estados Unidos, Japão, Inglaterra, França, Dinamarca, Canadá, dentre outros, sendo mais implicados 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).

Na Tabela 1, estão descritos alguns surtos de intoxicação histamínica por peixes. Entretanto, muitos dos casos de intoxicação não são reportados, uma vez que os sintomas podem ser relativamente leves, passageiros e as pessoas acometidas não procuram 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. Desta forma, a real incidência de intoxicação histamínica não é conhecida (GLÓRIA, 2005). Não foram encontrados dados sobre ocorrências de intoxicação por histamina no Brasil.

TABELA 1. Surtos de intoxicação histamínica após consumo de peixes

PAÍS	PERÍODO	Nº SURTOS	Nº CASOS
Canadá	1975-1981	6 *	-
Dinamarca	1976-1982	33	-
	1993-1998	13	-
Finlândia	1993-1998	9	> 772
França	1980-1983	10*	> 500
	1993-1997	38	-
Japão	1950-1954	14	1215
	1970-1980	42*	4122
Suécia	1993-1998	4	12
Reino Unido	1976-1982	136	439
	1987-1996	105	405
Estados Unidos	1968-1981	110*	888
	1973-1987	202	1216
	1988-1998	32	155
	1999-2006	213	836

(*) surtos envolvendo outros alimentos, como carnes e queijos.

(-) informação não disponível.

Adaptado de: GLÓRIA (2005); CDC (2008).

De acordo com o Center for Disease Control (CDC), nos Estados Unidos a maior incidência dos surtos de intoxicação histamínica foi registrada em restaurante ou

delicatessen (Figura 7), refletindo a prevalência de condições higiênico-sanitárias inadequadas nestes (CDC, 2008).

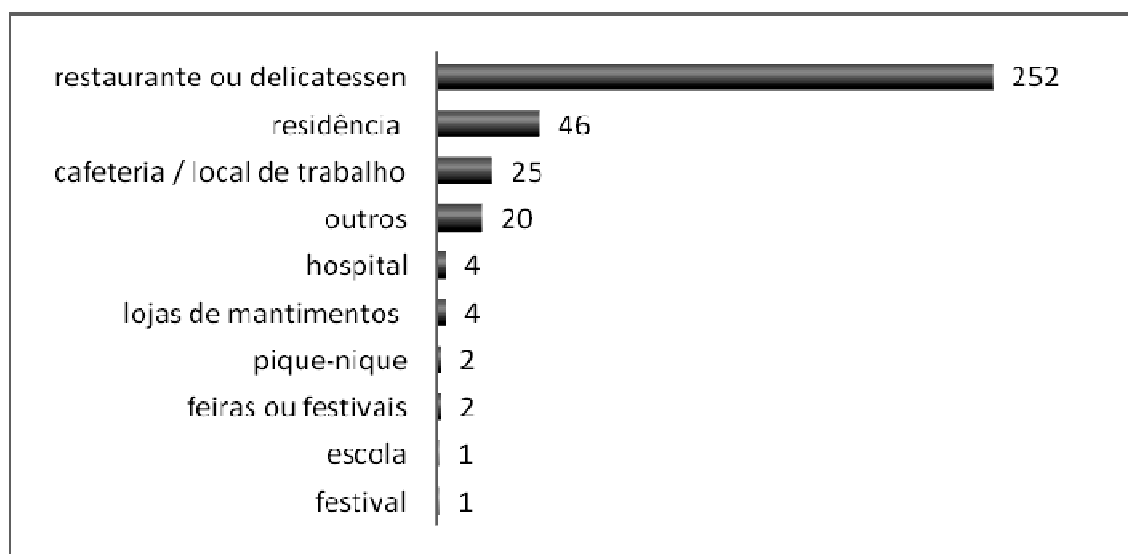


FIGURA 7. Locais de ocorrência dos surtos de intoxicação histamínica, nos Estados Unidos, de 1998-2002 (CDC, 2008).

3.2 Aminas biogênicas como critério de qualidade

Na maioria dos alimentos ricos em proteínas e aminoácidos, submetidos a condições higiênico-sanitárias inadequadas e condições favoráveis ao crescimento microbiano, pode-se ter a produção de aminas biogênicas (SILLA-SANTOS, 1996). Assim sendo, as aminas podem ser empregadas 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 produção, processamento e armazenamento de certos produtos (TAYLOR, 1986; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997). Podem também ser usadas 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). Uma vantagem do uso de aminas como critério de qualidade reside no fato destas serem termoresistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico (LIMA & GLÓRIA, 1999).

MIETZ & KARMAS (1977) e YAMANAKA (1990) observaram que a relação entre

cinco aminas bioativas (histamina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina) é um bom índice de qualidade para atum e sardinha. Vários índices de qualidade química, a semelhança destes, foram propostos para alimentos baseados nos teores de aminas bioativas, dentre eles, pescados (VECIANA-NOGUÉS et al., 1997), carne de frango e produtos derivados (SILVA & GLÓRIA, 2002). Além de serem úteis como critério de qualidade, teores elevados de histamina e de outras aminas biogênicas em alimentos podem indicar o potencial do alimento em causar intoxicação alimentar (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994).

MIETZ & KARMAS (1978) verificaram que baixos níveis de putrescina, cadaverina e histamina e relativamente altos níveis de espermidina e espermina foram encontrados em amostras de atum de boa qualidade. Nas amostras de qualidade intermediária foi observado um aumento significativo nos níveis de putrescina, cadaverina e histamina e um decréscimo nos teores de espermidina e espermina. Já no peixe em decomposição, os teores de putrescina, cadaverina e principalmente histamina continuaram a subir significativamente, enquanto os níveis de espermidina e espermina decresceram.

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). Sob condições fisiológicas normais, os músculos de peixes frescos contêm espermidina e espermina. A histamina pode estar presente, mas em baixas concentrações (GLÓRIA et al., 1999). Peixes da família *Scombridae* são particularmente susceptíveis à formação de histamina por conterem grandes quantidades de histidina livre no tecido muscular (ARNOLD et al., 1978).

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 Food and Drug Administration (FDA) revisou o guia de conformidade para decomposição e intoxicação histamínica em 1995 (FDA, 1995). Foi estabelecido que o peixe pode ser considerado em decomposição quando o nível de histamina atinge 50 mg/kg, para pescado no porto, e 100 mg/kg para produto enlatado. Para a União Européia, um nível aceitável de 100 mg/kg foi estabelecido para histamina em atum e outros peixes pertencentes às famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae* (CE, 1991). Segundo esta diretiva, para

exportação aos países da União Européia, a cada nove (09) amostras analisadas de um mesmo lote, duas podem conter histamina em níveis de 100 a 200 mg/kg. Caso os valores excedam esta faixa, o lote será rejeitado, uma vez que representará riscos à saúde do consumidor. Além disto, os peixes podem estar implicados em surtos de intoxicação histamínica quando a histamina atinge 500 mg/kg (RAWLES et al., 1996).

4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS À ANÁLISE DE AMINAS BIOATIVAS EM PESCADO

De uma perspectiva analítica, a determinação de aminas bioativas em alimentos não é uma técnica simples, pois estas substâncias possuem estruturas químicas distintas e estão presentes em faixas de concentração variáveis, às vezes muito baixas, em uma matriz complexa. Técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são as mais utilizadas, uma vez que fornecem alta resolução, sensibilidade e versatilidade, e o tratamento da amostra é simples (LAVIZZARI et al., 2006).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar o teor de aminas bioativas em pescado. Entretanto, pesquisas continuam a serem feitas de forma a desenvolver métodos mais simples, rápidos, sensíveis e de menor custo. As técnicas para determinação de aminas bioativas envolvem as etapas de extração, derivação, separação e quantificação (TAYLOR, 1985).

4.1 Extração

O tipo e a natureza das aminas e dos alimentos a serem analisados afetam significativamente a eficiência da extração (ZEE et al., 1983). 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).

As reações de protonação da amina e sua reversão para a forma não protonada, em função do pH, são extremamente importantes no isolamento e análise destas substâncias, bem como a solubilidade das aminas e de seus sais, em soluções aquosas e em solventes orgânicos (CUSTÓDIO, 2006). A histamina apresenta elevada

solubilidade em água e clorofórmio quente; na forma de sal diidrocloreto, elevada solubilidade em água e metanol, e média em etanol (WINDHOLZ, 1996).

A extração de amins de uma matriz sólida pode ser realizada utilizando-se água à temperatura ambiente (INGLES et al., 1980; INGLES et al., 1985) ou a temperaturas elevadas (VOIGHT et al., 1974), solventes orgânicos ou reagentes ácidos. Solventes orgânicos, como metanol (HUI & TAYLOR, 1983; REUVERS et al., 1986), acetona (FOY & PARRAT, 1961), etanol (SATO et al., 1970) e acetonitrila-ácido perclórico (MORET & CONTE, 1996), já foram utilizados para extrair amins livres (MORET & CONTE, 1996). Na extração de amins ligadas a outros componentes da matriz, são empregados reagentes ácidos, como ácido clorídrico (RICE et al., 1976; CHANG et al., 1985), ácido perclórico (KOEHLER & EITENMILLER, 1978; ZEE et al., 1985; OHTA et al., 1993) e ácido tricloroacético (ZEE et al., 1983; VALE & GLÓRIA, 1997).

Para peixes e seus produtos, o ácido tricloroacético (TCA) 5% foi mais eficiente do que o HCl (MORET & CONTE, 1996). O TCA mostrou, também, ser mais eficiente na extração de amins bioativas em carnes e produtos cárneos quando comparado com o ácido perclórico e com o metanol (ZEE et al., 1983; EEROLA et al., 1993; VECIANA-NOGUÉS et al., 1995). Entre os solventes utilizados para a extração das amins, 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 amins biogênicas em peixes, por ser simples, não explosivo, agir rapidamente e fornecer uma boa média de recuperação (ZEE et al., 1983; SHAKILA et al., 2001).

Vários estudos foram realizados utilizando-se diferentes métodos de extração para determinação de amins bioativas em pescado, conforme detalhado na Tabela 2.

TABELA 2. Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em pescado

AUTORES	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO
BRANDÃO (1996)	Uma porção de 5 g de amostra triturada e homogeneizada foi adicionada de 7 mL de TCA 5%. Após agitação por 5 min, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 40 min e o sobrenadante filtrado. A extração foi repetida por mais duas vezes com volumes de 7 e 6 mL de TCA, sendo os sobrenadantes combinados.
VECIANA-NOGUÉS (1997); LIMA (1999), GLÓRIA et al. (1999)	Amostras de 5 g, trituradas e homogeneizadas, foram adicionadas de 7 mL de TCA 5%, agitadas por 5 min e centrifugadas a 10000 x g a 4 °C por 20 min. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com volumes de 7 e 6 mL de TCA, sendo os filtrados combinados.
LAPA-GUIMARÃES (2005)	Das amostras trituradas e homogeneizadas, foram retirados 10 g. Após homogeneização com 20 mL de TCA 5% por 1 min, centrifugou-se a 1200 x g a 18 °C por 4 min e o extrato sobrenadante foi filtrado. O precipitado foi re-extraído duas vezes com 10 mL de TCA 5%, centrifugado e filtrado. Os sobrenadantes das três extrações foram combinados, diluídos a 50 mL com TCA 5% e mantidos sob refrigeração (4 °C) até o momento da análise.
MALLE et al. (1996); DUFLOS et al. (1999)	Uma mistura de 5 g de amostra homogeneizada e 10 mL de ácido perclórico 0,2 mol/L foi agitada a frio, centrifugada a 2500 x g e 12500 x g, respectivamente, e introduzida num tubo hermeticamente fechado, para a realização das etapas de derivação, separação e quantificação.
ÖZOGUL et al. (2006); ÖZOGUL & ÖZOGUL (2006)	Uma amostra de 5 g foi homogeneizada com 20 mL de TCA 6% por 3 minutos , centrifugada a 11180 x g por 10 min a 4 °C e filtrada. A alíquota foi completada até 50 mL com água destilada e armazenada em freezer (-18 °C).
YEH et al. (2006)	Foram adicionados 50 mL de TCA 20% a 5 g de amostras e homogeneizados por 10 min. Diluiu-se 10 mL de sobrenadante para 100 mL com água destilada. O precipitado foi filtrado e o sobrenadante ajustado para pH 9,0 com KOH 50%. O extrato foi adicionalmente clarificado por centrifugação a 700 x g por 3 min.
TSAI et al. (2006)	Uma amostra de 5 g foi homogeneizada com 20 mL de TCA 6% por 3 min, centrifugada a 10000 x g por 10 min a 4 °C e filtrada. Os filtrados foram transferidos para frascos e adicionou-se TCA 6% até se completar um volume final de 50 mL.

4.2 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; KIRSCHBAUM et al., 1994).

Alguns dos reagentes de derivação normalmente empregados na análise de aminas são 9-fluorenilmetil clorofornato (FMOC), naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (KIRSCHBAUM et al., 1994), cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno sulfonila (cloreto de dansila) (MALLE et al., 1996; DUFLOS et al., 1999; LAPA-GUIMARÃES, 2005), 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 (DnsCl). IBE et al. (1991) também utilizaram cloreto de dansila para derivar as aminas, porém a quantificação foi realizada com detector de fluorescência. A grande maioria dos métodos emprega detecção fluorimétrica, com derivação pré ou pós-coluna (ÖNAL, 2007).

O uso de OPA, ao invés do cloreto de dansila e da fluorescamina, é preferido devido à grande seletividade para aminas (Figura 8) e ao aumento da sensibilidade pelo método de fluorescência (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; LAVIZZARI et al., 2006). O uso de derivação pós-coluna é recomendado por ser o período de tempo, entre a formação do complexo e a detecção, curto e padronizado (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993). Nos procedimentos de derivação pós-coluna, o OPA é o reagente mais utilizado (KHUHAWAR & QURESHI, 2001).

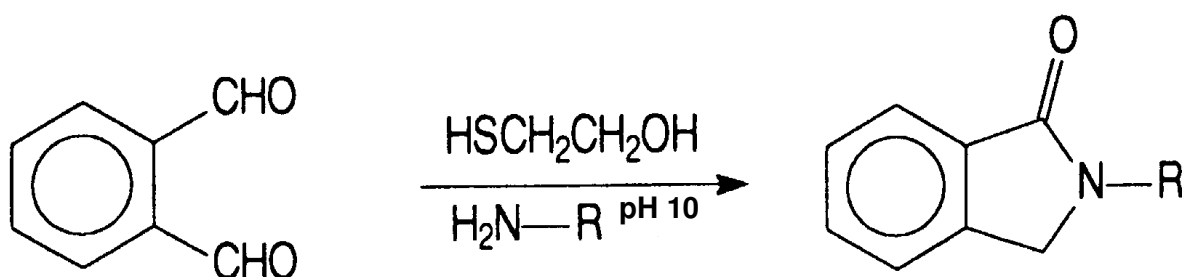


FIGURA 8. Reação de OPA e mercaptoetanol com aminas primárias (adaptado de CONCA et al., 2001).

GLÓRIA & 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. LAVIZZARI et al. (2006) otimizaram e validaram o método de determinação destas aminas bioativas, além de octopamina e dopamina, em produtos de origem vegetal, empregando o mesmo tipo de detector.

ÖZOGUL et al. (2006) e TSAI et al. (2006) analisaram aminas bioativas em pescado por CLAE empregando detector UV-visível e derivação pré-coluna. DALGAARD et al. (2006) avaliaram a formação de aminas em filés de peixes frescos e descongelados extraíndo-as com ácido tricloroacético, e quantificando-as com CLAE e derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção por fluorescência a 430 nm. Os mesmos métodos de quantificação e detecção foram utilizados por BAIXAS-NOGUERAS et al. (2002) para determinação das aminas bioativas putrescina, cadaverina, histamina, agmatina, espermidina e espermina em pescado submetidos a diferentes condições de armazenamento – sob refrigeração e empregando-se gelo.

4.3 Separação

Vários métodos cromatográficos podem ser utilizados para a quantificação de aminas bioativas em alimentos, entre eles as cromatografias em papel, em camada delgada e líquida de alta eficiência, sendo a última mais seletiva e sensível, permitindo a detecção de pequenas quantidades de aminas (SHALABY, 1995; LAPA-GUIMARÃES, 2005).

A separação e quantificação das aminas biogênicas por CLAE oferecem maiores vantagens sobre outros métodos, pois este permite a separação e quantificação simultânea (TAYLOR, 1985; VALE & GLÓRIA, 1997). A CLAE por fase reversa é considerada a técnica mais adequada para análise de aminas em alimentos (MORET & CONTE, 1996).

HUI & TAYLOR (1983), GLÓRIA & DAESCHEL (1995), IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996) utilizaram as colunas Ultrasphere ODS, Novapack C₁₈ e µBondapack C₁₈, respectivamente, para separar aminas bioativas por cromatografia líquida. A separação pode ser feita por sistema isocrático ou por gradiente de eluição, sendo

os solventes mais comumente usados a água, o metanol e a acetonitrila (CHANG et al., 1985).

A introdução do contra-íon como o sal sódico dos ácidos hexanossulfônico, heptanossulfônico ou octanossulfônico 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). KOEHLER & EITENMILLER (1978) e CHANG et al. (1985) introduziram o par iônico ácido heptanossulfônico e o sal sódico do ácido octanossulfônico, respectivamente, à fase móvel para obter melhor separação pelo sistema isocrático e picos mais bem definidos. CHANG et al. (1985) observaram que a melhor separação obtida para histamina, tiramina e triptamina foi utilizando o sal sódico do ácido octanossulfônico 0,02 mol/L acetonitrila: água (80:20). GLÓRIA & DAESCHEL (1995) obtiveram melhores resultados para amostras de vinho utilizando a fase móvel A: tampão acetato 0,2 mol/L + sal sódico do ácido octanossulfônico 10 mmol/L dissolvido em 100 mL de água + acetonitrila: metanol (9:1, v/v).

BAIXAS-NOGUERAS et al. (2002) obtiveram boa separação das aminas bioativas putrescina, cadaverina, histamina, agmatina, espermidina e espermina em pescado utilizando ácido octanossulfônico e coluna de fase reversa C₁₈. ZHAO et al. (2007) empregaram o mesmo tipo de sal e de coluna para estas aminas em camarão e lula, submetidos a diferentes condições de armazenamento – dias e temperaturas.

5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de se mostrar a qualidade de análises quantitativas e qualitativas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações seguras, exatas e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser submetido a uma minuciosa avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004)

A International Organization for Standardization (ISO) define validação como a confirmação, por meio de exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos do método, para um uso pretendido, são atendidos (ABNT, 1994). Para métodos analíticos, a validação significa o processo de estabelecimento de características de desempenho e limitações de um método, identificando quais

fatores podem afetar o seu desempenho e qual a extensão da influência destes fatores, além de demonstrar que o método é adequado ao propósito (EURACHEM, 1998).

Embora haja razões legais, técnicas e comerciais que justifiquem a implantação da validação de métodos analíticos, não existe uma norma estabelecida em âmbito nacional ou internacional. Além disso, neste âmbito existem diferentes organizações que definem os parâmetros para validação de métodos, sendo algumas definições divergentes entre as distintas organizações. Não há um procedimento normalizado, comum a todas, que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais (RIBANI et al., 2004).

A NBR ISO/IEC 17025:2005 estabelece que métodos normalizados adaptados, não normalizados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados (ABNT, 2005). O guia para a validação de métodos do EURACHEM, por sua vez, sugere que mesmo para métodos normalizados, verificações de parâmetros de desempenho devem ser realizadas. Casos em que o controle de qualidade indicar alterações de um método com o tempo, deve-se também realizar a validação (SOUZA & BRITO, 2002)

O laboratório deve decidir quais parâmetros de desempenho do método necessitam ser caracterizados a fim de validar o método (EURACHEM, 1998). Os parâmetros de desempenho analítico, também denominados de parâmetros analíticos, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito, devem ser baseados na intenção do uso do método. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário. É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI et al., 2004).

Apesar da divergência quanto à inclusão dos parâmetros de desempenho em um processo de validação de um método analítico, são empregados, normalmente, os seguintes itens: exatidão, precisão, fidelidade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, sensibilidade, especificidade, recuperação, robustez, estabilidade e intervalo de aplicação (LANÇAS, 2004).

JENKE (1996) avaliou a utilização dos parâmetros de desempenho para validação de métodos nas áreas governamental, industrial e acadêmica, observando que os itens exatidão e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) apresentavam-se com maior frequência, seguidos de especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e sensibilidade. Neste estudo,

considerou-se que a exclusão dos parâmetros de desempenho exatidão e precisão implicaria na necessidade de justificativas pertinentes, enquanto a exclusão de parâmetros menos freqüentes, como sensibilidade, seria menos controversa. Entretanto, SOUZA & BRITO (2002) ressaltaram que a avaliação da sensibilidade torna-se fundamental em protocolos de validação para comparação de métodos. Assim, a seleção dos parâmetros de desempenho deve estar estritamente relacionada com os objetivos da validação.

Todas as etapas devem ser minuciosamente avaliadas na estratégia de validação, desde a coleta e a preservação das amostras até a emissão do resultado final, com documentação dos resultados obtidos em cada etapa (SOUZA et al., 2001).

