

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

**Desenvolvimento de Método Rápido de Análise de Histamina por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Atum**

Daniel Filisberto Schulz

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISE DE
HISTAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA EM ATUM**

DANIEL FILISBERTO SCHULZ

*Sob Orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy DSc.*

Dissertação submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências, no Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Área de
Concentração Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ
maio de 2009

664.07

S388d

T

Schulz, Daniel Filisberto, 1984-

Desenvolvimento de método rápido de análise de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência em atum / Daniel Filisberto Schulz - 2009.

59 f. : il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 38-43

1. Alimentos - Análise - Teses. 2. Alimentos - Contaminação - Teses. 3. Alimentos - Qualidade - Teses. 4. Histamina - Análise - Teses. I. Gogoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

DANIEL FILISBERTO SCHULZ

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/05/2009

Ronel Luiz de O. Godoy

Ronel Luiz de Oliveira Godoy DSc EMBRAPA - CTAA

(Orientador)

Angela Aparecida Lemos Furtado

Angela Aparecida Lemos Furtado DSc EMBRAPA - CTAA

Mirian Ribeiro Leite Moura

Mirian Ribeiro Leite Moura DSc UFRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que confiam o futuro de suas vidas à Divina Providência, não se preocupando, e se “entregando” aos acontecimentos “inesperados” que mudam os planos que costumamos fazer.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, pela confiança depositada e pela orientação, não só nos trabalhos do laboratório, mas também quanto ao meu futuro profissional. Expresso também minha admiração pelo seu trabalho e exemplo de relacionamento com todos que o rodeiam.

Ao Sidney Pacheco, funcionário da Embrapa – CTAA e colega de laboratório, que sempre coloca à nossa disposição sua grande experiência em cromatografia líquida, nos ajudando a contornar os problemas que sempre surgem durante a execução de um trabalho.

Aos outros colegas do Laboratório de Cromatografia Líquida, funcionários da Embrapa – CTAA: João Oiano, Jeane Santos da Rosa e Manuela Cristina Pessanha de Araújo; colegas de mestrado: Ana Cristina e Fernanda; e todos os estagiários que atualmente estão no laboratório e aqueles que já partiram por compartilharem do ambiente descontraído e “familiar” que contribui significativamente para o bom andamento dos nossos trabalhos.

Ao estagiário Rodrigo pelo auxílio nas análises das amostras de atum enlatado.

À Embrapa – CTAA por ceder o laboratório para o desenvolvimento desse trabalho e contribuição na minha formação e experiência profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao colega de pós graduação Juarez e à prof^a Arlene Gaspar Dutra, por gentilmente cederem o padrão de histamina utilizado nas análises.

À CAPES, pelo auxílio financeiro, sem o qual teria sido impossível o desenvolvimento deste trabalho em tão pouco tempo e com dedicação integral.

À minha esposa, Clarice, pelo companheirismo, pelo amor, pelo apoio com as dúvidas profissionais, pela compreensão com a falta de grana e de tempo para passear, pela revisão dos textos, enfim, por toda a ajuda que tem dado.

Aos meus pais, Dalton e Conceição, pelo apoio fundamental à conquista dos meus ideais e por não me deixarem desistir quando me revoltou e me entristeceu com o tratamento muito aquém do ideal que este país dá aos seus pesquisadores, profissionais da saúde, professores, e todos aqueles que se esforçam e dão o máximo de si para construir uma vida digna e transformar o Brasil num país melhor para todos.

Muito Obrigado!

RESUMO

SCHULZ, Daniel Filisberto. **Desenvolvimento de Método Rápido de Análise de Histamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Atum.** 2009. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A histamina é uma importante amina biogênica encontrada em pescados como atum, cavala, bonito e sardinha, e em alimentos fermentados como queijos, salames e chucrutes. Sua presença nesses alimentos não deve ultrapassar certos limites pois a ingestão dessa substância, em quantidades que variam de acordo com a pessoa, pode causar intoxicação escombróide, cujos principais sintomas são: dores abdominais, vômitos, diarréia, dor de cabeça, eritema, urticária e hipotensão, esta última podendo levar a morte, principalmente em idosos, crianças e cardiopatas. As autoridades sanitárias têm se empenhado cada vez mais em garantir que os alimentos possíveis de causar intoxicação escombróide sejam vetados ao comércio. De março de 2003 a agosto de 2007, na União Européia, foram feitas 223 notificações RASFF para atum ou derivados, sendo que 99 concerniam a elevados índices de histamina. O Brasil, sendo país exportador de atum, deve se preocupar em garantir a qualidade do pescado que envia para seus compradores, sob pena de enfrentar barreiras técnicas que impossibilitarão a comercialização futura do pescado brasileiro. Com os avanços nas metodologias de detecção e quantificação de histamina na Europa, utilizando técnicas mais precisas e sensíveis, a tendência é que o número de notificações ou mesmo a proibição da importação do atum brasileiro cresça, caso o país não modernize suas metodologias de análise. A UE preconiza que as análises sejam feitas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. Diante disso a proposta deste trabalho foi desenvolver um método adaptado às condições dos laboratórios brasileiros, utilizando um reagente fácil de manipular e que envolvesse poucas etapas, objetivando rapidez e praticidade, inserindo menos erro à análise, além de gerar um derivado estável da histamina à temperatura ambiente, possibilitando uma análise noturna em equipamentos com injetores automáticos. O método desenvolvido oferece boa resolução e limites de detecção e quantificação bem abaixo dos limites estabelecidos pela legislação, 1,6mg/Kg e 33,84mg/Kg, respectivamente. A extração é feita com ácido perclórico 6% utilizando-se aproximadamente 5g de amostra, e não necessita de limpeza prévia ou posterior, apenas centrifugação, filtragem e secagem em dessecador. A derivatização com AQC é rápida e a manipulação do reagente é simples. A eluição é realizada com fase móvel AcN e H₂O adicionada de 0,001% de trietilamina, eluindo em gradiente, iniciando com 1% de AcN, chegando a 60% com 25 minutos de análise, após eluição total dos componentes da matriz. O tempo total da análise, incluindo estabilização final da coluna com AcN 1% é de 30 minutos. O *t_r* médio da histamina derivatizada é 18,339 minutos. Os parâmetros de validação intralaboratorial avaliados garantiram a eficácia do método, podendo essa metodologia no futuro ser repassada ao INMETRO e se tornar um método oficial de referência para análise de histamina no Brasil.

Palavras-chave: CLAE. Segurança alimentar. Envenenamento escombróide

ABSTRACT

SCHULZ, Daniel Filisberto. **Development of Quick Method for Analysis of Histamine in Tuna by High Performance Liquid Chromatography.** 2009. 59p. Dissertation (Master Science in Food Science and Food Technology, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Histamine is an important biogenic amine found in fish like tuna, mackerel, bonito and sardines, and in fermented foods like cheese, salami and sauerkraut. Its presence in food should not exceed certain limits, because the intake of this substance in quantities that vary from person to person, can cause scombroid poisoning, whose main symptoms are: abdominal pain, vomiting, diarrhea, headache, erythema, urticaria and hypotension, the latter may lead to death, especially in elderly, children and people with heart disease. Health authorities have been increasingly engaged in ensuring that foods with hazardous potential to cause scombroid poisoning are vetoed the trade. From March 2003 to August 2007, in European Union, 223 notifications were made from RASFF for tuna or its derivatives, of which 99 concerned to high levels of histamine. Brazil is one of the world's tuna exporters, and so, should be concerned about the quality of fish it sends to its customers. If the country does not guarantee the quality of the fish it exports, technical barriers to Brazilian fish may be imposed. With the advances in analytical methods for detection and quantification of histamine in Europe, using more accurate, precise and sensitive methods, the trend is that the number of notifications or even a ban on Brazilian imports of tuna grows, if the country does not modernize its methods of analysis. The EU hoped that the tests are made using high performance liquid chromatography. Considering that our proposal was to develop a method that was adapted to Brazilian laboratories conditions, and using a derivatizing reagent easy to handle and with few steps, to speed and convenience, introducing less error in analysis, and generating a stable derivative of histamine to room temperature, allowing an over night analysis in equipment with an autosampler. The method developed offers good resolution and limits of detection and quantification are far below the limit set by law (100mg/Kg), 1.6 mg/kg and 33.84 mg/kg, respectively. The extraction is made with 6% perchloric acid using a sample of approximately 5g and does not requires cleaning prior or posterior derivatization, just a previous centrifugation, filtration and drying in desiccator. Derivatization with AQC is fast and simple handling. The reagent is also exempted later stages of cleaning. Elution is performed with mobile phase ACN: H₂O, with 0.001% of triethylamine in water, performing in gradient, which starts with 1% AcN, reaching 60% within 25 minutes of analysis, after complete elution of the matrix components. Total time of analysis, including final stabilization of the column with 1% AcN, is 30 minutes. The average RT of derivatized histamine is 18,339 minutes. The efficiency of this method was evaluated by some intralaboratorial validation parameters, and this methodology may become an INMETRO official reference method for analysis of histamine in Brazil.

Keywords: HPLC. Food safety. Scombroid poisoning

LISTA DE ABREVIASÕES E SÍMBOLOS

AcN	acetonitrila
AcOH	ácido acético
AMQ	6-aminoquinolina
AQC	6-aminoquinolil-N-hydroxisuccinimidil carbamato
C	valor de Cochran calculado
CG	Cromatografia gasosa
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Diode Array Detector ou Detector de Arranjo de Diodos
Dabsyl-Cl	cloreto 4-dimetilaminoazobenzenosulfônico
dx	variação da resposta
dc	variação da concentração
EC	eletroforese capilar
FMOC-Cl	9-fluorenilmetilcloroformato
g	grama
G _{calc}	valor de Grubs calculado
HCl	ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
IgE	imunoglobulina E
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Kg	quilograma
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
M	molar
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MAO	monoaminoxidase
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
mg	miligramma
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MS	espectrometria de massas
MΩ	megaohm
µg	micrograma
µL	microlitro
N	normal
n	número de pontos da curva de calibração
NBD-F	7-fluor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3diazol
nm	nanômetro
OMC	Organização Mundial do Comércio
OPA	O-ftalaldeído
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
ppb	partes por bilhão
psi	pounds per square inch (unidade de medida de pressão)