Os parâmetros de desempenho mais comumente utilizados na validação de métodos analíticos estão definidos a seguir.

5.1 Seletividade

Corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004). Se um método é específico, ele deve produzir resposta para um único analito. Um método seletivo produz resposta para vários analitos que podem se distinguir entre si. Geralmente, a especificidade é considerada como 100 % de seletividade (EURACHEM, 1998). Para garantir a especificidade do método, deve-se avaliar se o sinal medido pelo equipamento é devido exclusivamente ao analito ou resulta da soma das contribuições de múltiplos componentes.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante o processo de validação e subsequente uso do método. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade em métodos de separação é pela comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada desta (padrão), garantindo que nenhum interferente está co-eluindo no tempo de retenção desta substância. Outro

procedimento para avaliar a seletividade é por meio da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

5.2 Limite de detecção

É a menor concentração de um analito na matriz que pode ser identificada com nível de confiança especificado (EURACHEM, 1998); ou seja, corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004).

Experimentalmente, o limite de detecção pode ser obtido por vários procedimentos, dentre os quais: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O método visual é baseado na utilização da adição de concentrações conhecidas da substância de interesse à matriz, de modo a distinguir sinal analítico de ruído, pela visualização da menor concentração visível (detectável). Para métodos que apresentam ruído da linha de base, o limite de detecção poderá ser obtido pela relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1, que corresponde à concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. Baseando-se em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção (LD) pode ser expresso como $LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$, em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta (matriz isenta do analito de interesse, equação da linha de regressão ou coeficiente linear da equação) e S é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica. Para calcular estes dados, deve-se construir uma curva analítica, utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção (RIBANI et al., 2004).

O INMETRO (2007) sugere a utilização do parâmetro t do teste de Student para estimar o limite de detecção do método, segundo fórmula abaixo:

$$LDM = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot (s)$$

Sendo:

LDM = Limite de detecção do método

$t_{(n-1,1-\alpha)}$ = valor da abscissa t (Student) para $(1 - \alpha) \times 100\%$ nível de confiança e $(n-1)$ graus de liberdade
s = desvio padrão das análises em replicata

5.3 Limite de quantificação

É a menor concentração do analito na matriz que pode ser determinada em níveis considerados aceitáveis de exatidão e precisão (EURACHEM, 1998). Os mesmos critérios de limite de detecção podem ser adotados para o limite de quantificação, utilizando a relação 10:1; na relação baseada em parâmetros da curva analítica, substitui-se o valor 3,3 na equação do cálculo de LD por 10. Este fator de multiplicação também é sugerido pelo INMETRO (2007), envolvendo o desvio padrão das análises, feitas para quantificação do limite de detecção. O critério de aceitabilidade deve ser definido pelo analista. Comumente, para análises cromatográficas, emprega-se o método baseado nos parâmetros da curva analítica, a qual deve conter a concentração correspondente ao limite de quantificação (RIBANI et al., 2004).

5.4 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (EURACHEM, 1998). A faixa de trabalho é o intervalo de padrões em que os requisitos de precisão, exatidão e linearidade são satisfeitos. O limite inferior da faixa de trabalho deve coincidir com o limite de quantificação.

Pode-se confirmar a linearidade e determinar a faixa de trabalho construindo-se curvas analíticas, da concentração do analito em função da resposta obtida no sistema de detecção, com replicatas em torno da concentração esperada do analito.

5.5 Exatidão

É o grau de concordância entre a média de um conjunto de resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro ou reconhecido como tal. A exatidão indica a diferença entre o valor obtido e o valor real do analito na matriz, sendo geralmente expressa em termos de tendência (bias), ou seja, o desvio (positivo ou negativo) da média do valor obtido em relação ao valor real (EURACHEM, 1998).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

5.6 Precisão

É o grau de dispersão dos resultados, obtidos sob condições especificadas, em torno do valor médio. A precisão pode ser avaliada em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade, sendo expressa em termos de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (SOUZA & BRITO, 2002). Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito, e assim devem ser determinadas em um número de concentrações; se relevante, a relação entre precisão e concentração do analito deve ser estabelecida (EURACHEM, 1998).

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados obtidos por medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, denominadas condições de repetitividade, em intervalos curtos de tempo. A repetibilidade representa a variabilidade obtida pelo mesmo analista, aplicando o mesmo método, no mesmo dia, sobre replicatas da mesma amostra (RIBANI et al., 2004).

Se a mesma amostra é analisada sob condições variadas, a medida de precisão recebe o nome de reprodutibilidade. Esta é definida como sendo o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento analítico, ao mesmo material, sob condições preestabelecidas (como diferentes laboratórios, operadores, equipamentos) podendo ser avaliada parcialmente pela variação de um ou mais fatores (EURACHEM, 1998).

Experimentalmente, as medidas de precisão podem ser obtidas realizando-se um mínimo de 10 determinações independentes do analito em concentrações diferentes (EURACHEM, 1998) ou um mínimo de 9 determinações (3 concentrações diferentes/3 replicatas cada concentração) independentes (ICH, 1996).

5.7 Sensibilidade

É a capacidade de um método distinguir, alterando a resposta de medida do instrumento, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (EURACHEM, 1998).

A sensibilidade do método não pode ser confundida com o limite de detecção. A sensibilidade representa a capacidade de discriminação entre amostras de teores de analito próximos.

MATERIAL E MÉTODOS

1 MATERIAL

1.1 Amostras

Filés de atum frescos (família *Scombridae*) foram adquiridos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, pressupondo-se que estes estivessem armazenados sob temperaturas inferiores a 4 °C, condição mantida durante o transporte até o Laboratório de Bioquímica de Alimentos (LBqA) – Faculdade de Farmácia, UFMG. A confirmação da temperatura foi realizada imediatamente após o recebimento da amostra (Figura 9).



FIGURA 9. Avaliação de temperatura da amostra de atum no momento da recepção.

1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que foram de grau cromatográfico. Estes solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, em PVDF, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Toda a água utilizada foi ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas bioativas 1,3-diaminopropano (DIAM, dicloridrato), histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), agmatina (AGM, sal sulfato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Os agentes de derivação *orto*-ftalaldeído (OPA) e cloreto de dansila (DnsCl) também foram adquiridos da Sigma.

1.3 Soluções

Todas as soluções foram acondicionadas em tubos hermeticamente fechados, identificadas e armazenadas sob refrigeração para a realização das análises, exceto as soluções de cloreto de dansila e tampão acetato de sódio: octanossulfonato de sódio, que foram mantidas a -20 °C e 22 °C, respectivamente.

1.3.1 Solução padrão das aminas

Para o preparo da solução padrão de cada amina, exceto 1,3-diaminopropano, considerou-se a massa da base livre (sem a utilização da massa de cloreto ou sulfato) para resultar numa concentração de 1 mg/mL em 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.

O mesmo procedimento para obtenção da solução padrão de aminas foi realizado utilizando-se água em substituição ao HCl.

1.3.2 Soluções padrão de histamina

A partir da solução de histamina a 1 mg/mL, em HCl 0,1 mol/L, foram feitas as diluições, neste ácido, até se obterem as concentrações de 120; 100; 80; 60; 50; 40; 30; 20; 10; 0,2; e 0,1 µg/mL. As mesmas diluições foram preparadas, provenientes da solução padrão de histamina a 1 mg/mL, em água.

1.3.3 Solução padrão de 1,3-diaminopropano

Duas soluções do padrão interno, 1,3-diaminopropano, foram preparadas, ambas na concentração de 0,8 mg/mL, considerando-se a massa de base livre: uma em água e outra em HCl 0,1 mol/L.

1.3.4 Solução de L-prolina

A solução de L-prolina foi obtida por meio da dissolução de 100 mg de L-prolina em 1 mL de água destilada e seu preparo ocorreu imediatamente antes de sua utilização.

1.3.5 Solução de cloreto de dansila

No preparo da solução de cloreto de dansila, 750 mg deste agente derivante foram dissolvidos em 100 mL de acetona.

1.3.6 Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio

Como uma das fases móveis, 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 (Digimed, SP, Brasil) por meio de ácido acético glacial. Esta solução foi filtrada em membrana HAWP em éster de celulose, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA) e degaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil).

1.3.7 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, cujo pH foi ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio.

A esta solução foram adicionados 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido 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, degaseificada em aparelho ultra som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) e mantida sob abrigo da luz.

1.4 Vidraria

Toda a vidraria utilizada era de polipropileno. Estas foram submetidas à calibração por empresas devidamente autorizadas.

2 MÉTODOS

2.1 Otimização do processo de extração de histamina em pescado

A fim de se obter uma resposta sobre a melhor condição de extração utilizando os métodos existentes na literatura, procedeu-se à execução das etapas esquematicamente representadas na Figura 10. O planejamento experimental foi delineado após definição das variáveis independentes de estudo em função da recuperação de histamina na amostra e análise detalhada do processo. Nesta análise, foram coletadas informações baseadas em trabalhos da literatura, verificando-se as restrições ao processo e, por fim, escolhendo-se a faixa de aplicabilidade dos valores a serem empregados no estudo.

Neste trabalho foi proposto um planejamento experimental fatorial completo (RODRIGUES & IEMMA, 2005). Foram realizados 16 ensaios em duplicata e 5 repetições no ponto central, com o intuito de avaliar o efeito das variáveis: tempo de agitação; tempo, temperatura e velocidade de centrifugação.

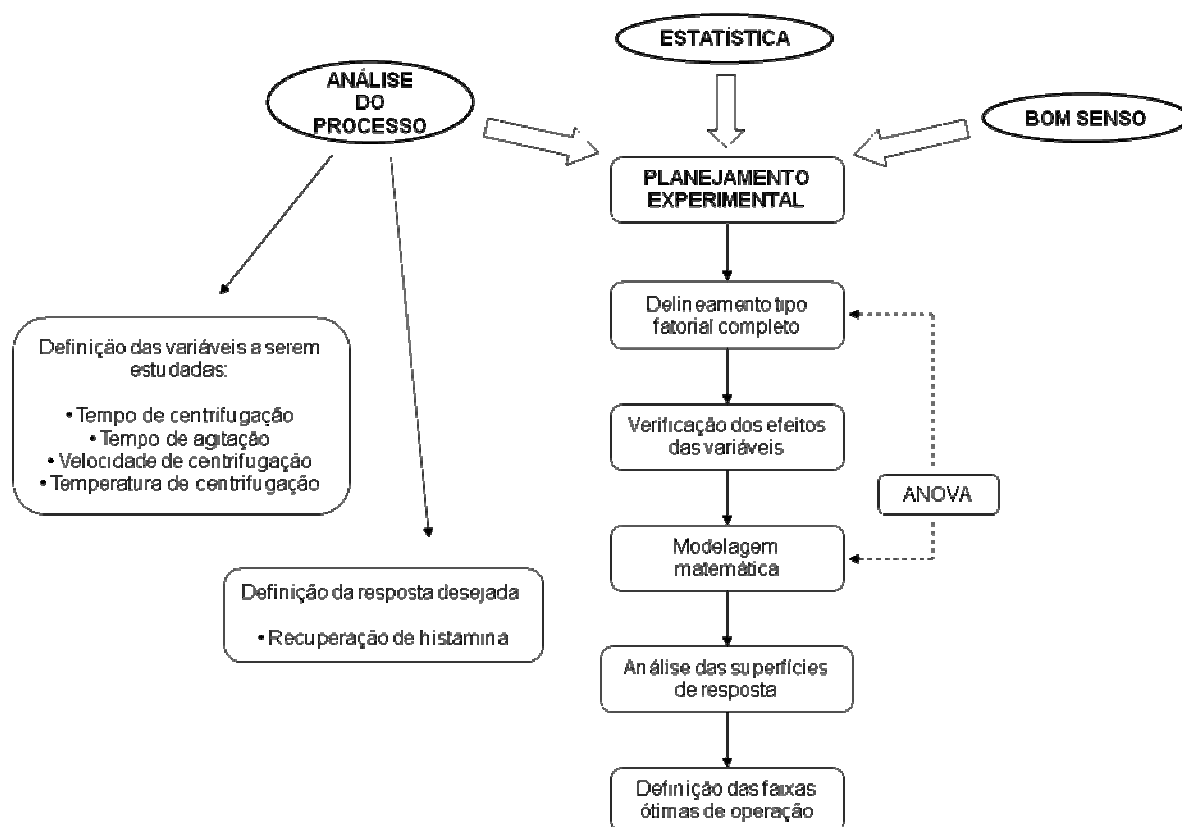


FIGURA 10. Fluxograma das etapas envolvidas na otimização da extração de histamina.

Os níveis estudados nesse planejamento estão apresentados na Tabela 3 e a resposta foi dada em percentagem de recuperação da histamina adicionada.

TABELA 3. Planejamento experimental para otimização da extração de histamina em pescado

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0*	+1
X ₁ – Tempo de agitação (s)	20	70	120
X ₂ – Tempo de centrifugação (min)	3	12	21
X ₃ – Velocidade de centrifugação (x g)	1500	11250	21000
X ₄ – Temperatura de centrifugação (°C)	0	3	6

* Ponto central.

Estas variáveis foram definidas baseando-se em estudos realizados por diversos autores, conforme demonstrado na Tabela 2, e na necessidade de diminuição do tempo de análise e controle da temperatura da amostra, evitando que a concentração de histamina real fosse alterada.

Inicialmente, procedeu-se ao preparo da amostra, com o objetivo de reduzir seu tamanho, proporcionando maior superfície de contato da matriz com o agente extrator, e se obter uma amostragem representativa. Após quarteamento e trituração (Figura 11), 5 g desta amostra foram pesados e, exceto para a controle, foram adicionados de 0,25 mg de histamina a partir da solução de 1 mg/mL, em HCl. Em seguida, foram adicionados 7 mL de solução de TCA 5% e a mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex (Biomatic, Brasil). O extrato foi separado em centrífuga refrigerada modelo MR23i (Jouan S.A., Saint Herblain, França) e o sobrenadante filtrado em papel Whatman nº 1. A partir da etapa de adição de ácido, este procedimento foi repetido por mais duas (02) vezes e os filtrados combinados.

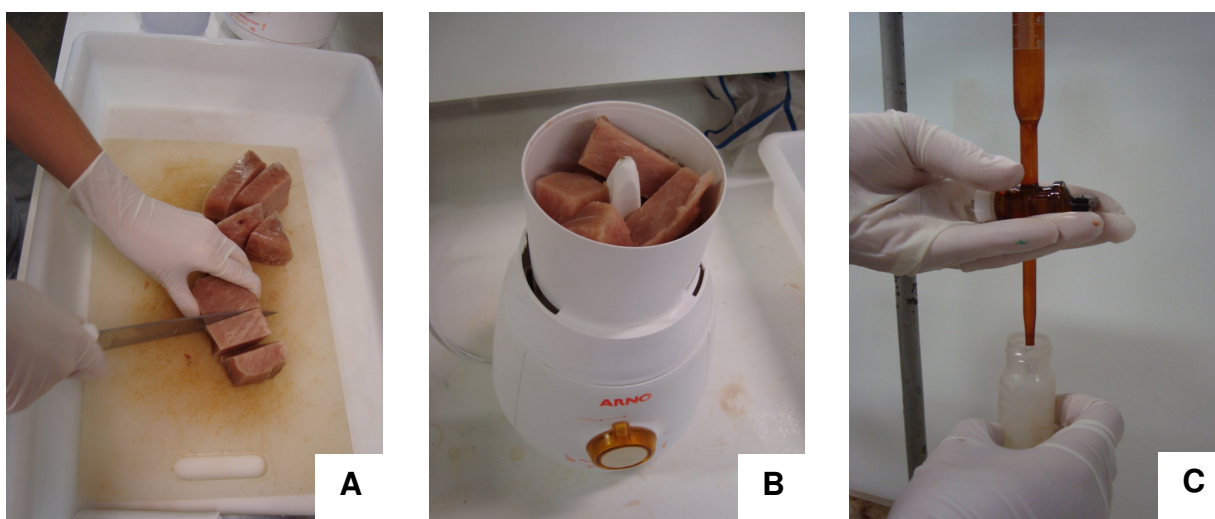


FIGURA 11. Etapas de quarteamento (A), trituração (B) e adição de TCA (C) envolvidas na extração de histamina em pescado.

Após a etapa de extração, a amostra foi filtrada em membrana HAWP em éster de celulose, com especificações de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (VALE & GLÓRIA, 1997).

O cromatógrafo utilizado (Shimadzu, Kioto, Japão) era composto por:

- 3 bombas com conjunto de lavagem automática do pistão, sendo 2 modelo LC-10 AD e 1 LC-10 ADvp acoplada a uma câmara de mistura,
- injetor automático modelo SIL-10 ADvp,
- detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL, com comprimento de onda de 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente,
- unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador,
- coluna μ Bondapak C18 de fase reversa (3,9 x 300 mm, 10 μ m) e pré-coluna μ Bondapak (Waters, Milford, MA, EUA).

Ao final da análise, por meio de uma curva analítica, foi calculada a recuperação de histamina na amostra, considerando a concentração inicial desta amina na amostra sem adição (controle). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Obtidos os dados de recuperação, procedeu-se a análise estatística dos mesmos para verificação dos efeitos das variáveis, posterior modelagem matemática e análise das superfícies de resposta, convergindo para a definição das faixas ótimas de trabalho.

2.2 Comparação de métodos para determinação de histamina em pescado

Foram comparados dois métodos de derivação, separação e quantificação de aminas bioativas em pescado: CLAE com derivação pré-coluna com cloreto de dansila e detecção no UV (DUFLOS et al., 1999) e CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (VALE & GLÓRIA, 1997).

Para cada método, foram definidas as condições de gradiente e tempo de análise que permitissem melhor separação das aminas bioativas. Comparando-se os resultados obtidos, foram definidos o melhor procedimento de extração e o melhor método para separação da histamina de outras aminas e sua quantificação.

O método que apresentou o melhor resultado de separação das aminas em estudo foi otimizado de forma a reduzir o tempo de análise e separar a histamina das

demais aminas. Para avaliar as diferentes condições testadas, neste estudo foram utilizadas amostras de pescado e determinados os seguintes parâmetros: efeito de matriz, seletividade, precisão e exatidão.

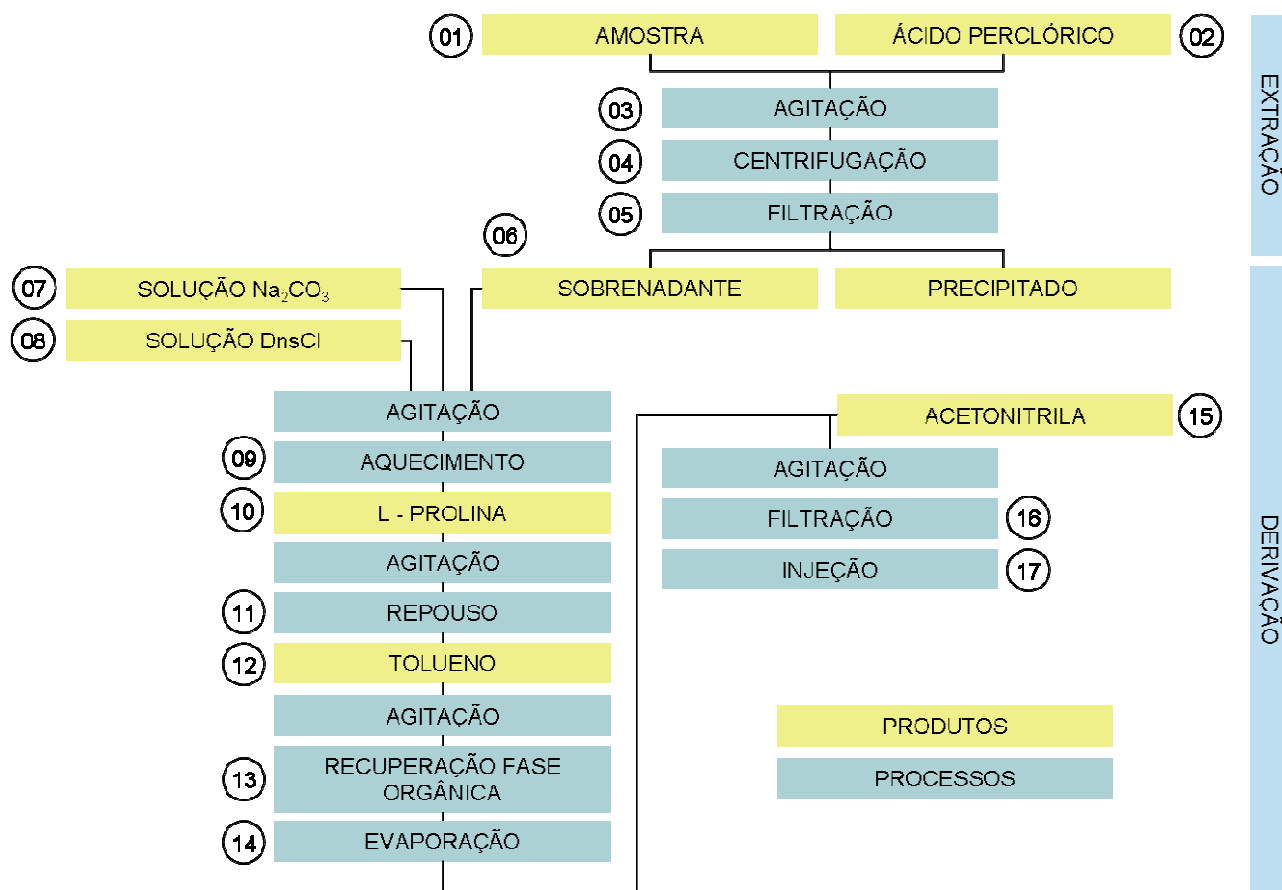
2.2.1 CLAE com derivação pré-coluna e detecção no UV

Inicialmente a amostra de pescado foi submetida às etapas de quarteamento e trituração para, em seguida, ser extraída. Após a extração, prosseguiu-se o processo com a derivação e posterior análise por CLAE. As etapas de extração e derivação estão esquematicamente apresentadas na Figura 12.