r	coeficiente de correlação linear da reta
r^2	coeficiente de correlação linear da reta ao quadrado
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
rpm	rotações por minuto
S	desvio padrão
S^2_{\max}	maior variância
S_r	desvio padrão de todos os resíduos
Sen	Sensibilidade calculada
SPE	extração em fase sólida
SPS	Sanitary and Phytosanitary Agreement
<i>t</i>	valor da distribuição <i>t</i> de Student
t_{calc}	<i>t</i> calculado
t_R	tempo de retenção
TBT	Agreement on Technical Barriers to Trade
TOC	Total Organic Carbon
UE	União Européia
UV	ultra-violeta
VIS	luz visível
X	provável valor aberrante
X_{med}	média dos valores
$\sum S^2$	somatório de todas as variâncias
$^{\circ}\text{C}$	graus Célsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Descarboxilação da histidina por histidina descarboxilase.	4
Figura 2: Esquema da reação do AQC com aminas e hidrólise, formando os produtos da derivatização e o AMQ.	10
Figura 3: Esquema da extração da histamina.	13
Figura 4: Esquema exemplificando o método de derivatização.	14
Figura 5: Cromatograma de padrão de histamina após derivatização com AQC.	19
Figura 6: Estrutura da histamina derivatizada com AQC.	20
Figura 7: Algumas estruturas de hiperconjugação do anel imidazol.	20
Figura 8: Cromatograma do padrão de histamina com eluição em gradiente, no método final, com detecção por UV, 245nm. A seta marca o pico referente à histamina.	21
Figura 9: Curva de absorção de luz ultra-violeta e visível do aduto da histamina.	21
Figura 10: Cromatograma de amostra de atum liofilizado com adição-padrão, em que não ocorreu derivatização. A seta marca o t_R da histamina, onde deveria aparecer o pico.	22
Figura 11: Cromatograma de método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O}$ 50:50.	23
Figura 12: Cromatograma de método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O}$ (15:85). A seta marca o pico referente à histamina.	24
Figura 13: Equilíbrio das formas protonada e neutra da histamina derivatizada com AQC em pH neutro ou levemente ácido.	25
Figura 14: Síntese das fases estacionárias das colunas de fase reversa RP C8 e RP C18, XTerra [®] , da Waters [®] . (SILVA, 2004).	25
Figura 15: A) Cromatograma de método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O}$ (18:82), t_R histamina, 5,12 minutos. B) Branco do reagente. A seta marca o t_R referente à histamina.	26
Figura 16: Cromatograma de método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O} + \text{AcOH}$ 0,05% (10:90).	27
Figura 17: Cromatograma de padrão de histamina (3,381 $\mu\text{g/mL}$) em método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O}$ (18:82).	28
Figura 18: Cromatograma do padrão de histamina realizado com o método gradiente 1. Pico referente à histamina com t_R 9,47 minutos.	29
Figura 19: Cromatograma do padrão de histamina realizado pelo método gradiente 1, com 0,001% de trietilamina adicionada à água milliQ [®] . Pico referente à histamina com t_R 16,18 minutos. A seta marca o pico referente à histamina.	30
Figura 20: Cromatograma de amostra de atum úmida, acrescentado de 3,381 $\mu\text{g/mL}$ de padrão realizado no método gradiente 5 final. A seta marca o pico referente à histamina.	31
Figura 21: Cromatograma de branco da amostra de atum seca, acrescentado de 3,381 $\mu\text{g/mL}$ de padrão realizado no método gradiente 5 final. A seta marca o pico	32

referente à histamina.

Figura 22: Curva de calibração feita com padrão. Média dos valores em triplicata. 34

Figura 23: Curva de calibração por adição-padrão em branco da amostra. Média dos valores em triplicata. 34

Figura 24: Comparaçao das curvas de calibração do padrão e adição-padrão. 35

Figura 25: Gráfico de resíduos da curva de calibração padrão. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Método gradiente 1.	14
Tabela 2: Método gradiente 2.	15
Tabela 3: Método gradiente 3.	15
Tabela 4: Método gradiente 4.	15
Tabela 5: Método gradiente 5.	15
Tabela 6: Tipos de atum enlatado analisados.	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Aminas Biogênicas	3
2.2 Histamina	3
2.3 Intoxicação Escombróide	3
2.4 Formação de Histamina nos Alimentos	4
2.5 Segurança Alimentar e Comércio Internacional	6
2.6 Metodologias de Análise de Histamina em Alimentos	7
2.7 6 Aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil Carbamato, AQC	9
2.8 Validação	10
3 PROPOSIÇÃO	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Materiais	12
4.2 Solução Padrão	12
4.3 Extração	12
4.4 Derivatização	13
4.5 Análise Cromatográfica	14
4.6 Parâmetros de Validação	15
4.6.1 Seletividade	16
4.6.2 Linearidade	16
4.6.3 Faixa de trabalho	17
4.6.4 Sensibilidade	17
4.6.5 Limite de detecção	17
4.6.6 Limite de quantificação	17
4.6.7 Repetitividade	17
4.7 Análise das Amostras de Atum	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19

5.1 Extração	19
5.2 Derivatização	19
5.3 Análise Cromatográfica	23
5.3.1 Método isocrático	23
5.3.2 Método gradiente	28
5.4 Parâmetros de Validação	34
5.4.1 Seletividade	34
5.4.2 Linearidade	35
5.4.3 Sensibilidade	36
5.4.4 Limite de detecção	36
5.4.5 Limite de quantificação	36
5.4.6 Repetitividade	36
5.5 Análise das Amostras de Atum	36
6 CONCLUSÃO	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

A histamina é uma importante amina biogênica encontrada em vários alimentos. A ingestão dessa substância, em quantidades que variam de acordo com a pessoa, pode causar envenenamento escombróide, cujos principais sintomas são: dores abdominais, vômitos, diarréia, dor de cabeça, eritema, urticária, hipotensão ou hipertensão, sendo que as duas últimas podem levar a morte principalmente idosos, crianças e cardiopatas. A histamina está presente principalmente em pescados como atum, cavala, bonito e sardinha, e em alimentos fermentados como queijos, salames, chucrutes, vinho e cerveja. Pode ser encontrada também em outros alimentos como sucos e frutas, mas nesses não traz risco, pois a quantidade presente é muito pequena. Contudo, sua presença em pescados e alimentos fermentados vem trazendo grandes preocupações, pois não deve ultrapassar certos limites, que no caso do Brasil é 100mg/Kg e da União Européia (UE) 200mg/Kg. Apesar de os casos de envenenamento escombróide relatados raramente serem fatais, eles demonstram alta morbidade e requerem tratamentos médicos de urgência, quase sempre com internação, trazendo altos custos para os sistemas de saúde, principalmente quando envolvem grande número de pessoas intoxicadas, como no caso de alimentos servidos em festas e restaurantes. Essa preocupação tem levado as autoridades sanitárias a se empenharem cada vez mais em garantir que os alimentos possíveis de causar o envenenamento escombróide sejam vetados ao comércio. De março de 2003 a agosto de 2007, na UE, foram feitas 223 notificações do Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) para atum ou derivados, sendo que 99 concerniam a elevados índices de histamina (RASFF, 2003-2007). O Brasil, sendo país exportador de atum, deve se preocupar em garantir a qualidade do pescado que envia para seus compradores, sob pena de enfrentar barreiras técnicas que impossibilitarão a comercialização futura do pescado brasileiro. No Brasil, a histamina vem sendo analisada por fluorimetria e cromatografia em camada delgada (CCD). O método por fluorimetria envolve reação com agente derivatizante o-ftalaldeído (OPA), com etapas prévias de purificação do extrato em coluna de troca iônica. Isso resulta numa análise demorada e com produtos de derivatização pouco estáveis. Utilizando-se da CCD a análise se torna mais difícil, pois a quantificação da histamina não é precisa, baseando-se na comparação visual das manchas presentes na placa após eluição com padrões nas concentrações críticas. Com os avanços nas metodologias de detecção e quantificação de histamina na Europa, utilizando técnicas mais exatas, precisas e sensíveis, a tendência é que o número de notificações ou mesmo a proibição da importação do atum brasileiro cresça caso o país não modernize suas metodologias de análise.

A UE preconiza que as análises sejam feitas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O problema da utilização da CLAE como metodologia é a detecção. A histamina não é capaz de absorver luz em comprimentos de onda acima de 200nm, tornando impossível a sua detecção por detectores de ultravioleta/visível (UV/VIS) ou fluorescência, sem que haja interferência de outros componentes da matriz ou da fase móvel, o que torna obrigatório o uso de um agente derivatizante que possa incorporar a essa molécula um grupamento cromóforo. Outra opção seria a utilização de um espectrômetro de massas, que possui custos de instalação, operação e manutenção elevados, além de requerer mão-de-obra mais especializada a fim de se utilizar todo o seu potencial.

Pode-se encontrar na literatura várias metodologias de derivatização e análise além das supracitadas para a detecção e quantificação de histamina em alimentos. Todavia esses

métodos são trabalhosos e demorados, envolvendo várias etapas como concentração e/ou diluição e purificação, que vão introduzindo erros no experimento levando a um resultado final com baixa exatidão.