Na etapa de aquecimento, foi utilizado banho de água termostático (Precision Scientific, Chicago, Illinois, EUA). As amostras foram filtradas imediatamente antes da injeção, utilizando-se membranas HVLP, em PVDF, com 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Após a realização destas etapas, iniciou-se a análise cromatográfica, cuja representação esquemática está demonstrada na Figura 13. O cromatógrafo (Shimadzu, Kioto, Japão) era composto por:

- 2 bombas modelo LC-10AD e LC-10ADvp com conjunto de lavagem automática de pistão, e uma delas acoplada a uma câmara de mistura,
- injetor Rheodyne com *loop* de 20 µL,
- detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10Avp,
- unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador e a outros módulos do sistema,
- coluna Kromasil C₁₈ (4,6 x 250 mm), 5 µm (Phenomenex, EUA) e pré-coluna µBondapak C₁₈, 10 µm (Waters, Milford, MA, EUA).



- | | |
|---|--|
| 01 – amostra triturada, 5 g | 02 – solução de ácido perclórico 0,2 mol/L |
| 03 – agitação em vórtex, 1 min | 04 – centrifugação a 12500 x g, 5 min, 4 °C |
| 05 – papel filtro Whatman nº 1 | 06 – 100 µL |
| 07 – solução saturada, 200 µL | 08 – 400 µL |
| 09 – banho de água termostático a 60 °C, 5 min | 10 – 100 µL |
| 11 – repouso ao abrigo da luz, 15 min, temperatura ambiente | 12 – 500 µL |
| 13 – captação da fase superior, pipeta Pasteur | 14 – evaporação da fase orgânica sob fluxo de N ₂ |
| 15 – 300 µL | 16 – filtração em membrana HVLP |
| 17 – injeção da amostra para análise por CLAE | |

FIGURA 12. Fluxograma dos processos de extração e derivação da amostra com cloreto de dansila e detecção no UV para análise de histamina por CLAE (DUFLOS et al., 1999).

Na separação das aminas bioativas, foram utilizadas água e acetonitrila como fases móveis e um gradiente de eluição exposto na Tabela 4. As soluções padrão utilizadas foram preparadas em água. As aminas, após reação de derivação e separação, foram quantificadas a 254 nm com um detector espectrofotométrico com

arranjo de diodos acoplado a um integrador. O espectro de absorção no UV da histamina na amostra foi confirmado por comparação com o do padrão.

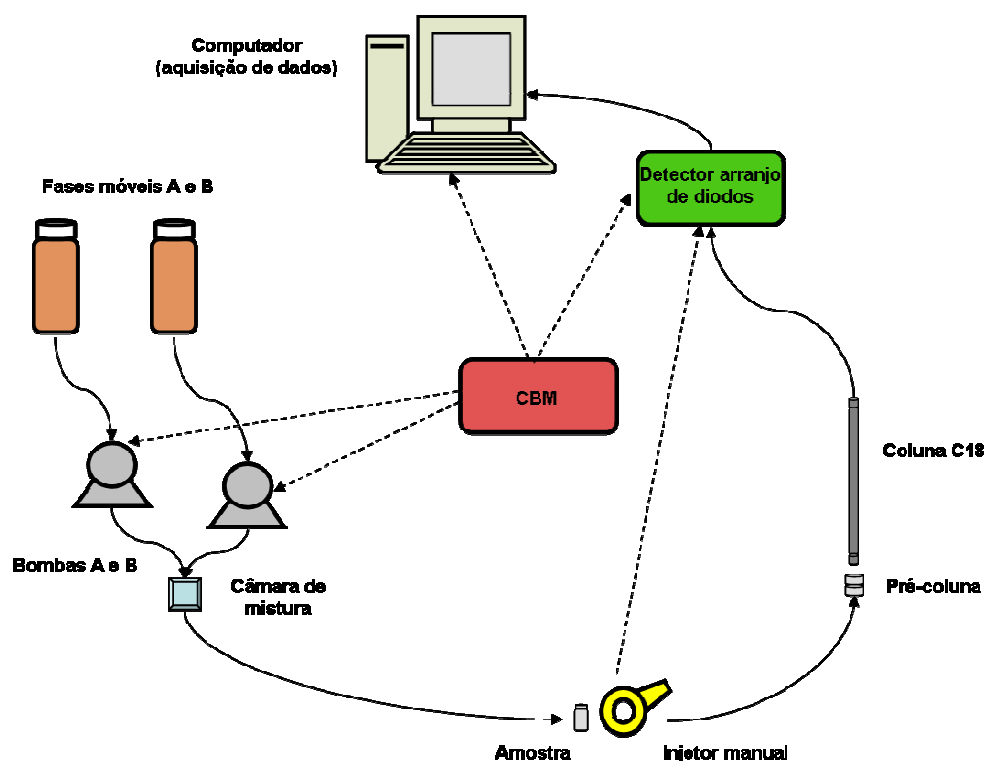


FIGURA 13. Sistema CLAE com detector de arranjo de diodos utilizado na análise de histamina após derivação pré-coluna.

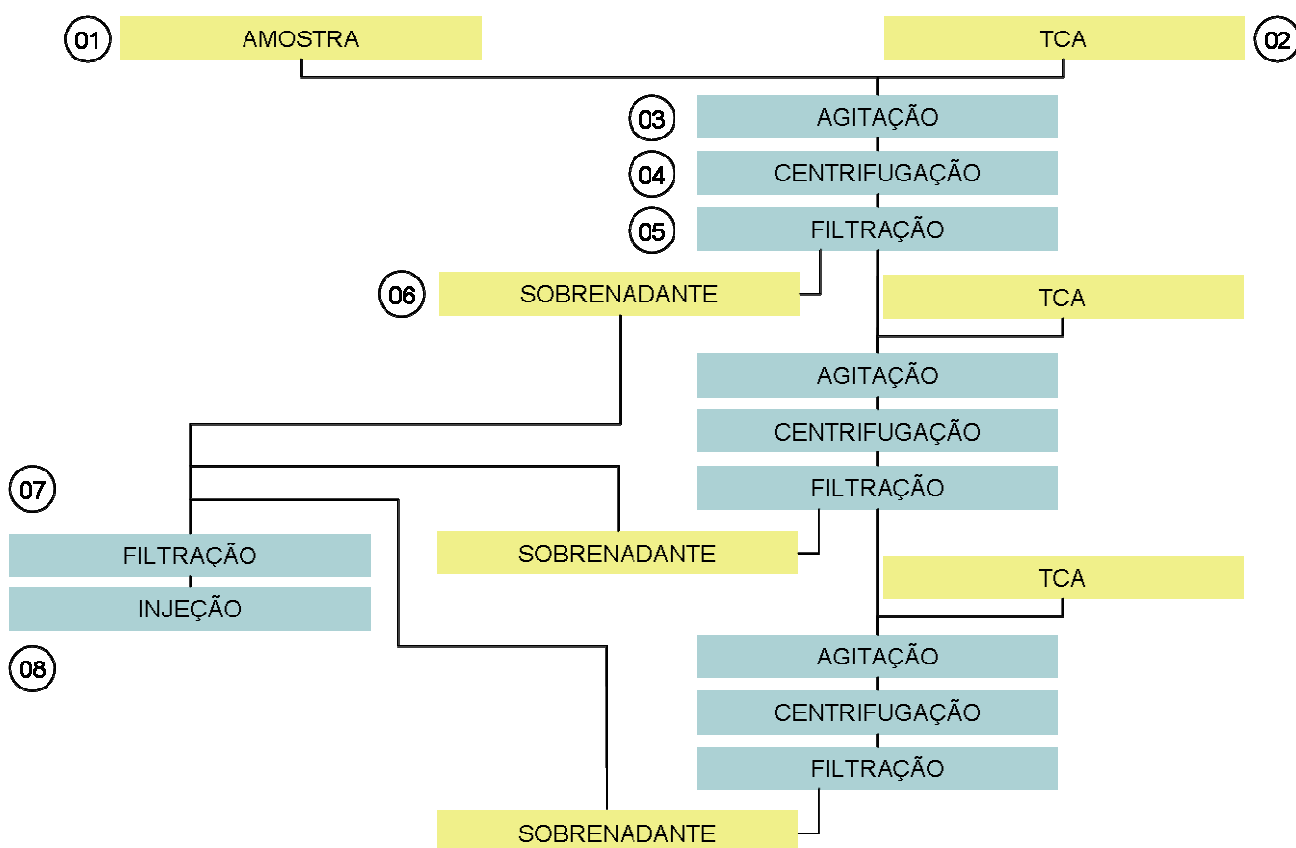
TABELA 4. Gradiente de eluição para as fases móveis água e acetonitrila empregado na determinação de histamina

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	40	60
6	25	75
8	25	75
13	5	95
20	5	95
20,01	40	60
30	40	60

2.2.2 CLAE com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência

Após quarteamento e trituração, a amostra foi extraída e o sobrenadante filtrado em membrana HAWP em éster de celulose, com diâmetro de 13 mm e tamanho do poro de 0,45 µm (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Em seguida, iniciou-se a análise por CLAE (VALE & GLÓRIA, 1997), conforme apresentado na Figura 14.

Para a separação das aminas, foram empregadas como fases móveis acetoneitrila (fase A) e solução tampão acetato de sódio-octanosulfonato de sódio (fase B). Foi desenvolvido um gradiente de eluição para este sistema binário (Tabela 5).



01 – amostra triturada, 5 g

03 – agitação em vórtex, 70 s

05 – papel filtro Whatman nº 1

07 – filtração em membrana HAWP

02 – solução de TCA 5%, 7 mL

04 – centrifugação a 11250 x g, 3 min, 0 °C

06 – sobrenadante contendo a histamina extraída

08 – injeção da amostra para análise por CLAE

FIGURA 14. Fluxograma do processo de extração de histamina em pescado segundo a otimização realizada.

Para a realização da análise cromatográfica, foi utilizado cromatógrafo Shimadzu (Kioto, Japão), constituído por:

- 3 bombas com conjunto de lavagem automática do pistão, sendo 2 modelo LC-10 AD e 1 LC-10 ADvp acoplada a uma câmara de mistura,
- injetor automático modelo SIL-10 ADvp,
- detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL, com comprimentos de onda de 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente,
- unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador e a todos os módulos,
- coluna Nova-Pak C₁₈ de fase reversa (3,9 x 300 mm, 5 µm) e pré-coluna µBondapak (Waters, Milford, MA, EUA).

TABELA 5. Gradiente de eluição para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação de histamina

Tempo (min)	Solução tampão (%)	Acetonitrila (%)
0	85,5	14,5
0,5	98	2
4	98	2
5	78	22
6	98	2
11	98	2
13	60	40
15	60	40
20	85,5	14,5
30	85,5	14,5

Na Figura 15 está disposto um esquema representativo da análise por CLAE com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência. A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna em um tubo de teflon de 2 m de comprimento conectando a câmara ao detector de

fluorescência.

A identificação das aminas foi feita por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão em HCl. As soluções padrão foram analisadas intercaladas às amostras. No caso de dúvida quanto aos picos correspondentes à histamina, a confirmação foi feita por meio da adição de quantidade conhecida de solução padrão da amina à amostra.

A quantificação de histamina foi realizada por interpolação em curva analítica externa e o valor encontrado na amostra multiplicado pelo fator de correção correspondente a esta amina.

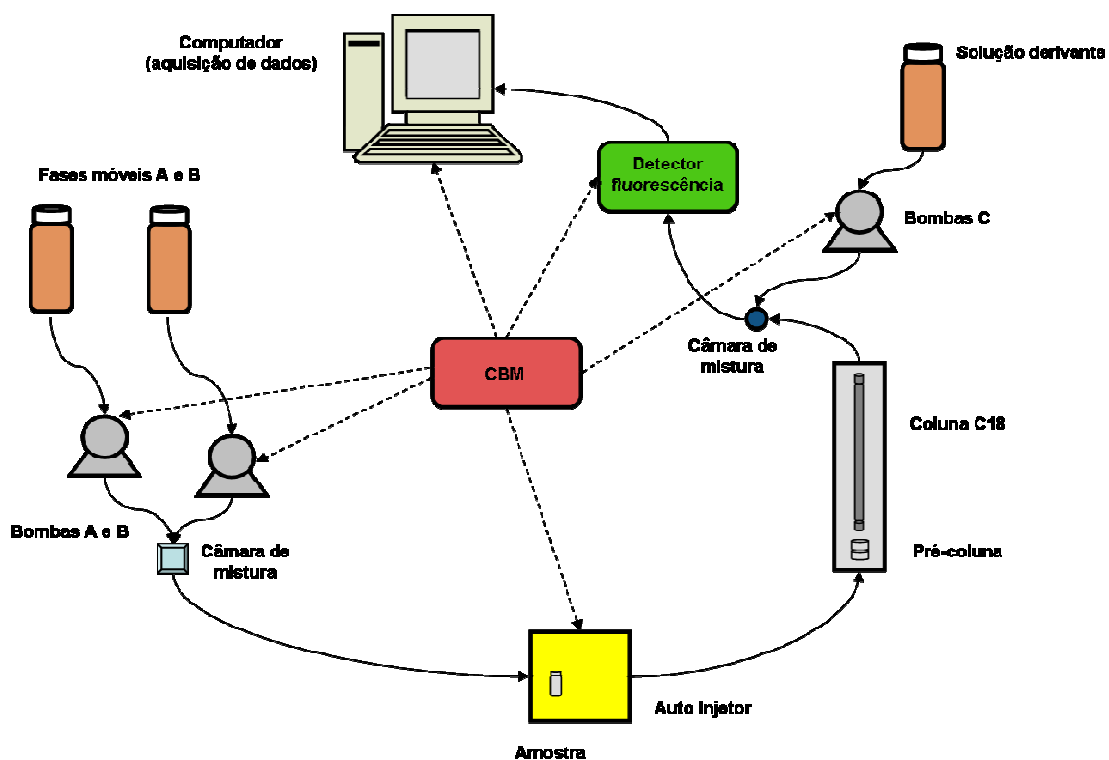


FIGURA 15. Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise de histamina.

2.2.3 Viabilidade da utilização de 1,3-diaminopropano como padrão interno na análise de histamina

Para avaliar a viabilidade da utilização do 1,3-diaminopropano como padrão interno, empregado no estudo de DUFLOS et al. (1999), adicionou-se à solução

padrão das dez aminas uma alíquota, de mesmo volume, da solução previamente preparada deste padrão interno.

Na realização do método descrito por DUFLOS et al. (1999), foram utilizados 50 µL de solução padrão de dez aminas e 50 µL de solução padrão do 1,3-diaminopropano, ambas em água, para a execução da etapa de derivação pré-coluna com cloreto de dansila. Para verificação de uma possível co-eluição com alguma das dez aminas, foram feitas adições sucessivas das soluções padrão das aminas suspeitas separadamente.

De maneira semelhante, foram feitas análises por CLAE com derivação pós-coluna e detecção espectrofluorimétrica (VALE & GLÓRIA, 1997) adicionando-se à solução padrão das dez aminas uma alíquota de mesmo volume da solução de 1,3-diaminopropano, preparadas em HCl. Havendo dúvidas sobre uma possível co-eluição deste padrão interno com alguma das dez aminas, foram adicionadas, separadamente, alíquotas das aminas suspeitas.

2.3 Validação de método para determinação de histamina em pescado

2.3.1 Condições cromatográficas

Foram testados diferentes gradientes com as soluções padrão e posteriormente com amostras de peixes para selecionar aquele que permitisse uma melhor resolução dos picos e em menor tempo de retenção.

2.3.2 Procedimentos de validação

Para a validação do método foram testados os seguintes parâmetros de desempenho do método: limite de detecção, linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão.

Linearidade: Foram realizados ensaios com soluções padrão (*pools*) para determinação da linearidade sem interferência da matriz e do limite de detecção do equipamento. Para a construção da curva analítica foram utilizadas soluções padrão de histamina, sendo cada uma injetada três vezes. Em seguida foi construído um

gráfico relacionando área do pico x concentração e, por regressão linear, definidas as equações das curvas e os coeficientes de correlação.

Limite de detecção: Foram injetadas alíquotas da solução padrão de baixa concentração por 10 vezes e, baseado no parâmetro t do teste de Student, foi calculado o limite de detecção (INMETRO, 2007).

Limite de quantificação: Foi calculado por meio do desvio padrão obtido para se calcular o limite de detecção, multiplicando-o por 10 (INMETRO, 2007).

Seletividade: Avaliou-se a capacidade do método de determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes presentes na matriz, isto com o preparo de amostras adicionadas do padrão. Foram observados a resolução do pico de histamina e os picos interferentes em concordância entre os tempos de retenção e sinais (áreas dos picos) dos mesmos.

Exatidão e precisão: A exatidão e a precisão do método foram calculadas por meio da recuperação média (exatidão) e coeficientes de variação (precisão) das amostras (matriz) adicionadas de concentrações conhecidas de padrão.

2.4 Determinação de histamina em amostras de pescado do mercado consumidor de Belo Horizonte

Foram coletadas amostras de atum fresco e enlatado do mercado consumidor de Belo Horizonte para avaliação do teor de histamina presente, de acordo com o método validado. Três lotes de cada marca de atum enlatado foram analisados, totalizando 54 amostras. Devido à dificuldade de aquisição no mercado, os teores de histamina foram determinados em apenas 5 amostras de atum fresco, em triplicata.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os métodos utilizados para o tratamento estatístico dos resultados foram Análise de Variância (ANOVA fator único), Teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 2000), teste de Grubbs (GRUBBS, 1969) e de Dixon (BURKE, 2001). A análise dos efeitos das variáveis sobre o processo de extração de histamina em pescado foi realizada utilizando o módulo ADX do SAS[®], versão 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da análise de histamina, segundo o delineamento fatorial completo com 16 ensaios e 5 repetições no ponto central, realizado para otimizar as condições de extração de histamina em pescado. As variáveis independentes analisadas foram o tempo de agitação; o tempo, a velocidade e a temperatura de centrifugação; e a variável de resposta como a recuperação de histamina adicionada na amostra. A recuperação desta amina foi afetada pelas variáveis estudadas, apresentando percentuais de recuperação que variaram de 74,53 a 87,44 % para as condições de extração avaliadas.

TABELA 6. Matriz do planejamento experimental realizado para as variáveis independentes com a resposta em percentual de recuperação

Tratamento	Tempo de agitação (s)	Tempo de centrifugação (min)	Velocidade de centrifugação (x g)	Temperatura de centrifugação (°C)	Recuperação (%)
1	20	3	1500	0	82,70
2	120	3	1500	0	81,52
3	20	21	1500	0	87,44
4	120	21	1500	0	76,50
5	20	3	21000	0	78,47
6	120	3	21000	0	77,14
7	20	21	21000	0	78,12
8	120	21	21000	0	81,72
9	20	3	1500	6	85,44
10	120	3	1500	6	80,46
11	20	21	1500	6	86,67
12	120	21	1500	6	79,93
13	20	3	21000	6	79,95
14	120	3	21000	6	80,68
15	20	21	21000	6	77,08
16	120	21	21000	6	78,11
17	70	12	11250	3	75,89
18	70	12	11250	3	74,53
19	70	12	11250	3	80,52
20	70	12	11250	3	77,48
21	70	12	11250	3	76,58

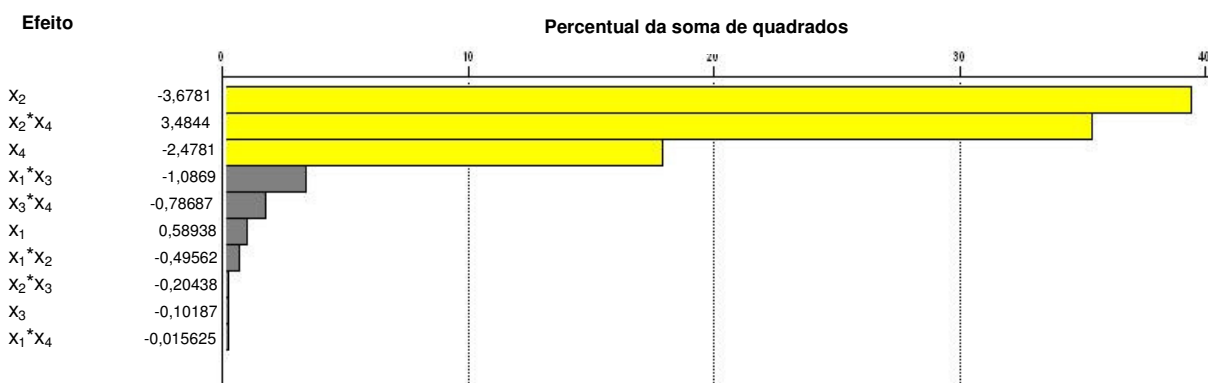
A influência das variáveis durante a etapa de extração foi confirmada pelos resultados da análise de variância para a recuperação de histamina em pescado (Tabela 7), submetido a diferentes condições de extração. A análise do teste F para a regressão indicou que as variáveis independentes influenciaram significativamente a variável de resposta.

TABELA 7. Análise de variância para a recuperação de histamina em pescado

FONTES DE VARIACÃO	MODELO COMPLETO					MODELO PREDITIVO				
	GL	SQ	QM	F	p > F	GL	SQ	QM	F	p > F
Regressão	10	274,0516	27,40516	3,680914	0,003628	3	254,4846	84,8282	13,13363	0,0001
Resíduo	26	193,5753	7,445205			33	213,1423	6,458857		
Falta de ajuste	6	131,5217	21,92028	7,064944	0,00038	1	60,71963	60,71963	12,74763	0,001151
Erro puro	20	62,05365	3,102682			32	152,4226	4,763207		
Total	36	467,6269				36	467,6269			

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: quadrados médios.

No Diagrama de Pareto (Figura 16), observa-se que as variáveis independentes que mais contribuíram para o percentual da soma de quadrados foram o tempo e a temperatura de centrifugação. O maior percentual foi relativo ao tempo de centrifugação (37%), em seguida à temperatura (34%) e à interação entre eles (25%), totalizando aproximadamente 96% desta fonte de variação.



X_1 : tempo de agitação, X_2 : tempo de centrifugação, X_3 : velocidade de centrifugação, X_4 : temperatura de centrifugação.

FIGURA 16. Percentual da soma de quadrados das variáveis independentes e suas interações.

Os efeitos das variáveis e das interações entre elas no processo de extração estão descritos na Tabela 8. Pode ser visualizado que as variáveis tempo de agitação e velocidade de centrifugação, bem como as interações em que estas estão presentes, não foram estatisticamente significativas na faixa de estudo estabelecida. Por outro lado, observou-se um efeito estatisticamente significativo das variáveis tempo e temperatura de centrifugação, bem como a interação entre estas, sobre o percentual de recuperação, ao nível de 95% de confiança.

TABELA 8. Efeito das variáveis de agitação e centrifugação na recuperação de histamina

VARIÁVEIS	MODELO COMPLETO				MODELO PREDITIVO			
	Efeito	Erro padrão	t	p > t	Efeito	Erro padrão	t	p > t
X_1	0,589375	0,964702	0,61094	0,546544				
X_2	-3,67813	0,964702	-3,8127	0,000761	-3,67813	0,898531	-4,09349	0,000258
X_3	-0,10187	0,964702	-0,1056	0,916708				
X_4	-2,47813	0,964702	-2,5688	0,016295	-2,47813	0,898531	-2,75798	0,009408
$X_1 * X_2$	-0,49562	0,964702	-0,51376	0,611759				
$X_1 * X_3$	-1,08688	0,964702	-1,12664	0,270185				
$X_1 * X_4$	-0,01562	0,964702	-0,0162	0,987201				
$X_2 * X_3$	-0,20438	0,964702	-0,21185	0,833874				
$X_2 * X_4$	3,484375	0,964702	3,611865	0,001275	3,484375	0,898531	3,877859	0,000475
$X_3 * X_4$	-0,78687	0,964702	-0,81567	0,422101				

X_1 : tempo de agitação, X_2 : tempo de centrifugação, X_3 : velocidade de centrifugação, X_4 : temperatura de centrifugação.

Analisando-se as variáveis independentes significativas, nota-se que estas influenciaram negativamente a variável de resposta, ou seja, a recuperação obtida é inversamente proporcional ao aumento do tempo e da temperatura de centrifugação (Figura 17). A interação entre estas variáveis, portanto, exerceu influência positiva na recuperação. Trabalhando-se com estas duas variáveis em conjunto, obteve-se uma melhor resposta na faixa estudada.

Para a realização do estudo da interação, as variáveis estatisticamente não significativas tempo de agitação e velocidade de centrifugação foram fixadas em 70 s e 11250 x g, respectivamente. O efeito positivo da interação entre o tempo e a temperatura de centrifugação no aumento da recuperação de histamina está

disposto na Figura 18. Uma diminuição dos valores de tempo e temperatura de centrifugação, simultaneamente, acarretou em uma aproximação da curva de recuperação para valores máximos na faixa estudada.

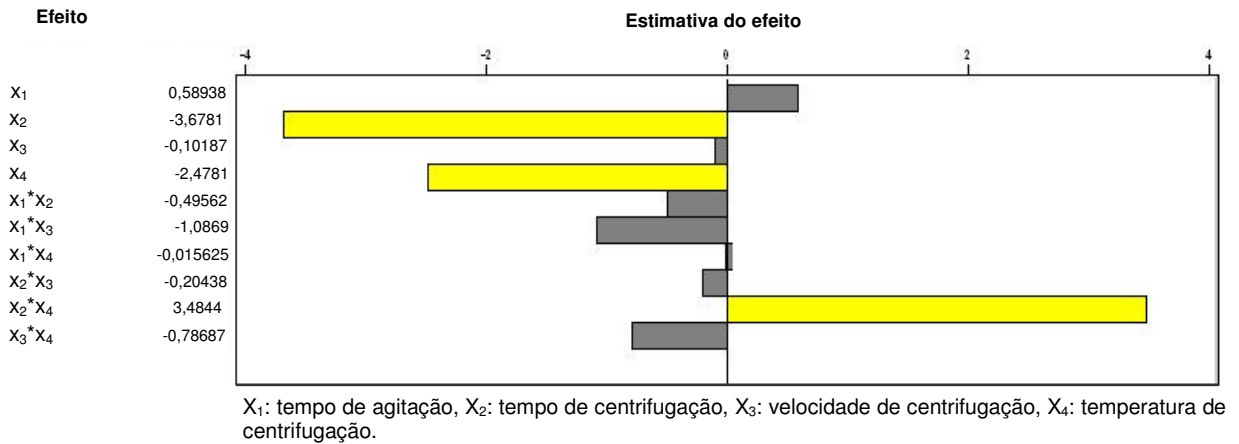


FIGURA 17. Estimativa do efeito das variáveis no processo de extração de histamina em pescado.

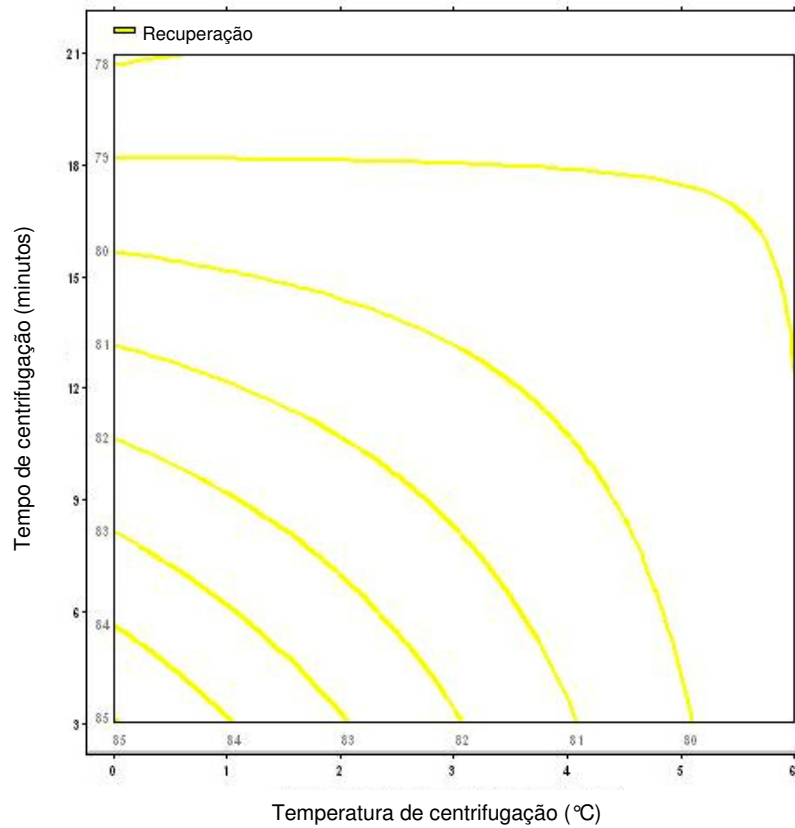
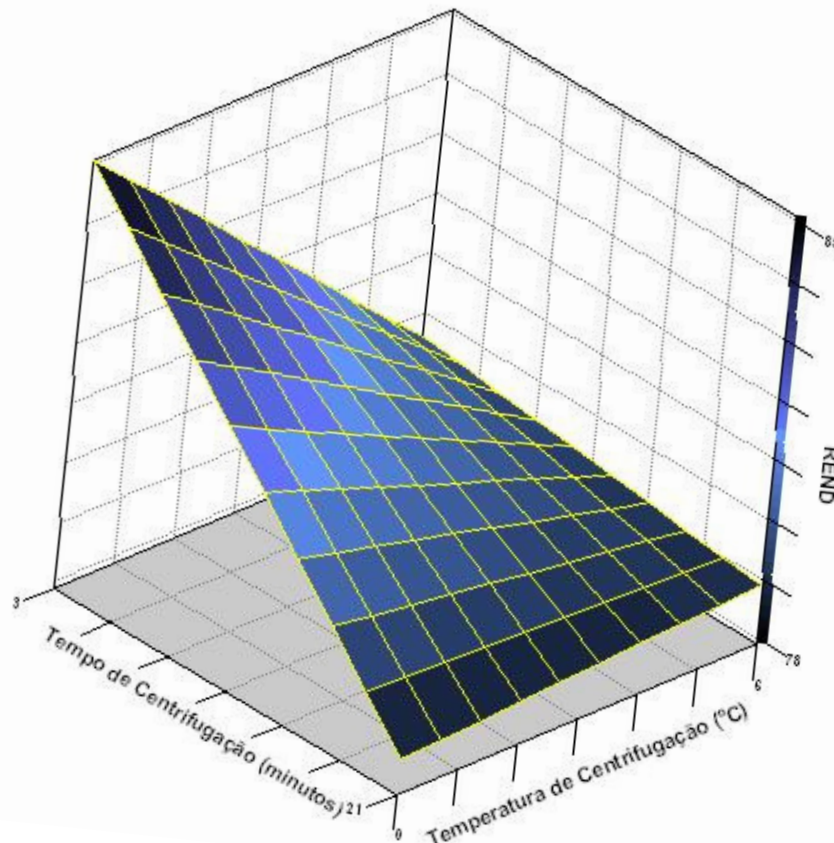


FIGURA 18. Interação entre tempo e temperatura de centrifugação para avaliação da recuperação.

Os coeficientes de regressão para a recuperação de histamina foram estabelecidos a partir da análise dos efeitos das variáveis significativas, a equação do modelo ajustada (1) e a superfície de resposta gerada (Figura 19).

$$\text{Recuperação (\%)} = 86,25487 - 0,397917 \cdot X_2 - 1,187326 \cdot X_4 + 0,064525 \cdot X_2 \cdot X_4 \quad (1)$$

Em que: X_2 = tempo de centrifugação, X_4 = temperatura de centrifugação



Valores fixos: Tempo de agitação = 70 s

Velocidade de centrifugação = 11250 x g

FIGURA 19. Superfície de resposta para otimização da recuperação de histamina em função do tempo e temperatura e centrifugação.

O coeficiente de determinação fornece uma informação auxiliar para verificar se o modelo proposto é adequado ou não para descrever o fenômeno, relacionando-se à significância da falta de ajuste na análise de variância (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Os coeficientes de determinação para a equação foram de 58,60 e 54,42 % para os modelos completo e predito, respectivamente; e a falta de ajuste foi

significativa a 95 % de confiança. Em virtude disso, um novo modelo poderia ser proposto, ampliando-se as faixas estabelecidas para as variáveis significativas. Teoricamente, temperaturas mais baixas e menores tempo de centrifugação iriam melhorar a recuperação da histamina. Entretanto, trabalhar com temperaturas inferiores a 0 °C durante a centrifugação provavelmente congelaria a amostra, inviabilizando o processo. Além disso, um tempo de centrifugação inferior a 3 minutos não seria efetivo para alcançar a velocidade de centrifugação fixada e separar o sobrenadante da amostra sólida.

A análise dos resultados do planejamento fatorial completo (16 ensaios e 5 repetições no ponto central) definiu a condição ótima de extração, para o delineamento proposto e está apresentada na Tabela 9. Utilizando-se estas condições, além de uma melhor performance na extração, ocorrerá uma redução no tempo de análise de 90 para 30 minutos.

TABELA 9. Condição ótima para extração de histamina em pescado

VARIÁVEL	CONDIÇÃO ÓTIMA
Tempo de Agitação	70 s
Tempo de Centrifugação	3 min
Velocidade de Centrifugação	11250 x <i>g</i>
Temperatura de Centrifugação	0 °C

2 VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE 1,3-DIAMINOPROPANO COMO PADRÃO INTERNO NA ANÁLISE DE HISTAMINA

De acordo com DUFLOS et al. (1999), o 1,3-diaminopropano pode ser usado como padrão interno. Para verificação da viabilidade de utilização deste, foram adicionadas, individualmente, alíquotas de cada amina à solução padrão de 10 aminas e 1,3-diaminopropano (Figuras 20 e 21).

Observou-se (Figura 21) que a histamina não foi afetada pela presença do padrão interno, entretanto a feniletilamina co-eluiu com o mesmo no tempo de retenção de 12 minutos.

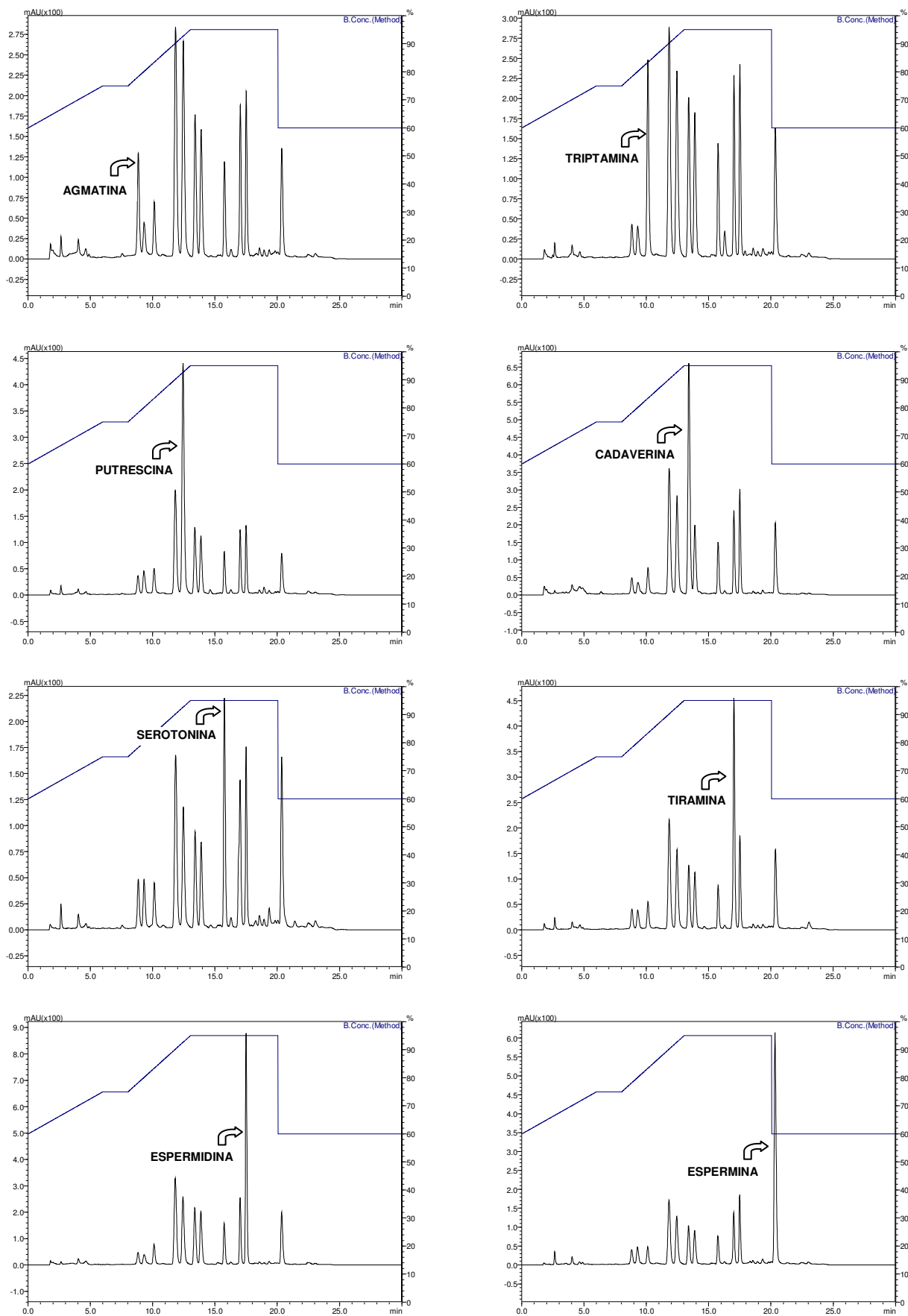


FIGURA 20. Cromatogramas da solução contendo padrão de aminas e 1,3-diaminopropano. Gradiente sugerido por DUFLOS et al (1999).

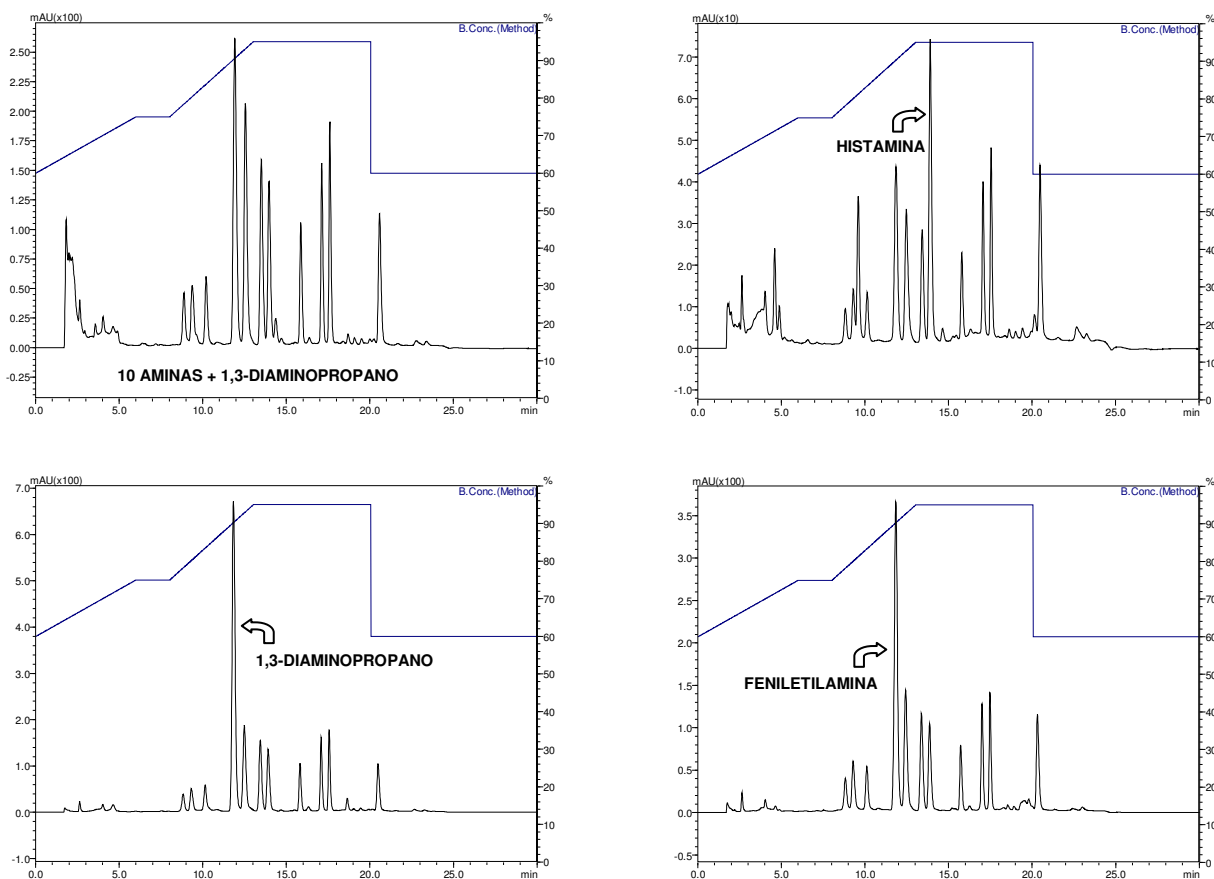


FIGURA 21. Cromatogramas da solução contendo padrão de aminas e 1,3-diaminopropano e verificação da co-eluição com a feniletilamina. Gradiente sugerido por DUFLOS et al (1999).