Neste trabalho foi desenvolvido um método que utiliza como agente derivatizante o 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), que é um reagente utilizado para a análise de aminoácidos por CLAE com detecção por fluorescência. Essa substância reage prontamente com aminas primárias e secundárias formando uréias estáveis com forte resposta em detectores de UV e fluorescência. Sua utilização é simples e a reação ocorre praticamente de forma instantânea. A utilização do AQC possibilitou o desenvolvimento de um método rápido e fácil de análise de histamina por CLAE utilizando detector de UV ou fluorescência, capaz de fornecer resultados que atendem aos padrões nacionais e internacionais de controle dos teores de histamina em pescados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aminas Biogênicas

Aminas biogênicas são substâncias nitrogenadas produzidas pelo metabolismo de organismos vivos (SHALABY, 1996). São metabólitos responsáveis por regular diversas funções fisiológicas em plantas, animais e microorganismos, desempenhando papéis essenciais na manutenção da homeostasia e sobrevivência desses. Por essa razão, são metabólitos secundários amplamente encontrados em alimentos (BARDÓCZ, 1995).

Nos seres humanos essas aminas tem influência na regulação do fluxo sanguíneo, na regulação das atividades do sistema nervoso e na secreção de hormônios (GOSETTI *et al.*, 2007).

Os principais problemas alimentares causados por aminas biogênicas são a intoxicação por histamina, também conhecida como envenenamento escombróide (na literatura em língua inglesa o termo é “scombroid poisoning”), e a intoxicação por tiramina, normalmente causada após a ingestão de queijos (GOSETTI *et al.*, 2007). Além disso, outras aminas formadas por processos metabólicos em alimentos estão envolvidas nessas duas síndromes, potencializando a ação da histamina e da tiramina. Vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação de aminas biogênicas em alimentos, de forma a prevenir que alimentos com altos índices dessas substâncias cheguem a mesa do consumidor (VALLÉ; MALLE; BOUQUELET, 1997; HERNÁNDEZ-ORTE, 2006; GOSETTI *et al.*, 2007; SIMÓ; MORENO-ARRIBAS; CIFUENTES, 2008).

2.2 Histamina

Nos mamíferos a histamina é a principal, e mais abundante, amina biogênica. Ela desempenha função importante na hemostasia, promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar e aumento local do fluxo sanguíneo, além de modular algumas atividades do sistema nervoso central. Entretanto, seus mecanismos de ação ainda não são totalmente compreendidos. Nos humanos ela é produzida e armazenada em grânulos em dois tipos de células do sistema imune, mastócitos e basófilos. Sua liberação fisiológica está associada a eventos de hipersensibilidade mediados pela imunoglobulina E (IgE), porém, outros estímulos também podem ativar os mastócitos e basófilos promovendo a liberação da histamina, como por exemplo, processos inflamatórios. Uma vez liberada, a histamina é rapidamente metabolizada à metabólitos inativos, por duas vias principais: N-metilação pela enzima N-metiltransferase e oxidação, sendo convertida em aldeído pela enzima monoaminoxidase (MAO) (NELSON, 2002).

2.3 Envenenamento Escombróide

O envenenamento escombróide está historicamente associado à ingestão peixes da família *Scombridae*, como atum, cavala e bonito (HUSS, 1997). No entanto, já são conhecidos vários casos onde a intoxicação ocorreu por ingestão de peixes das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae* (TAYLOR, 1986).

Essa intoxicação se caracteriza por uma síndrome com sinais e sintomas associados à

hiperestimulação de receptores histaminérgicos, que aparecem logo após a ingestão de alimento contendo alto teor de histamina, normalmente peixe. Os principais sintomas são: dores abdominais, diarréia, “rash” cutâneo, dores de cabeça, hipotensão arterial e palpitações, entre outros (TAYLOR, 1986). Apesar de raramente fatal, o envenenamento escombróide debilita bastante o paciente, requerendo cuidados médicos. Pessoas com problemas cardíacos ou respiratórios pré-existentes, idosos e crianças podem ter sérias complicações no caso de um envenenamento escombróide (TAYLOR, 1989). Quando há contaminação em alimentos servidos em festas, escolas ou restaurantes, um grande número de pessoas pode ser intoxicada (CHEN *et al.*, 2008; EMBORG; DALGAARD, 2006; FELDMAN *et al.*, 2005). Poucos relatos de casos envolvendo esse tipo de intoxicação são encontrados na literatura. De acordo com Taylor (1986), isso se deve principalmente ao fato dessa síndrome ser quase sempre confundida e notificada pelos médicos como algum tipo de alergia alimentar, sendo bastante subestimada. Infelizmente essa sub notificação desfavorece a implementação de medidas preventivas pelas autoridades sanitárias.

Para que se apresente o envenenamento escombróide é necessária a ingestão de alimento contendo alto teor de histamina. Segundo Lehane e Olley (2000) acima de 500mg/Kg. Entretanto sabe-se que a histamina sozinha não é capaz de causar a síndrome. Taylor, Hui e Lyons (1984) mostraram que a ingestão de altas doses de histamina sozinha causa apenas sintomas leves. Hoje a hipótese mais provável para o desenvolvimento do envenenamento escombróide é que a ingestão de alimento contendo várias substâncias, entre elas várias aminas biogênicas em altos teores, causa a intoxicação, evolvendo vários sistemas distintos (LEHANE; OLLEY, 2000). Entretanto, segundo o mesmo autor a presença de altas quantidades de histamina no alimento está sempre associada aos casos de intoxicação, sendo que a utilização de fármacos que inibem o metabolismo da histamina e de outras aminas biogênicas, como a isoniazida e os antidepressivos inibidores de MAO, potencializam e prolongam os efeitos do envenenamento escombróide.