De acordo com COLINS et al. (2003), o padrão interno deve ser uma substância inexistente na amostra e que não co-elua com compostos da matriz. Desta forma, na condição sugerida por DUFLOS et al. (1999), este padrão não poderia ser utilizado. Com o objetivo de solucionar este problema, foram testados novos gradientes de eluição. Alguns destes estão exemplificados na Figura 22, com a representação dos percentuais de acetonitrila (fase B) utilizados. Dentre os gradientes testados, nenhum foi efetivo na separação do 1,3-diaminopropano e da feniletilamina. De acordo com GLÓRIA (2005), feniletilamina (0,1 a 8,1 mg/kg) foi encontrada em amostras de atum. Nota-se, assim, a importância da separação desta amina do 1,3-diaminopropano, para evitar a obtenção de valores superestimados do padrão interno. Uma vez que este é utilizado para o cálculo da razão de áreas (área correspondente à amina de interesse sobre a área do padrão interno), esta alteração poderá afetar o resultado.

No estudo realizado por DUFLOS et al. (1999), a feniletilamina não foi

analisada, ainda que as amostras pudessem conter esta amina.

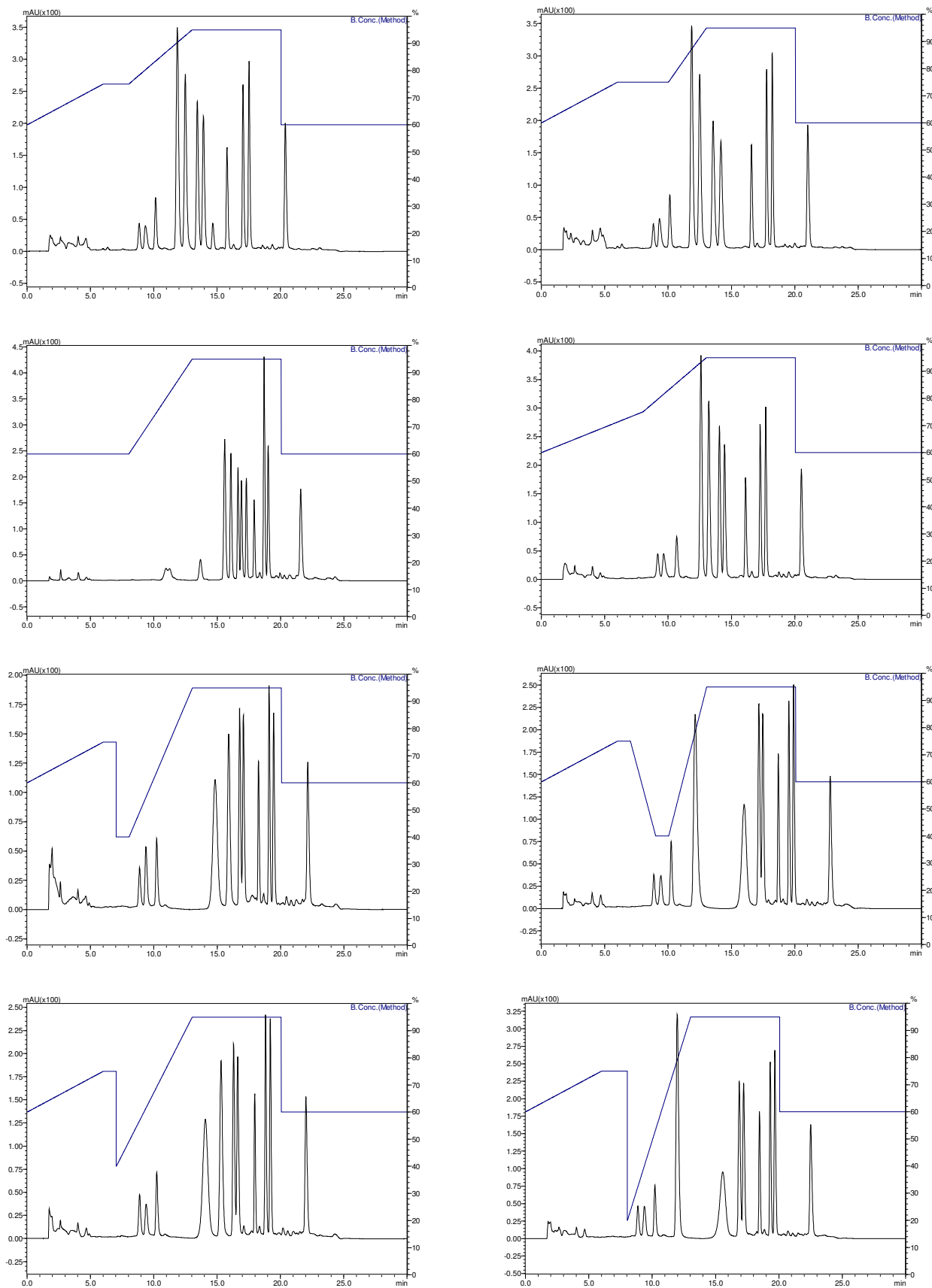


FIGURA 22. Gradientes de eluição propostos para a separação do padrão interno.

De maneira semelhante, a viabilidade da utilização do padrão interno foi avaliada para a análise por CLAE com derivação pós-coluna e detecção espectrofluorimétrica e a verificação de co-eluição realizada, conforme exposto na Figura 23. Inicialmente, foram comparados, em um gradiente de eluição estabelecido para a análise das dez aminas, o padrão destas com e sem a adição do 1,3-diaminopropano, observando-se a co-eluição do mesmo com putrescina e cadaverina. Com o emprego de outro gradiente de eluição, no tempo total de análise de 30 minutos, em que a cadaverina foi separada da putrescina, foram utilizadas soluções de padrão interno e deste com adição de putrescina, confirmando a co-eluição.

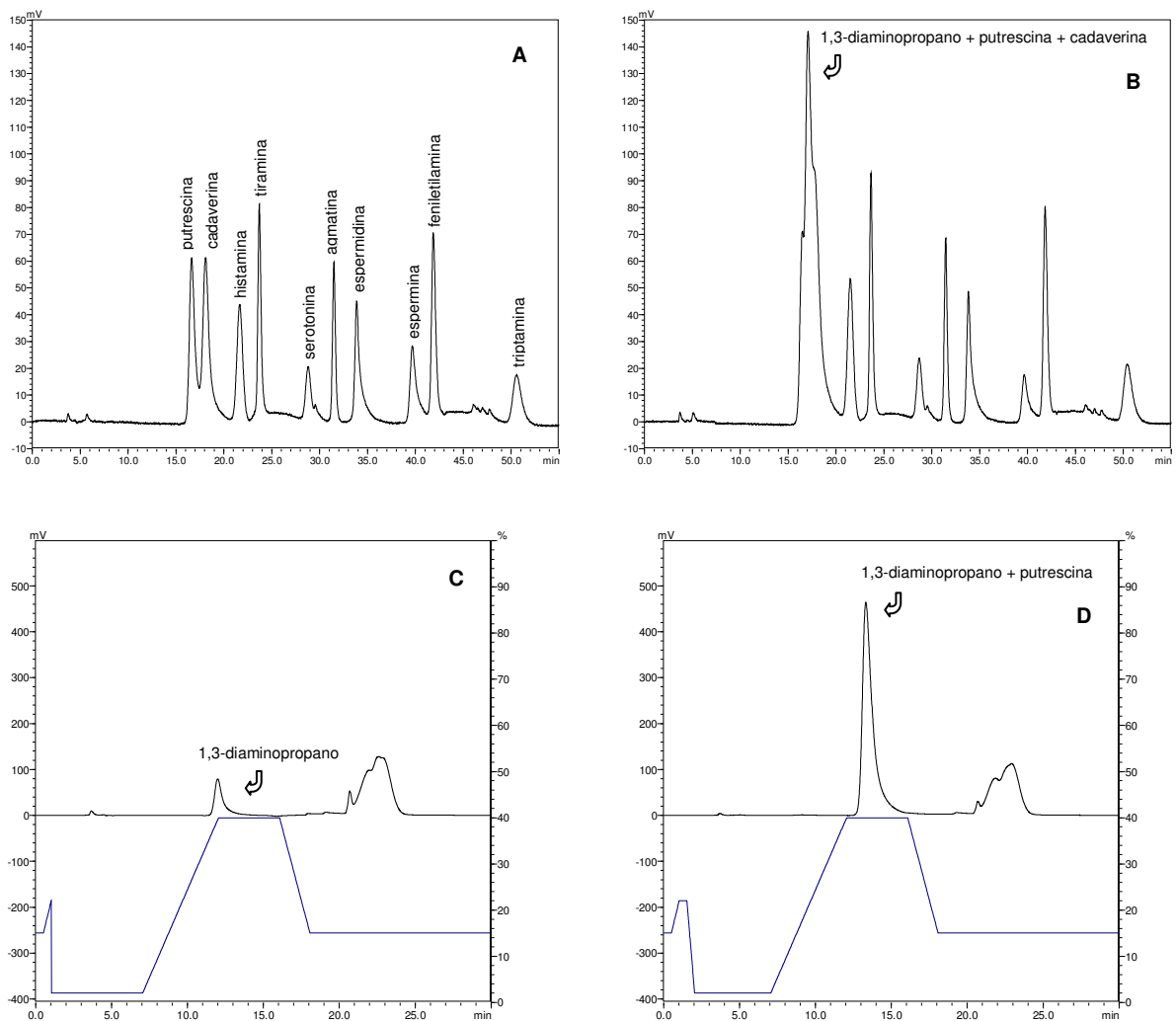


FIGURA 23. Cromatogramas das análises dos padrões das 10 aminas (A), com adição de 1,3-diaminopropano (B), do padrão interno isoladamente (C) e adicionado de putrescina (D).

Para solucionar o problema, foram propostos vários gradientes, e alguns deles estão apresentados, com os percentuais de acetonitrila esquematizados na Figura 24. Porém, dentre as condições de separação testadas, nenhum gradiente de eluição foi efetivo. Como a putrescina, precursora das poliaminas, está naturalmente presente em baixos níveis no pescado (GLÓRIA, 2005), a finalidade do uso do padrão interno não seria atendida, uma vez que os teores desta amina, bem como de outras analisadas, estariam subestimados.

Embora as estruturas químicas da feniletilamina e do 1,3-diaminopropano sejam diferentes, na análise por CLAE detecção no UV (DUFLOS et al., 1999), a substância separada na coluna não é a amina, mas o derivado formado após reação com cloreto de dansila, apresentando possivelmente a mesma afinidade durante a eluição. No entanto, no método de análise por CLAE com detecção espectrofluorimétrica (VALE & GLÓRIA, 1997), a eluição na coluna ocorre antes da derivação com *o*-ftalaldeído, havendo, então, a separação da amina e não de seu derivado. Por apresentarem estruturas químicas semelhantes, diferindo-se apenas em um grupo CH₂, a coeluição foi observada, para este método, entre o padrão interno e a putrescina (diaminobutano).

Com base nos argumentos expostos, pode-se afirmar que, na faixa de gradiente estudada e nas condições de análise propostas para os dois métodos, torna-se inviável a utilização do 1,3-diaminopropano como padrão interno na determinação de histamina em pescado.

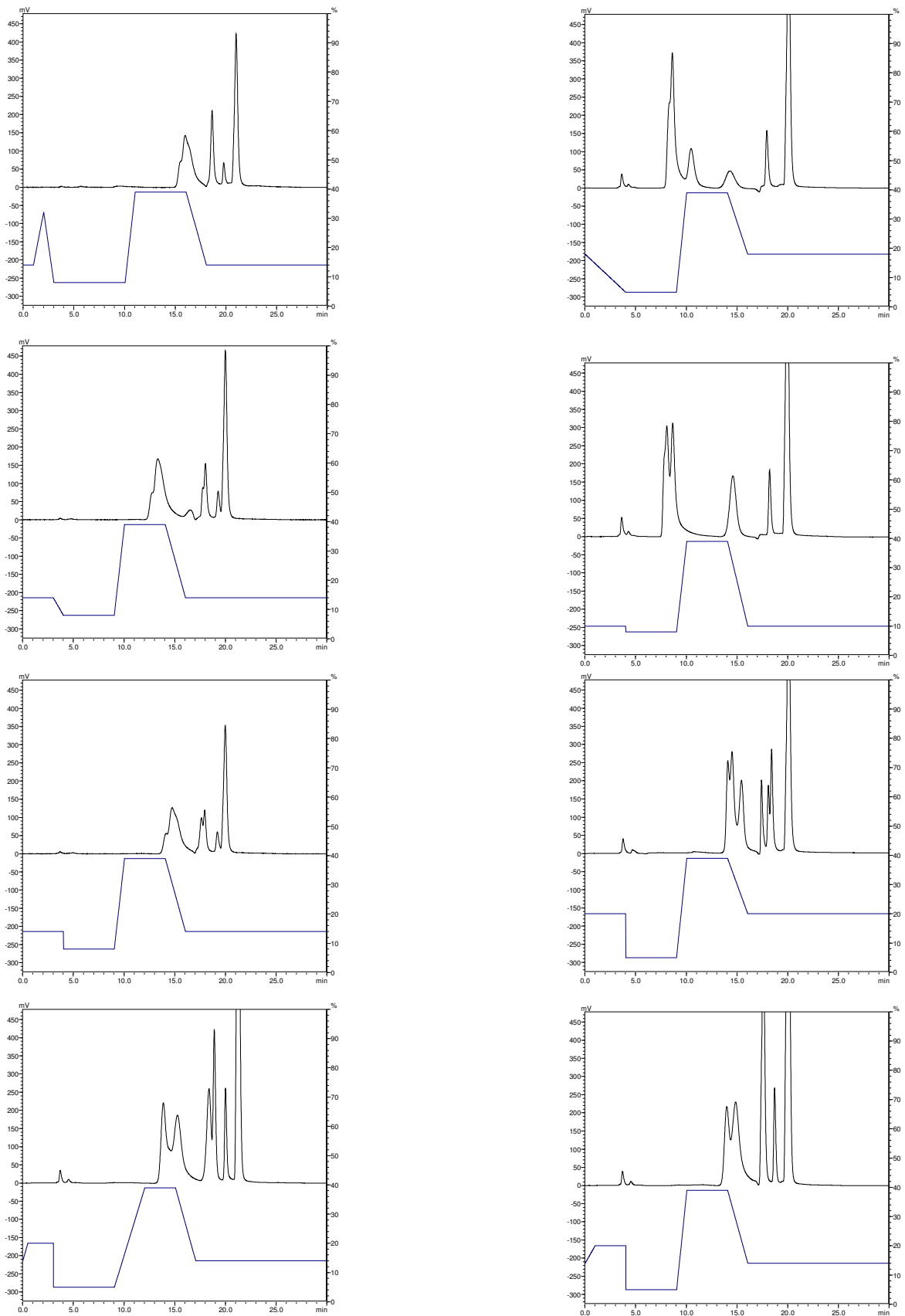


FIGURA 24. Gradientes de eluição propostos para separação do 1,3-diaminopropano.

3 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO

Para a comparação dos métodos de análise de histamina em pescado descritos por DUFLOS et al. (1999) e adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), inicialmente foram construídas as curvas analíticas da amina nos respectivos solventes, água e HCl 0,1 mol/L, e adicionada à matriz. As equações e os coeficientes de determinação para as curvas analíticas estão apresentados na Figura 25. Observa-se que a sensibilidade de detecção de pequenas variações na concentração de histamina foi maior para a curva analítica do segundo método. A diferença na sensibilidade (inclinação da curva analítica) demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (INMETRO, 2007) e possivelmente se deve ao tipo de detector empregado, uma vez que o de fluorescência é mais sensível que o de detecção no UV.

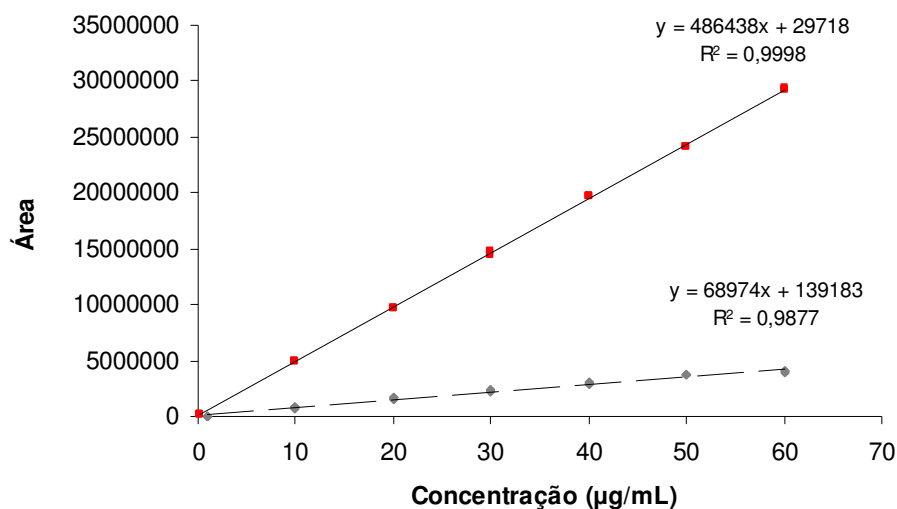


FIGURA 25. Curvas analíticas do padrão de histamina no solvente pelos métodos de DUFLOS et al. (1999) e adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), representadas pelas linhas (- - - -) e (-----), respectivamente.

Construindo-se as curvas analíticas da histamina adicionada à matriz e comparando-as com aquelas obtidas por meio da amina no solvente, nota-se que, no método adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), os coeficientes angular e linear

apresentaram valores semelhantes, indicando não haver interferência da matriz (Figura 26). Por outro lado, observa-se o efeito da matriz sobre a resposta ao se analisar visualmente as curvas analíticas obtidas pelo método de DUFLOS et al. (1999). Esta discrepância revela que, devido à complexidade da matriz, algumas interações podem ocorrer (DUFLOS et al., 1999), gerando resíduos que afetam significativamente a análise, alterando a concentração final de histamina. Possivelmente, os resíduos foram formados durante a extração da histamina com ácido perclórico, mantendo-se na etapa de derivação com cloreto de dansila e interferindo na determinação desta amina.

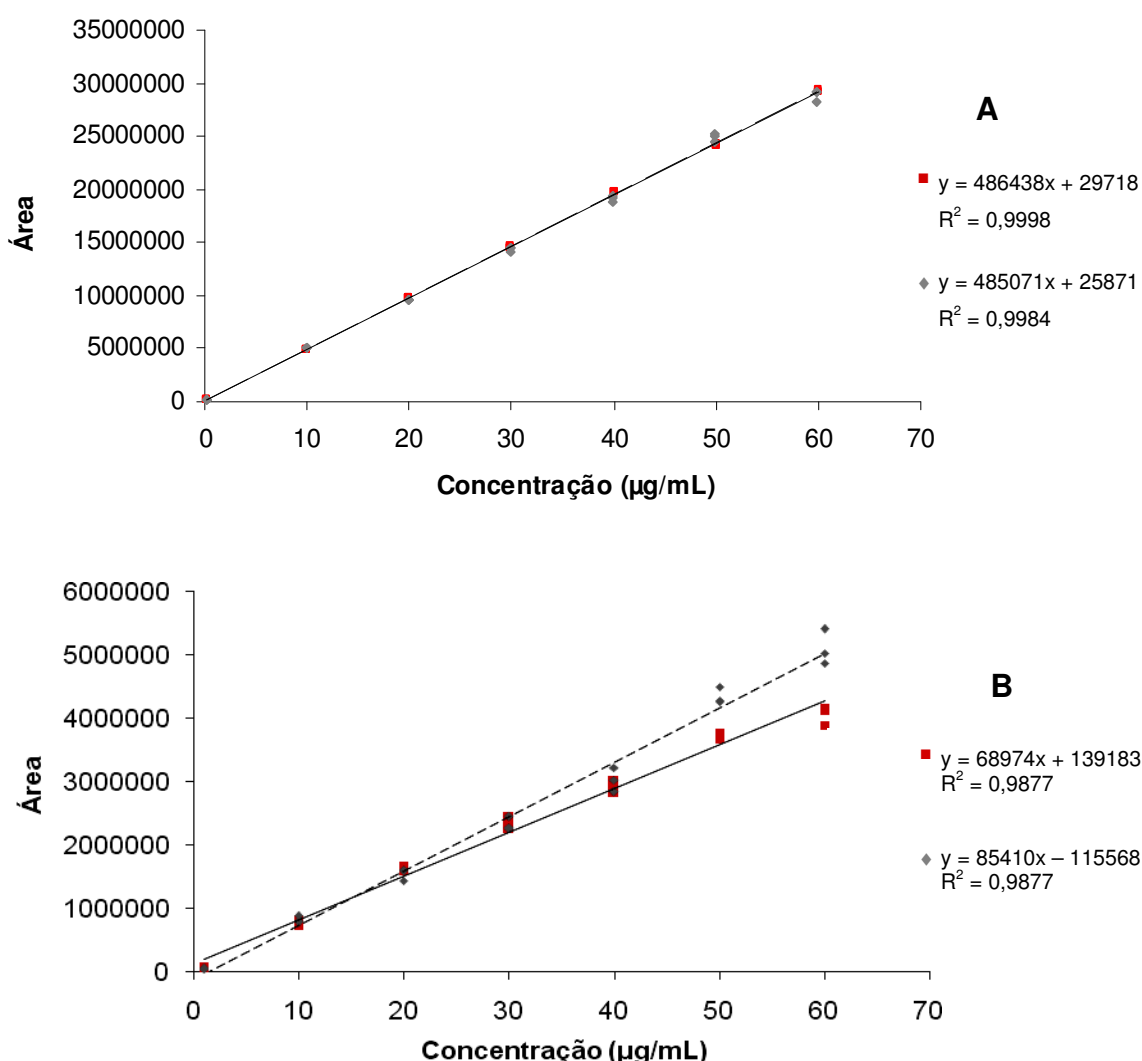


FIGURA 26. Linhas de regressão obtidas para a histamina no solvente (-----) e adicionada à matriz (- - - -), pelo método adaptado de VALE & GLÓRIA (1997) – A, e de DUFLOS et al. (1999) – B.

Na Figura 27 estão apresentados quatro cromatogramas referentes às análises de histamina (concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$) nos solventes, água e HCl 0,1 mol/L, e adicionada à matriz. Observa-se que no cromatograma B as substâncias presentes na amostra não interferiram na separação da histamina. Entretanto, nota-se a presença de diversos picos no cromatograma D ao compará-lo com o C, confirmando o efeito mostrado na Figura 26B. Além disso, os cromatogramas B e D diferiram entre si com relação à presença dos picos, uma vez que no primeiro havia menor número destes, que não interferiram na separação, para uma mesma amostra. Isto se deve à capacidade do DnsCl em reagir com mais compostos (CUSTÓDIO, 2006), ao contrário do OPA que possui maior seletividade por aminas primárias (REUVERS et al., 1986).

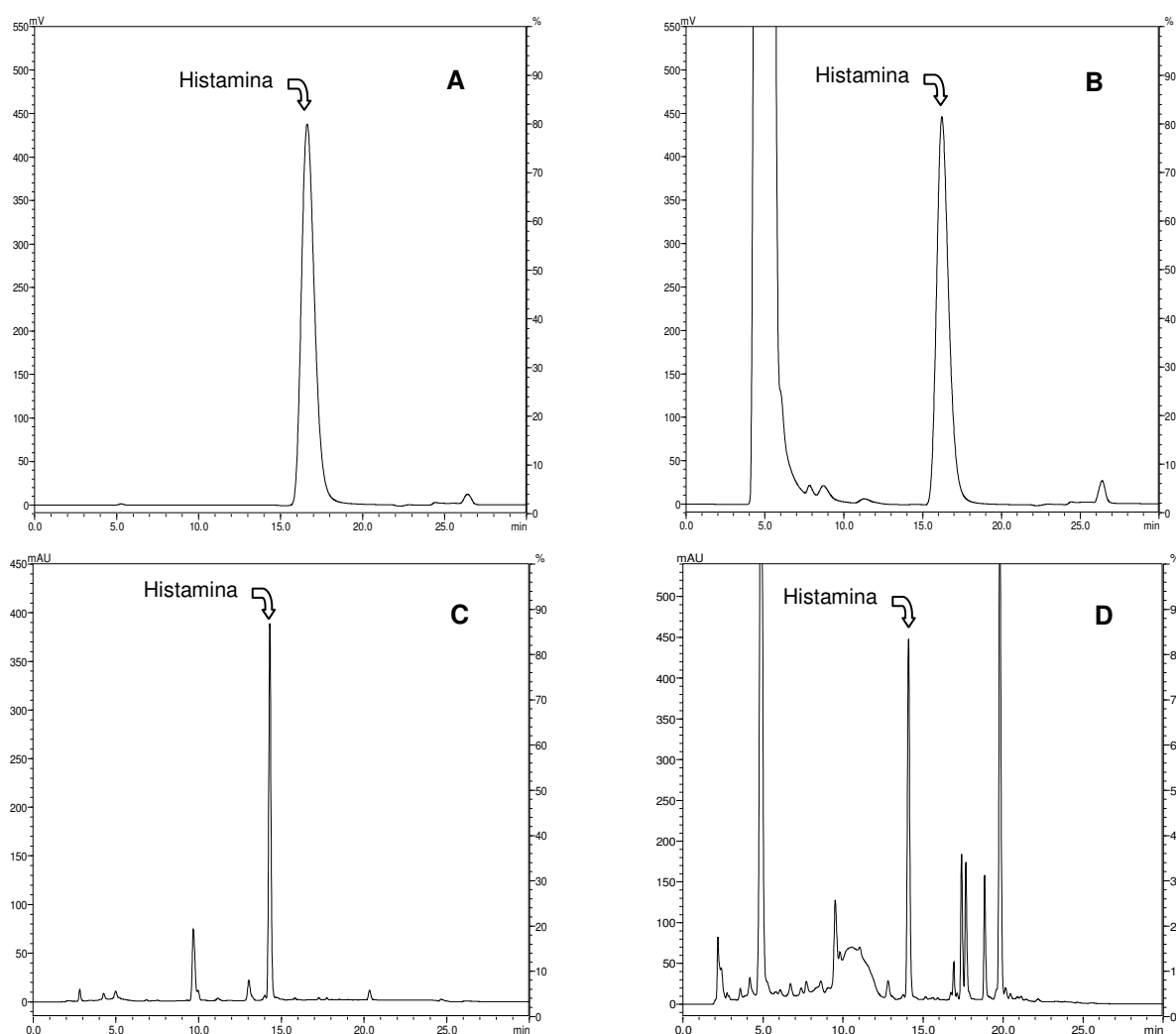


FIGURA 27. Cromatogramas obtidos nas análises de histamina nos solventes (A, C) e adicionada à matriz (B, D) pelo método adaptado de VALE & GLÓRIA (1997) – A e B, e segundo DUFLOS et al. (1999) – C e D.

Em virtude da existência do efeito da matriz para o método de derivação pré-coluna e detecção no UV, a curva analítica utilizada para avaliação da recuperação de histamina foi aquela em que houve a adição da amina à amostra. Na Figura 28 estão representados os percentuais médios de recuperação obtidos pelos métodos de DUFLOS et al. (1999) e do adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), com valores de 79,5 e 92,6%, respectivamente; sendo significativamente diferentes entre si, ao nível de 5 % de probabilidade. O método de derivação pós-coluna e detecção fluorimétrica também apresentou melhores resultados de desvio-padrão, 1,28 contra 7,03; e de coeficiente de variação, 1,38 % contra 8,84 %. Estes valores enquadram-se aos estabelecidos pelo CODEX (1993) para a faixa de concentração avaliada. As perdas na recuperação pelo método de DUFLOS et al. (1999), possivelmente, são originadas da extração com ácido perclórico e da derivação pré-coluna. A extração com ácido perclórico proposta pelo autor ocorre em uma única etapa, podendo ser insuficiente para uma melhor recuperação da histamina em pescado. A derivação pré-coluna também torna-se uma fonte de perdas na recuperação, uma vez que há manipulação excessiva da amostra com possibilidade de erros.

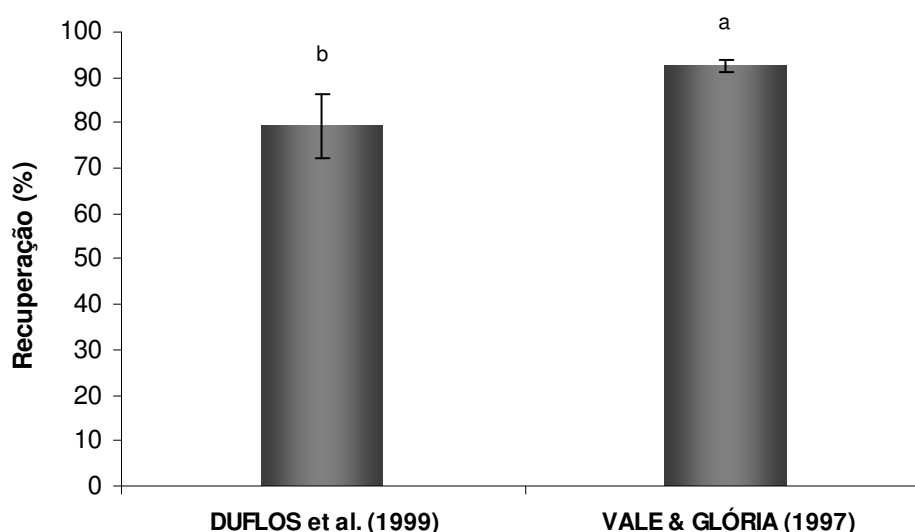


FIGURA 28. Percentuais médios de recuperação de histamina obtidos pelos métodos de DUFLOS et al. (1999) e adaptado de VALE & GLÓRIA (1997). Colunas com letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Com base nas vantagens apresentadas pelo método adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), verificou-se que este foi mais apropriado à análise de histamina em pescado, sendo este o método escolhido para validação.

4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO

4.1 Condições cromatográficas

As condições ótimas de operação do cromatógrafo líquido aplicadas à determinação de histamina em pescado, adaptada de VALE & GLÓRIA (1997), foram definidas de forma a se obterem, nas diferentes concentrações empregadas desta amina, picos nítidos, separados das demais aminas em estudo (putrescina, cadaverina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina e triptamina) e em um tempo menor de retenção.

Para resolução ótima da histamina no solvente e na matriz, foram utilizados os comprimentos de onda de 340 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente, na sensibilidade baixa do detector de fluorescência. A solução derivante foi bombeada a uma taxa de 0,3 mL/min. As fases móveis tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio (fase A) e acetonitrila (fase B) foram combinadas, em um sistema de gradiente de eluição a uma taxa de 0,5 mL/min, conforme esquematizado na Figura 29.

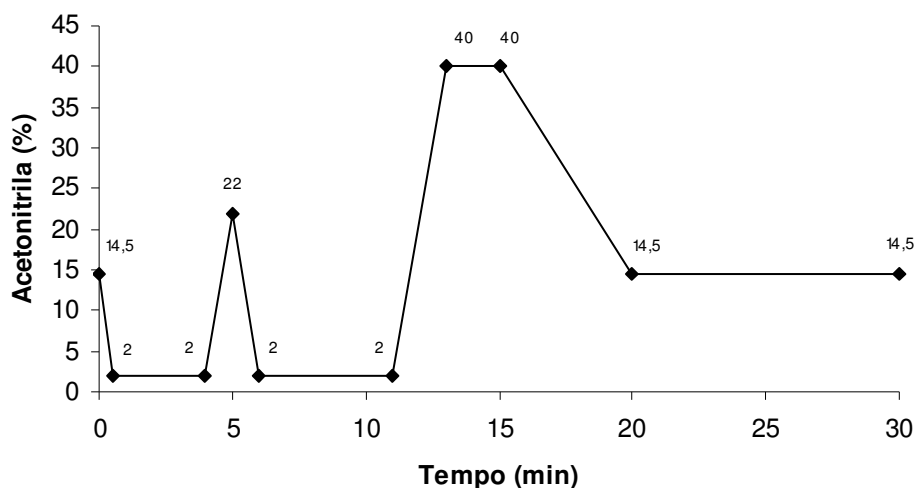


FIGURA 29. Gradiente de eluição empregado na determinação de histamina em pescado.

Conforme exposto na Figura 30, por meio do gradiente de eluição selecionado obteve-se boa separação da histamina, distinguindo-a das demais, quando adicionadas à matriz.

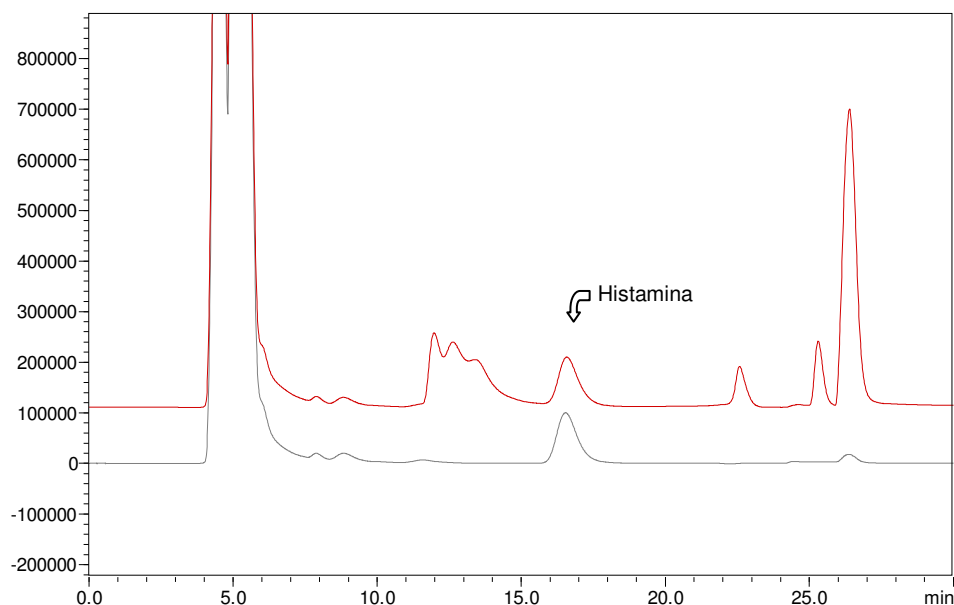


FIGURA 30. Cromatogramas da histamina (—) e das dez aminas (—) adicionadas à matriz, na concentração final de 10 µg/mL.

4.2 Parâmetros de validação

4.2.1 Linearidade

As curvas analíticas da histamina no solvente, obtidas na avaliação da linearidade na faixa de 0,2 a 60 µg/mL, em três dias diferentes, estão representadas na Figura 31. Segundo o INMETRO (2007), valores de coeficientes de correlação (r) acima de 0,90 são usualmente requeridos. Assim, os valores de coeficiente de determinação (R^2) e correlação comprovam que as três curvas são lineares no intervalo analisado.

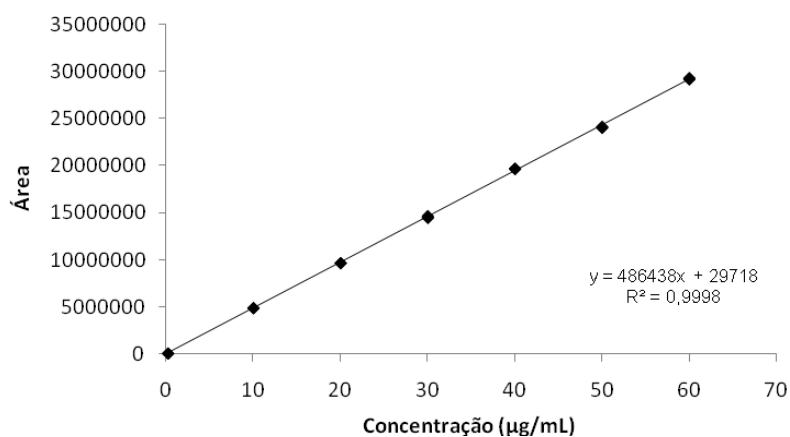
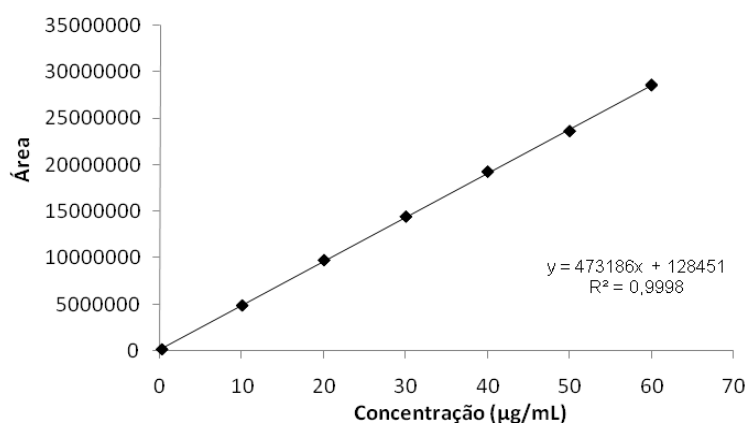
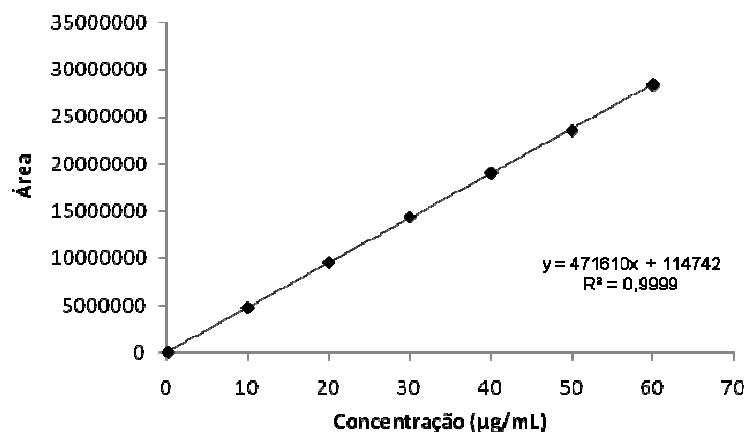


FIGURA 31. Curvas analíticas da histamina no solvente obtidas em dias diferentes, na faixa de 0,2 a 60 µg/mL.

Os resíduos da regressão foram calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela equação da reta, e seus valores estão apresentados na Figura 32, para os três dias diferentes de curva da histamina no solvente.

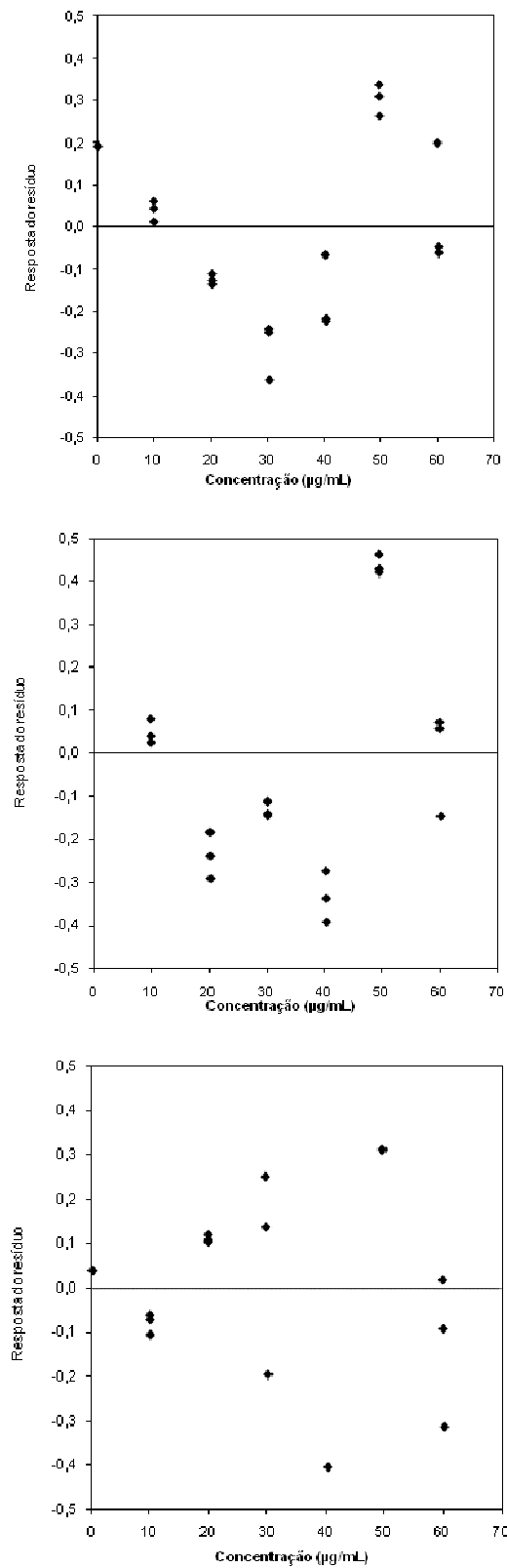


FIGURA 32. Resíduos da regressão para as três curvas analíticas da histamina no solvente.

Foram utilizados os testes de Grubbs (GRUBBS, 1969) e de Dixon (BURKE, 2001) a um nível de significância de 5 %, para avaliação de *outliers*, verificando a

ausência destes. Por meio do teste t de Student, observou-se a boa correlação dos dados, confirmando a linearidade das curvas.

4.2.2 Efeitos de matriz

Na Figura 33 está apresentada a curva analítica da histamina adicionada à matriz, na faixa de concentração de 0,2 a 60 µg/mL. O coeficiente de determinação foi de 0,9984 e, desta forma, o coeficiente de correlação foi igual a 0,9992, mostrando-se adequado ao estabelecido pelo INMETRO (2007) e indicando linearidade. Calculando-se t a partir do valor de r e comparando-o ao tabelado para o teste t de Student, confirmou-se que a curva apresenta linearidade no intervalo de dados avaliado.