2.4 Formação de Histamina nos Alimentos

A formação de níveis tóxicos de histamina nos alimentos está invariavelmente associado à ação microbiana (JAY, 2005). Por isso os alimentos envolvidos nos casos de envenenamento escombróide são alimentos fermentados ou são peixes já em processo de decomposição.

A produção microbiana de histamina se dá juntamente com o seu crescimento no alimento. Durante o crescimento microbiano, certas espécies de micro-organismos, principalmente bactérias, secretam enzimas descarboxilases. No caso da histamina, a enzima responsável pela sua produção é a histidina descarboxilase. A histidina descarboxilase promove a descarboxilação da L-histidina livre do alimento, produzindo então histamina (Figura 1).

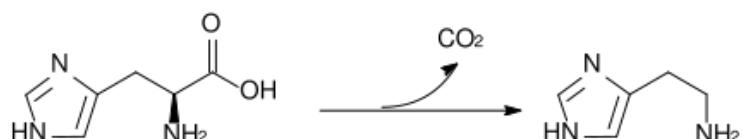


Figura 1: Descarboxilação da histidina por histidina descarboxilase.

A L-histidina é um dos aminoácidos essenciais, e na maioria dos animais não pode ser armazenada, sendo encontrada basicamente na estrutura das suas proteínas. Portanto, sua liberação para a produção de histamina necessitaria a hidrólise das proteínas do alimento, ou a sua decomposição. Entretanto, os peixes das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Scombresosidae* possuem naturalmente altos teores de L-histidina livre em seus tecidos, favorecendo então a produção de histamina pelas descarboxilases microbianas (SHALABY, 1996). Os peixes da família *Scombridae*, como o atum, podem apresentar um teor de histidina livre de 10g/Kg de tecido (JAY, 2005), daí o seu grande envolvimento nos casos de envenenamento escombróide.

Os peixes possuem ainda outro fator que favorece a produção de histamina, o seu alto grau de perecibilidade. A sua degradação promove a hidrólise das proteínas presentes na carne, liberando L-histidina para a ação das enzimas microbianas. Segundo Jay (2005) o alto grau de perecibilidade dos peixes se deve aos seguintes fatores:

- Presença de alta atividade de água,
- Rápida autólise (autodegradação do peixe por suas enzimas digestivas),
- Alto conteúdo de nitrogênio não protéico em sua carne (principalmente na forma de óxido de trimetilamina, que é um regulador de pressão osmótica, aminoácidos livres, taurina e creatina), e
- Microbiota vinda dos ambientes marítimos ou fluviais (principalmente *Pseudomonas* e *Acinetobacter-Moraxella*) produtora de histamina descarboxilase.

A produção de histidina descarboxilase está diretamente relacionada com a microbiota presente no peixe. Segundo Chen *et al.* (2008) as bactérias produtoras de histamina encontradas em peixes normalmente pertencentes à família Enterobacteriaceae cujos principais representantes são a *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei* e *Proteus* spp. Pode-se encontrar também Vibronaceas, *Pseudomonas*, *Costridium* e *Acinetobacter-Moraxella*.

A degradação dos peixes, tanto por autólise quanto por microrganismos, e a formação de histamina são aceleradas quando em temperatura ambiente (ÖZOGUL; ÖZOGUL; KULEY, 2008; ROSSANO *et al.*, 2006). Segundo os mesmos autores quando o peixe é refrigerado a temperaturas abaixo de 20°C reduz-se significativamente a formação de histamina. Entretanto, segundo Paleologos, Savvaidis e Kontominas (2004), o armazenamento em gelo do peixe, numa proporção de 3:1, não foi suficiente para impedir o aumento do teor de histamina após nove dias. Mesmo os teores estando bem abaixo dos limites legais, 3mg/Kg, esse trabalho mostra que o armazenamento do peixe é bastante limitado, mesmo quando diretamente em gelo.

A presença de bactérias psicrotróficas e halofílicas no ambiente marinho contribui para a formação de histamina em peixe armazenado. Kanki *et al.* (2004) mostraram que a presença de *Photobacterium phosphoreumemem* em sardinha salgada (iwhashi maruboshi) causou a intoxicação de um homem em Osaka, Japão. Segundo Kanki *et al.* essa bactéria é capaz de produzir histamina mesmo em temperaturas entre 4°C e 20°C, tendo sido capaz de produzir mais de 500mg/Kg de histamina em apenas 12 horas.