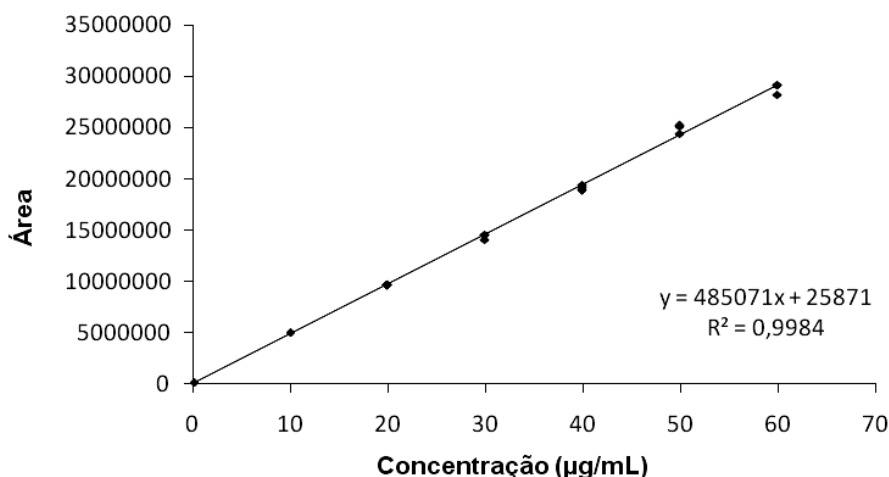


FIGURA 33. Curva analítica da histamina adicionada à matriz, na faixa de 0,2 a 60 µg/mL.

Os resíduos da regressão foram calculados e estão demonstrados na Figura 34 e a ausência de *outlier* foi verificada pelos testes de Grubbs (GRUBBS, 1969) e de Dixon (BURKE, 2001) a um nível de significância de 5%.

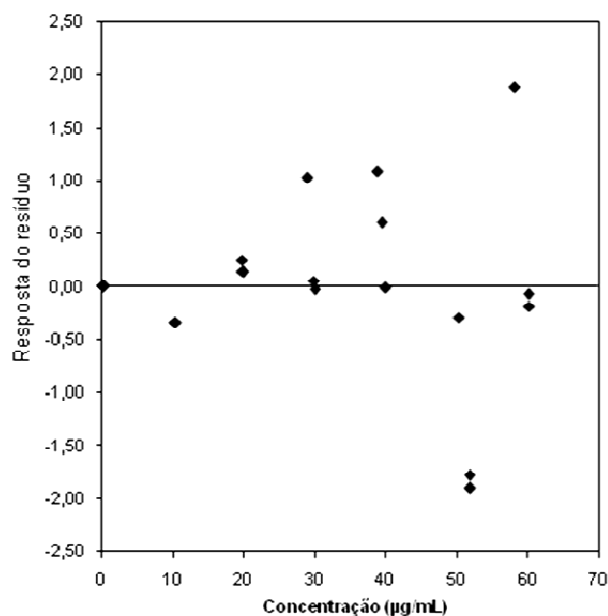


FIGURA 34. Resíduos da regressão da curva analítica da histamina adicionada à matriz.

Por meio da comparação das curvas analíticas da histamina no solvente e adicionada à matriz, apresentada na Figura 35, observou-se que a sobreposição destas, bem como a semelhança entre os valores de coeficientes angular e linear de ambas, indicam que não houve efeito da matriz sobre a curva da histamina.

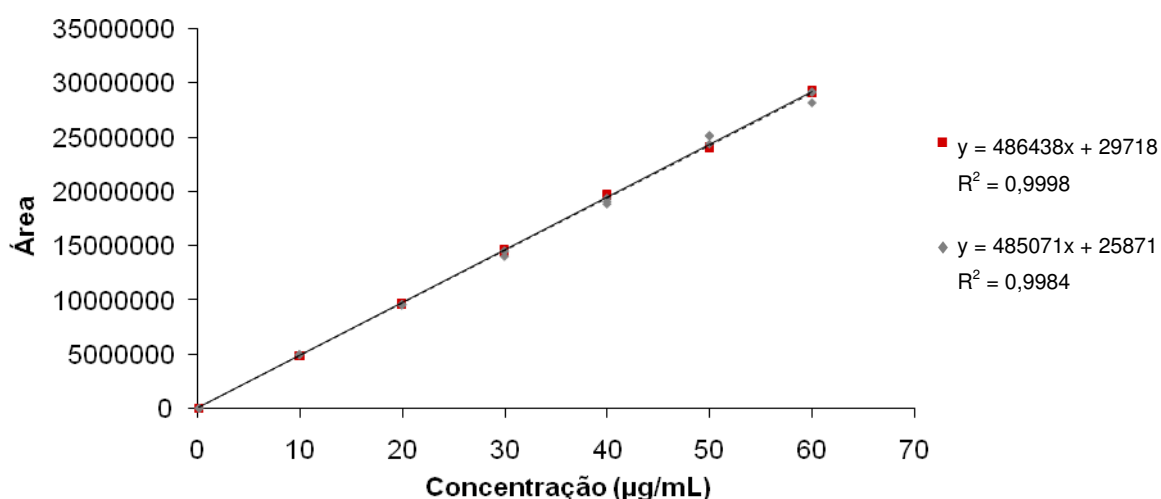


FIGURA 35. Curvas analíticas da histamina no solvente (-----) e adicionada à matriz (- - -) na faixa de 0,2 a 60 µg/mL.

4.2.3 Seletividade

Na Figura 36 estão apresentados os cromatogramas referentes às análises da histamina no solvente e adicionada à matriz, com concentração final de 30 µg/mL, e da amostra controle. Pode-se notar que a histamina não estava presente na amostra e, quando houve a adição da amina à matriz, a detecção ocorreu no mesmo tempo de retenção da amina no solvente, com boa resolução. Assim, devido à capacidade de se determinar especificamente a histamina na presença de outros componentes presentes na matriz, o método é considerado seletivo.

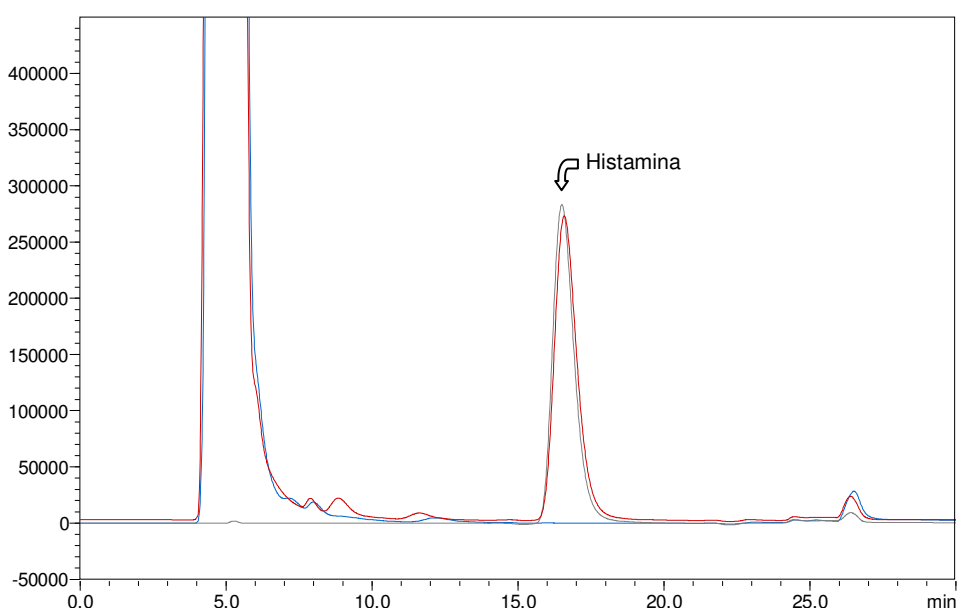


FIGURA 36. Cromatogramas da histamina no solvente (—) e adicionada à matriz (—), na concentração de 30 µg/mL, e da amostra controle (—).

4.2.4 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação do equipamento e do método estão apresentados na Tabela 10. Corrigindo-se os valores dos limites do equipamento de acordo com a recuperação da histamina no primeiro ponto da curva, na matriz, foram obtidos os valores de limite de detecção e quantificação do método.

TABELA 10. Limites de detecção e quantificação do equipamento e do método de determinação de histamina

	Limite de detecção (mg/kg)	Limite de quantificação (mg/kg)
Equipamento	0,19	0,64
Método	0,17	0,56

Pode-se observar na Figura 37 que a histamina, na concentração média de 0,83 mg/kg, foi visualizada nitidamente e quantificada por meio da equação linear obtida para a amina no solvente.

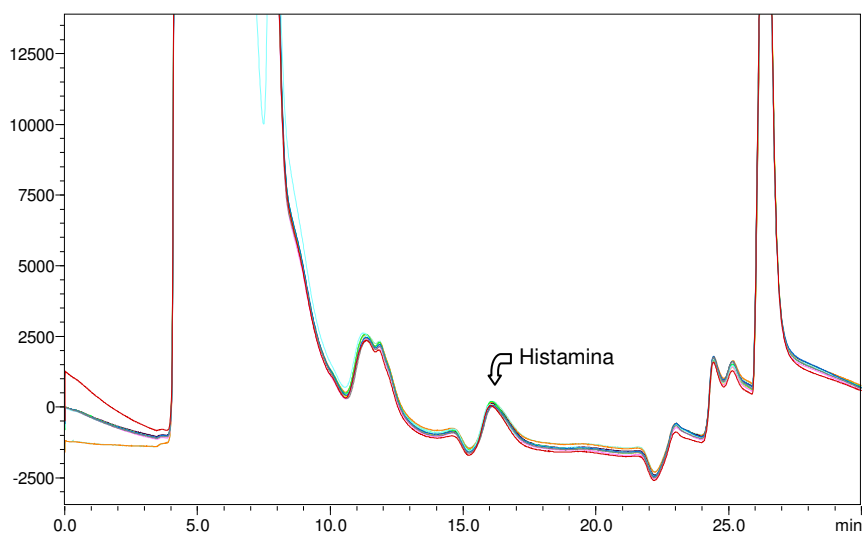


FIGURA 37. Cromatogramas da histamina adicionada à matriz, na concentração média final de 0,83 mg/kg.

4.2.5 Exatidão e precisão

As recuperações médias obtidas para as concentrações de histamina de 0,2; 30 e 60 µg/mL estão apresentadas na Tabela 11.

TABELA 11. Recuperações médias de histamina e coeficientes de variação obtidos para avaliação da exatidão e precisão

Concentração de histamina ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Coeficiente de variação (%)
0,2	87,01	3,23
30	84,99	3,19
60	87,79	0,95

Em virtude dos valores apresentados, o método de determinação de histamina em pescado mostrou-se exato e preciso, de acordo com os limites estabelecidos pelo CODEX (1993).

5 DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM AMOSTRAS DE PESCADO DO MERCADO CONSUMIDOR DE BELO HORIZONTE

De acordo com a descrição dos ingredientes e forma de processamento nos respectivos rótulos, as amostras de atum enlatado foram agrupadas em sólido ao natural em água e sal (SN, 3 marcas – A, B, C), ralado ao natural em água e sal (RN, 4 marcas – A, B, C, D), sólido em óleo comestível (SO, 3 marcas – B, C, D), ralado em óleo comestível (RO, 4 marcas - A, B, C, D), em molho de ervas (ME, 1 marca – C), em molho de tomate picante (MP, 1 marca – B) e em molho de tomate (MT, 2 marcas – B, C), conforme exemplificado na Figura 38.

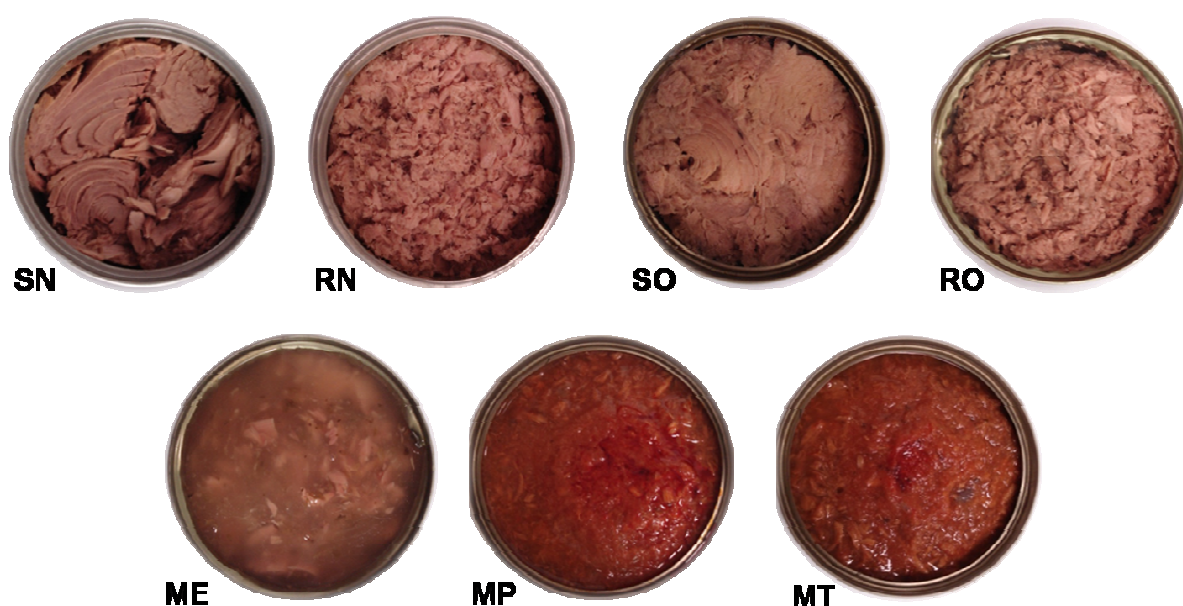


FIGURA 38. Amostras de atum enlatado adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, codificadas por tipo de processamento.

Os teores de histamina para os diferentes tipos de processamento de atum enlatado e suas respectivas marcas estão apresentados na Tabela 12. A concentração variou de não detectado a 83,73 mg/kg. Após análise de variância em blocos inteiramente casualizados, observou-se que não houve diferença significativa entre os tipos de processamento, bem como entre as diferentes marcas avaliadas. No entanto, houve diferença significativa entre os lotes ($p < 0,05$), dificultando o estabelecimento de correlação entre marcas e tipos de processamento.

TABELA 12. Teores de histamina em amostras de atum enlatado adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

AMOSTRA	MARCA	LOTE	TEOR DE HISTAMINA (mg/kg)
Atum sólido ao natural em água e sal	A	1	1,01
		2	0,45
		3	nd
	B	1	nd
		2	nd
		3	nd
	C	1	nd
		2	nd
		3	nd
Atum ralado ao natural em água e sal	A	1	nd
		2	nd
		3	nd
	B	1	0,82
		2	nd
		3	2,06
	C	1	nd
		2	0,59
		3	nd
	D	1	nd
		2	0,81
		3	nd
Atum sólido em óleo comestível	B	1	0,78
		2	nd
		3	nd
	C	1	nd
		2	nd
		3	nd
	D	1	11,06
		2	nd
		3	nd
Atum ralado em óleo comestível	A	1	56,02
		2	2,31
		3	nd
	B	1	3,64
		2	0,74
		3	nd
	C	1	35,14
		2	10,54
		3	4,42
	D	1	nd
		2	1,98
		3	nd
Atum em molho de ervas	C	1	nd
		2	nd
		3	nd
Atum em molho de tomate picante	B	1	2,05
		2	0,88
		3	0,91
Atum em molho de tomate	B	1	83,73
		2	9,33
		3	2,30
	C	1	1,19
		2	1,95
		3	3,28

nd: não detectado (valor menor que 0,56 mg/kg).

Das amostras de atum enlatado, 29 lotes apresentaram concentração de histamina abaixo do limite de quantificação do método (0,56 mg/kg). Dos lotes restantes (Figura 39) que apresentaram teores de histamina quantificáveis, 36 % eram de atum em molho (tomate e tomate picante), 48 % de atum ralado (32 % em óleo e 16 % ao natural) e 16 % de atum sólido (8 % em óleo e 8 % ao natural). Além de representarem o maior número de lotes contendo histamina, as amostras de atum em molho e ralado possuíam teores mais elevados desta amina, como pode ser visualizado na Figura 40. Estes percentuais elevados de histamina estão relacionados, possivelmente, à utilização de partes menos nobres do atum ou que não estivessem mantidas sob condições higiênico-sanitárias tão adequadas como as que foram destinadas ao produto sólido.

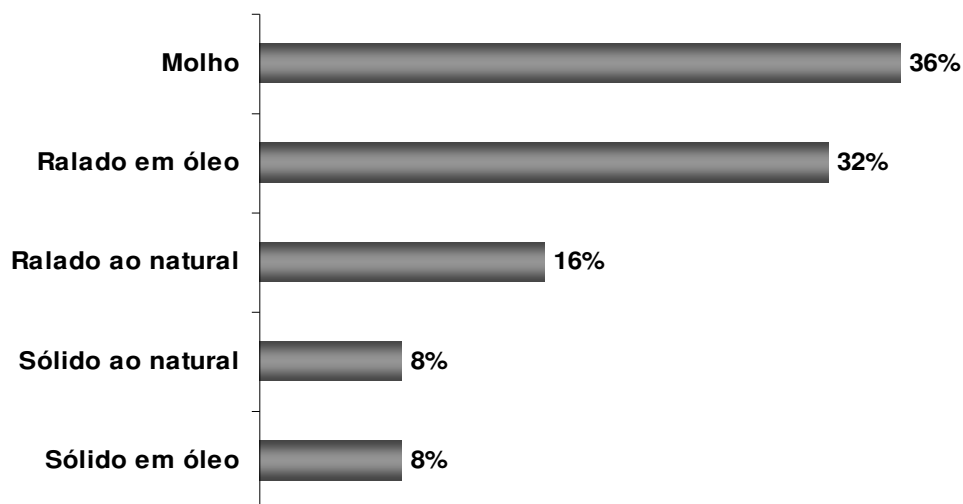


FIGURA 39. Percentual de amostras de diferentes tipos de processamento adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, com teores de histamina quantificáveis.

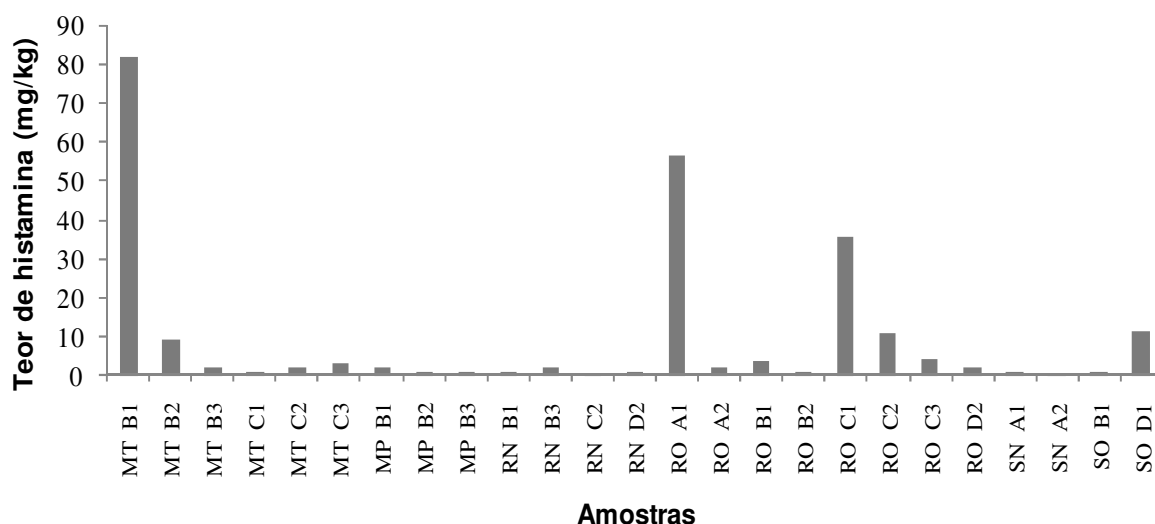


FIGURA 40. Teores de histamina em amostras de atum enlatado de diferentes marcas e lotes adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. (MT: molho de tomate; MP: molho picante; RN: ralado ao natural; RO: ralado em óleo; SN: sólido ao natural; SO: sólido em óleo. A, B, C e D: diferentes marcas).

As cinco amostras de atum fresco adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte estão representadas na Figura 41.

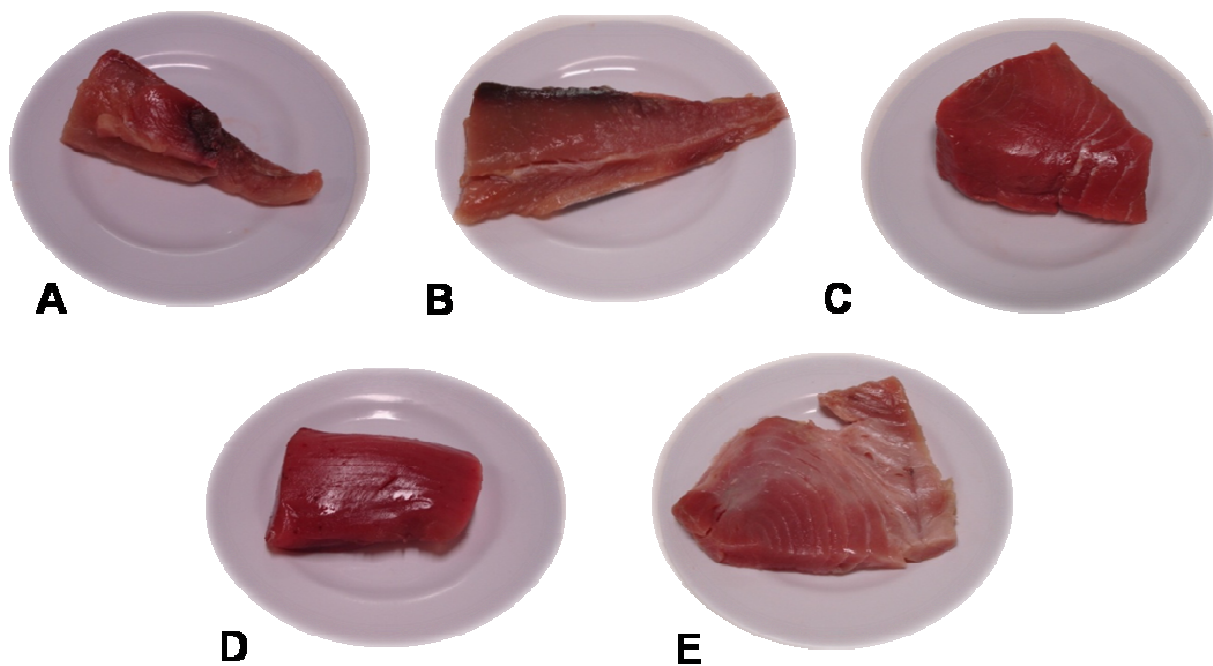


FIGURA 41. Amostras de atum fresco adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, codificadas por fontes.

Analisando-se as amostras de atum fresco, observou-se que duas apresentaram teores de histamina abaixo do limite de quantificação do método (Tabela 13). No restante das amostras, a concentração desta amina variou de 0,71 a 5,30 mg/kg, sendo que o atum do estabelecimento A diferiu significativamente dos demais, a 5% de probabilidade, além de apresentar a maior concentração de histamina. O teor médio de histamina para os diferentes estabelecimentos está apresentado na Figura 42.

TABELA 13. Teores de histamina em amostras de atum fresco adquiridos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

FONTE	REPETIÇÃO	TEOR DE HISTAMINA (mg/kg)
A	1	3,44
	2	5,30
	3	5,17
B	1	1,70
	2	2,11
	3	1,12
C	1	0,71
	2	nd
	3	nd
D	1	nd
	2	nd
	3	nd
E	1	nd
	2	nd
	3	nd

nd: não detectado (valor menor que 0,56 mg/kg)

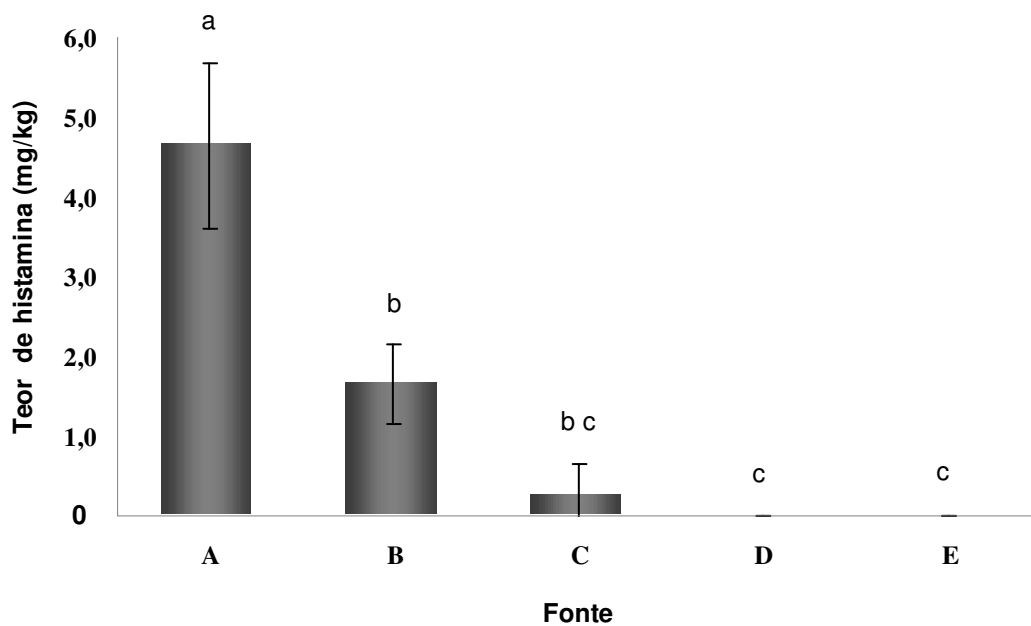


FIGURA 42. Teores médios de histamina em amostras de atum fresco adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Os teores de histamina nas amostras de atum fresco e enlatado se enquadram nos limites de 100 mg/kg regulamentados pelo Mercosul (BRASIL, 1997), FDA (1996), e CE (1991).

CONCLUSÕES

Após otimização do processo de extração de histamina em pescado, observou-se redução de 60 minutos em relação aos métodos de GLÓRIA et al. (1999) e LIMA (1999).

A utilização do 1,3-diaminopropano como padrão interno recomendado por DUFLOS et al. (1999) foi inviável para determinação de histamina em pescado. Na comparação entre o método de DUFLOS et al. (1999) e o adaptado de VALE & GLÓRIA (1997), observou-se que o último foi o mais apropriado para a análise de histamina em pescado, sendo, portanto, escolhido para validação.

O método adaptado de VALE & GLÓRIA (1997) foi validado para determinação de histamina em pescado e, em virtude dos limites estabelecidos pela União Européia se enquadrarem na faixa de 100 a 200 mg/kg, o método é viável para análise desta amina.

Os teores de histamina nas amostras de atum fresco e enlatado do mercado consumidor de Belo Horizonte se enquadram nos limites regulamentados pelo Mercosul, FDA e União Européia.

REFERÊNCIAS

- ABABOUC, L.; AFILAL, M.E.; BENABDELJELIL, H.; BUSTA, F.F. Quantitative changes in bacteria amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28 °C) and in ice. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 3, n. 26, p. 297-306, 1991.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 8402:1994. Gestão da qualidade e garantia da qualidade. Terminologia. Rio de Janeiro. 15 p. 1994.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 31 p., 2005.
- ARNOLD, H.S.; BROWN, D.W. Histamine toxicity from fish products. **Advances in Food Research**, v. 24, p. 113-154, 1978.
- 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.
- BAIXAS-NOGUERAS, S.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C. Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8 °C) and stored ice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 6504-6510, 2002.
- BALDINI, V.L.S. Aminas biogênicas e a deterioração do pescado. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, p. 389-402, 1982.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food: implications for growth and health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 66-71, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends of Food Science and Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BAUZA, T.; BLAISE, A.; TEISSEDRE, P.L.; CABANIS, J.C. Les amines biogènes du vin, Métabolisme et toxicité. **Bulletin L'O.I.V.**, p. 43-67, 1995.
- BAYLISS, P. Chemistry in the kitchen: fish and fish products. **Nutrition and Food Science**, Bradford, n. 1, p. 41-43, 1996.

- BELINSKY, D.L.; KUHNLEIN, H.V.; YEBOAH, F.; PENN, A.F.; CHAN, H.M. Composition of fish consumed by the James Bay Cree. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 9, n. 2, p. 148-162, 1996.
- BERAQUET, N.J.; LINDO, M.M.K. Transformações bioquímicas “post mortem” em pescado. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 169-192, 1985.
- BRANDÃO, A.L.G. **Potencial de formação de aminas biogênicas em peixes de piscicultura**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 1996. 65 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- 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.
- BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 73-84, 1990.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. **LC GC**, p. 19-24, 2001.
- BUSTO, O.; VALERO, Y.; GUASCH, J.; BORRUL, F. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. **Chromatographia**, v. 38, n. 9/10, p. 571-578, 1994.
- CACCIOPPOLI, J.; CUSTÓDIO, F.B.; VIEIRA, S.M.; COELHO, J.V.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas e características físico-químicas de salames tipo italiano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 648-657, 2006.
- CDC (Center for Disease Control). Disponível em <http://www.cdc.gov>. Acesso em 29/04/08.
- CE (Conformite Europeene). Directiva de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas aplicables a la producción y puesta en el Mercado de los productos pesqueros (91/439/EEC). **Diario Oficial de la Comunidades Europeas**, v. 286, p. 15-34, 1991.
- CHAKRABARTI, R.H. A method to preserve fish muscle pieces and mince from sciaenids. **Fisheries Technology**, Kakinada, v. 1, n. 25, p. 58-60, 1988.

- CHANG, S.F.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.S. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2840-2846, 1985.
- 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, 2004a.
- CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; BACCELLIERE, R.; COZZANI, R. Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 79-85, 2004b.
- CODEX ALIMENTARIUS. Volume 3. **Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos**. 2 ed. Roma. 1993.
- CONCA, R.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; HAJOS, P. Ion chromatographic separation of polyamines: putrescine, spermidine and spermine. **Analytical Chimica Acta**, v. 439, p. 107-114, 2001.
- CUSTÓDIO, F.B. Eficiência e seletividade da extração, purificação e detecção de histamina e tiramina em queijo ralado. Belo Horizonte: UFMG. 2006. 153 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- 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.
- DONHAUSER, S.; WAGNER, D.; GEIGER, E. Biogenic amines: significance, occurrence and assessment. **Brawelt 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 the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 82, n. 5, p. 1097-1101, 1999.
- EEROLA, S.; HINKKANEN, R.; LINDFORDS, E.; HIRVI, T. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 76, p. 575-577, 1993.
- ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H.F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v. 78, p. 273-280, 2002.

- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 61 p., 1998.
- FAO (Food and Agriculture Organization) Disponível em <http://www.fao.org>. Acesso em 21/04/08.
- FDA (Food and Drug Administration). Decomposition and histamine – raw frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related species; availability of revised compliance policy guide. **Federal Registration**, v. 149, p. 39754-39756, 1995.
- FOY, M.J.; PARRAT, J.R. A note on the presence of noradrenaline and 5-hidroxytryptamine in Plantain (*Musa sapientum*, var. *paradisiaca*). **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 13, p. 361-364, 1961.
- GARCIA-MORENO, C.; GOMEZ-CERRO, M.A.; NOGALES-ALARCON, A.; MARINE-FONT, A. Serotonina em alimentos. **Alimentaria**, v. 93, p. 21-28, 1978.
- 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 Products and Technology**, v. 8, n. 4, p. 55-69, 1999.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v.4, p. 1-38, 2005.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.
- GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v.11, p. 1-21, 1969.
- 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.
- HATHCOCK, J.N. **Nutritional Toxicology**. New York: Academic Press, 1982, v. 1, 515 p.
- HILLARY, A.R.; PEGG, A.E. Decarboxylases involved in polyamines biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. **Biochemical Biophysics Acta**, v. 1647, p. 161-166, 2003.
- HULTIN, H.O. Postmortem biochemistry of meat and fish. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 61, n. 4, p. 289-298, 1984.

- HUI, J.Y.; TAYLOR, S.L. Decomposition in food. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists**, Arlington, v. 66, p. 853-857, 1983.
- IAL (Instituto Adolfo Lutz). Pescado e conserva de pescado. In: **Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos**. 3. ed., São Paulo, 1985, v. 1, p. 210-212.
- IBE, A.; SAITO, K.; NAKAZATO, M.; KIKUCHI, Y.; FUJINUMA, K.; NISHIMA, T. Quantitative determination of amines in wine by liquid chromatography. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists**, Arlington, v. 74, n. 4, p. 695-698, 1991.
- ICH. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures. Geneve, 1996.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2007. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 02 Junho/2007, 25p.
- INGLES, D.L.; BACK, J.F.; GALLIMORE, D.; TINDALE, R.; SHAW, K.J. Estimation of biogenic amines in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 402-406, 1985.
- INGLES, D.L.; TINDALE, R.; GALLIMORE, D. Adsorption of biogenic amines by food constituents and some related substances. **Chemical & Industry**, n. 10, p. 415-416, 1980.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; HERNÁNDEZ-JOVER, T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in European beers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3159-3163, 1996.
- 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 the Association of Official and Analytical Chemists International**, Arlington, v. 76, p. 1027-1032, 1993.
- JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. Artmed, 2005. 712 p.
- JEEVANANDAM, M.; HOLADAY, B.S.; BEGAY, C.K.; PETERSEN, S.R. Nutrition efficacy of a spermidine supplemented diet. **Nutrition**, v.13, p. 788-794, 1997.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I General concepts and guidelines. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 19, p. 719-736, 1996.

- KALAČ, P.; ŠVECOVÁ, S.; PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chemistry**, v. 77, p. 349-351, 2002.
- KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KIRSCHBAUM, 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**, p. 28C-28H, 1994.
- KOEHLER, P.E.; EITENMILLER, R.R. High pressure liquid chromatographic analysis of tyramine, phenylethylamine and tryptamine in sausage, cheese and chocolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, p. 1245-1247, 1978.
- KHUHAWAR, M.Y.; QURESHI, G.A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **Journal of Chromatography B**, v. 764, p. 385-407, 2001.
- LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal). **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981, v. 2, cap. 11. Pescado Fresco.
- LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Editora Rima, 2004. 62p.
- LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMAN, C. Comparison of a capillary eletrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. **Journal of Chromatography B**, v. 779, p. 229-239, 2002.
- 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).
- LAVIZZARI, T.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 67-72, 2006.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 1-37, 2000.
- LEITÃO, M.F.F. Deterioração microbiana do pescado e sua importância em saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 3, n. 3/4, p. 143-152, 1984.

- LEITÃO, M.F.F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. In: **Controle de Qualidade do Pescado**. Santos: Leopoldianum, 1988. p. 40-58.
- 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 da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 70-79, 1999.
- LISTON, J. Microbial hazards of sea-food consumption. **Food Technology**, Chicago, v. 44, p. 56-62, 1990.
- LUCAS, A.P. Pesque-pague, uma renda extra para os piscicultores. **Manchete Rural**, Rio de Janeiro, n. 97, p. 6-10, 1995.
- MACHADO, T.M. Tecnologia do pescado: abate, processamento e controle de qualidade. Disponível em: <http://www.aquicultura.br/trutas/info>. Acesso em 16/05/08.
- 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 the Association of Official and Analytical Chemists International**, Arlington, v. 79, n. 1, p. 43-49, 1996.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. **Letters of Applied Microbiology**, v. 31, p. 169-173, 2000.
- MÉNDEZ, E.; GONZÁLEZ, R.M.; INOCENTE, G. Lipid content and fatty acid composition of fillets of six fishes from the Rio de La Plata. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 9, n. 2, p. 163-170, 1996.
- MERCADO DA PESCA. Disponível em <http://www.mercadodapesca.com.br/> Acesso em 16/01/08.
- MIETZ, J.L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Science**, Chicago, 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 the Association of Official and Analytical Chemists**, Arlington, v. 61, n. 1, p. 139-145, 1978.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p.184-197, 2005.
- 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.
- NAGATSU, T. Application of high-performance liquid chromatography to study of biogenic amine-related enzymes. **Journal of Chromatography**, v. 566, p. 287-307, 1991.
- NUNES, A.M.N. Qualidade dos pescados – parte II. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 32, p. 5-9, 1994.
- OHTA, H.; YOZA, K.I.; TAKEDA, Y.; NOGATA, Y. Influence of storage temperature on the polyamine level and ethylene production in broccoli (*Brassica oleraceael*, Italica group). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 831-831, 1993.
- ÖNAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1475-1486, 2007.
- ÖZOGUL, F.; GÖKBULUT, C.; ÖZOGUL, Y.; ZYURT, G. Biogenic amine production and nucleotide ratios in gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, wrapped in aluminium foil and wrapped in cling film at 4 °C. **Food Chemistry**, v. 98, p. 76-84, 2006.
- ÖZOGUL, F.; ÖZOGUL, Y. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. **Food Chemistry**, v. 99, p. 574-578, 2006.
- PANETTA, J.C.; DIAS, E.R.; ZICAN, C.A.; SANTANA, R. Saúde pública e aqüicultura. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 36, p. 6-7, 1995.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14 ed., Piracicaba, 477 p. 2000.
- RAWLES, D.D.; FLICK, G.J.; MARTIN, R.Y. Biogenic amines in fish and shellfish. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 39, p. 329-365, 1996.

- REUVERS, T.B.A.; MARTIN DEPOZUELO, M.; RAMOS, M.O.; JIMENEZ, R. A rapid ion-pair HPLC procedure for the determination of tyramine in dairy products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 1, p. 84-86, 1986.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RICE, S.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E. Biologically active amines in food: a review. **Journal of Milk Food Technology**, v. 39, p. 353-358, 1976.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- RODRIGUEZ-JEREZ, J.J.; MORA-VENTURA, M.T.; CIVERA, T. Istamina e podotti ittici: un problema attuale-parte I: fattori implicati. **Industrie Alimentari**, Torino, v. 33, p. 299-307, 1994.
- SANTOS, W.C.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 595-606, 2003.
- SÃO PAULO. Código sanitário. Pescado NTA 9. **Decreto nº 12486 de 20 de outubro de 1978**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, p. 169-170. 1978.
- SASSAKI, L.A., RIBEIRO, P. Intoxicação histamínica por pescado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 5, n. 18, p. 20-23, 1991.
- SATTLER, J.; LORENZ, W. Intestinal diamine oxidases and enteral-induced histaminosis: studies of three prognostic variables in an epidemiological model. **Journal of Neural Transmissions Supplements**, v. 32, p. 291–314, 1990.
- SATO, H.; SAKAMURA, S.; OBATA, Y. The isolation and characterization of N-methyltyramine, tyramine and hordenine from sawa miller seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1254-1255, 1970.
- SEAP (Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca). Disponível em <http://www.presidencia.gov.br/seap> Acesso em 20/04/08.
- SHAKILA, R.J.; VASUNDHARA, T.S.; KUMUDAVALLY, K.V. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. **Food Chemistry**, v. 75, p. 255-259, 2001.
- SHALABY, A.R. Multidetecção, semiquantitativa method for determining biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 52, p. 367-372, 1995.

- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675-690, 1996.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213-231, 1996.
- SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. **Food Chemistry**, v. 78, p. 214-248, 2002.
- 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. (Comunicação Verbal).
- SMITH, T.A. Amines in food. **Food Chemistry**, v. 6, p. 169-200, 1980-81.
- SMITH, T.A. Putrescine and inorganic ions. **Annals of Reviews and Plant Physiology**, v. 18, p. 6-54, 1984.
- 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, S.V.C.; BRITTO, R.B. Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos. In: Encontro para a Qualidade de Laboratórios. **Anais...** São Paulo: REMESP. p. 155-163, 2002.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina e tecidos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 34-38, 2001.
- STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 460-470, 1991.
- 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 Reviews in Toxicology**, v. 17, p. 91-128, 1986.
- TAYLOR, S.L. III-Histamine intoxication. In: CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne Diseases**, San Diego: Academic Press, 1990, Cap. 9, p. 164-168.
- TSAI, Y.-H.; LIN, C.-H.; CHIEN, L.-T.; LEE, T.-M.; WEI, C.-I.; HWANG, D.-F. Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. **Food Chemistry**, v. 98, p. 64-70, 2006.

- VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International**, Arlington, v. 80, p. 1006-1012, 1997.
- VANDERKERCKHOVE, P. Amines in dry fermented sausage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, p. 83-285, 1977.
- VECIANA-NOGUÉS, M.T.; HERNANDEZ-JOVER, T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL CAROU, M.C. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. **Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International**, Arlington, v. 78, p. 1045-1050, 1995.
- VECIANA-NOGUÉS, M.C.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2036-2041, 1997.
- VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela, 2004.
- VOIGHT, M.N.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E.; HAMDY, M.K. Tyramine, histamine and tryptamine content of cheese. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 37, n. 7, p. 377-381, 1974.
- WINDHOLZ, M. (Ed.) **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 10^a ed. Rahway: Merck, 1996. 2066 p.
- YAMANAKA, H. Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. **Food Reviews International**, v. 6, n. 4, p. 591-602, 1990.
- YEH, C.-Y.; LIN, S.-J.; HWANG, D.-F. Biogenic amines, histamine and label of dressed fried fish meat products in Taiwan. **Food Control**, v. 17, p. 423-428, 2006.
- ZHAO, Q.-X.; XU, J.; XUE, C.-H.; SHENG, W.-J.; GAO, R.-C.; XUE, Y.; LI, Z.-J. Determination of biogenic amines in squid and white prawn by high performance liquid chromatography with post-column derivatization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3083-3088, 2007.
- 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.
- ZEE, J.A.; SIMARD, R.E.; L'HEUREUX, L. An automated method for the composite analysis of biogenic amines in cheese. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 18, p. 245-248, 1985.