Diferentemente de outras aminas biogênicas, como a putrescina e a cadaverina, níveis tóxicos de histamina nos alimentos não são sensorialmente percebidos (SHALABY, 1996), o que pode levar ao envenenamento escombróide mesmo quando da ingestão de peixe adequadamente armazenado, mas por um período relativamente longo. Tudo isso tem levado os órgãos de vigilância sanitária de vários países a intensificarem a fiscalização da qualidade

dos peixes comercializados, principalmente quando estes pertencem às famílias acima citadas.

2.5 Segurança Alimentar e Comércio Internacional

O risco da ocorrência de doenças associadas ao consumo de alimentos contendo aditivos, pesticidas, hormônios, toxinas naturais ou ainda outros tipos de substâncias, tem contribuído para gerar insegurança e despertar um vasto rol de preocupações no consumidor. Segundo Spers e Kassouf (1996), a cada dia intensificam-se as exigências do consumidor para adquirir alimentos isentos de riscos, ou seja, um alimento seguro. Os autores registram que, quando se trata de alimentos, o consumidor, principalmente nos países desenvolvidos, é invariavelmente irredutível quanto à qualidade do produto que irá comprar.

A segurança alimentar com ênfase nos aspectos qualitativos pode ser entendida como a aquisição pelo consumidor de alimento de boa qualidade, livres de contaminantes de natureza química (pesticidas), biológica (organismos patogênicos; toxinas naturais, como as mico e ficotoxinas), física (vidros, pedras), ou qualquer substância que possa acarretar problemas à saúde (SPERS; KASSOUF, 1996).

Devido ao seu caráter multidisciplinar e a complexidade de fatores que o influenciam, o conceito de segurança alimentar deve ser adotado em todo o sistema agroalimentar, ou seja, as práticas inerentes à segurança devem ser incorporadas em todas as fases, desde a produção primária até o consumidor final, envolvendo, portanto, toda a cadeia alimentar.

Desse modo, é fundamental disponibilizar no mercado interno orientações e procedimentos para a produção de alimentos seguros, além de intensificar a fiscalização e o controle de qualidade e, assim, contribuir para a expansão do consumo por meio da confiança do consumidor. Garantir que alimentos de qualidade cheguem à população brasileira faz parte da segurança alimentar. O impacto dessas ações contribui para a sustentabilidade e o aumento da participação do Brasil no mercado externo de alimentos, uma vez que implica na melhoria da capacidade de sobrepor as barreiras não tarifárias impostas por países importadores.

Os acordos *Sanitary and Phytosanitary Agreement* (SPS) e *Agreement on Technical Barriers to Trade* (TBT) da Organização Mundial do Comércio (OMC) visam diminuir inconsistências entre as exigências das medidas sanitárias e fitosanitárias e as necessidades comerciais dos países filiados à OMC. O TBT determina também o estabelecimento de um ponto de investigação e notificação em cada país membro. No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) atua como ponto focal do acordo TBT (MIRANDA *et al.*, 2004). Na Europa, no entanto, foi criado um sistema de alerta rápido, RASFF, que é gerido pela comissão europeia para segurança alimentar e abrange todos os países membros.

Neste sistema, a política estabelecida é a de exigir um elevado nível de proteção à saúde como princípio básico da legislação alimentar e impor a retirada do mercado de qualquer gênero alimentício ou de alimentos para animais, que apresentem risco grave direto ou indireto à saúde humana (Regulamento nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho).

Atualmente, o Brasil é inadimplente no que diz respeito ao regulamento de monitoramento de resíduos químicos em alimentos de origem vegetal e animal da União Européia e, desse modo, tem enfrentado inúmeras barreiras técnicas. Nos últimos anos e, somente em 2007, o Brasil sofreu 58 alertas rápidos (RASFF, 2007). No que diz respeito ao atum, de março de 2003 a agosto de 2007, foram feitas 223 notificações RASFF para atum ou derivados, sendo que 99 concerniam a elevados índices de histamina (RASSF 2003-2007).

O *Food and Drug Administration* (FDA), órgão que regulamenta o comércio de

alimentos e medicamentos nos Estados Unidos, adotou um limite máximo de histamina em peixes de 500mg/Kg (FDA, 1996). A União Européia, seguindo as recomendações do Codex Alimentarius, estipulou que em peixes das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Sombresosidae* num esquema de amostragem com um total de 9 amostras nenhuma amostra deve apresentar teor de histamina maior que 200mg/Kg, e que no máximo 2 amostras podem apresentar teores entre 100mg/Kg e 200mg/Kg (REGULATION (EC) 2073, 2005). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento brasileiro (MAPA) e o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) adotaram um teor de 100mg/Kg como o máximo aceitável (BRASIL, 1997; MERCOSUL, 1994).

A histamina e outras aminas biogênicas podem ainda ser utilizadas como marcadores da qualidade de pescados de uma forma geral. A presença de altos teores dessas aminas indica na maioria das vezes falta de boas práticas na cadeia produtiva, pois a alta produção de histamina e outras aminas biogênicas se dá quase sempre devido a condições insatisfatórias de higiene, durante a manipulação e armazenamento.

O Brasil, sendo país exportador de atum, deve se preocupar em garantir a qualidade do pescado que envia para seus compradores, sob pena de enfrentar barreiras técnicas que impossibilitarão a comercialização futura do pescado brasileiro. Com os avanços nas metodologias de detecção e quantificação de histamina na Europa, utilizando técnicas mais exatas, precisas e sensíveis, a tendência é que o número de notificações ou mesmo a proibição da importação do atum brasileiro cresça, caso o país não modernize suas metodologias de análise.

2.6 Metodologias de Análise de Histamina em Alimentos

Atualmente pode-se encontrar na literatura várias metodologias para análise de histamina em alimentos. Basicamente esses métodos se resumem a cromatografia em camada delgada, eletroforese capilar (EC), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida, sendo este último, o método de separação com mais variações disponíveis.

Vale e Glória (1998) utilizaram cromatografia de troca iônica em análise de histamina em queijos brasileiro. O método consistiu de extração da histamina com ácido clorídrico 0,1N, seguido de partição em éter etílico e cromatografia em coluna de troca iônica, seguido de derivatização pós coluna com OPA. A detecção foi realizada por fluorescência. O método de eluição utilizado foi feito com tampão acetato de sódio em água, em eluição juntamente com solução de acetonitrila:água.

Kovács, Simon-Sarkadi e Ganzler (1999) utilizaram eletroforese capilar para analisar o conteúdo de histamina em vinho e salame. A extração foi feita com ácido perclórico 6% em agitação por uma hora. As amostras foram centrifugadas e em seguidas filtradas. Realizou-se ainda uma concentração do analito em coluna de troca iônica, antes de derivatizá-lo com AQC. Após a derivatização a separação foi feita por EC, com utilização de tampão e detecção por UV a 254nm.

Alberto, Arena e Nadra (2002) compararam dois métodos de CLAE para análise de aminas biogênicas. Ambos os métodos utilizaram derivatização pré-coluna da histamina com OPA, ou cloreto de dansil. No método com derivatização por o-ftalaldeído a análise cromatográfica foi feita com eluição em gradiente, com duas soluções de tampão fosfato em metanol em proporções diferentes. O tempo total de análise foi de 62 minutos. No método com derivatização por cloreto de dansila a eluição foi feita em gradiente com tampão acetado e acetonitrila. O tempo total de análise nesse método foi de 32 minutos.

Antoine *et al.* (2002) desenvolveram um método de análise de histamina por CG. Os

autores comentam que os métodos prévios de análise de histamina por CG apresentaram com diversos problemas, entre eles a não eluição completa do analito da coluna, ficando parte deste retido, e a formação de cauda nos picos referentes à histamina. No método de Antoine a extração foi feita com metanol:água 75:25 em banho maria a 60°C por 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas e filtradas para posterior derivatização com anidrido pentafluorpropioníco. As amostras derivatizadas foram previamente purificadas em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) e em seguida foram injetadas no cromatógrafo e detectadas por detector de ionização em chama. Segundo os autores a recuperação da histamina nesse método foi de apenas 62%.

Hwang, Wang e Choong (2003), também trabalhando com CG desenvolveram um método que utilizou para extração metanol alcalinizado e injetaram diretamente uma alíquota do sobrenadante, sem derivatização, resultando num método muito mais simples e rápido que o de Antoine *et al.* (2002), com uma análise com tempo total de menos de 20 minutos e recuperações de analito na faixa de 100%, foi talvez o primeiro método rápido, simples e eficiente de análise de histamina.

Os métodos que utilizam CCD de certa forma também oferecem rapidez de análise, contudo, não fornecem a exatidão necessária pelas legislações atuais (ALBERTO; ARENA; NADRA, 2002), pois normalmente esses utilizam comparação visual das marcas dos analitos nas placas, resultando numa análise semi-quantitativa.

Cinquina *et al.* (2004), trabalhando com CE e CLAE utilizaram detecção por detector de arranjo de diodos (DAD) e fizeram a comparação dos métodos. Utilizaram para extração ácido perclórico e ácido clorídrico, tampão para eluição e não realizaram derivatização das amostras. Obtiveram recuperações de 85 a 92%, sendo as melhores utilizando ácido perclórico como solvente na extração. Em ambos os métodos não utilizaram derivatização.

Métodos colorimétricos utilizando comparação visual das análises com padrões e amostra também são bastante utilizados (PATANGE; MUKUNDAN; KUMAR, 2005). Assim como os métodos que utilizam CCD, esse tipo de análise oferece resultados bastante rápidos, entretanto, por também serem métodos semi-quantitativos carecem da precisão e exatidão requeridos pelas legislações atuais.

Atualmente novos métodos utilizando detecção por espectrometria de massas vem sendo utilizados. Esses detectores oferecem resultados ainda mais precisos e exatos, oferecendo maior sensibilidade e muitas das vezes comprovação estrutural da presença do analito na amostra. Entretanto muitos desses métodos ainda carecem de metodologia cromatográfica prática e rápida, como pode ser observado nos métodos desenvolvidos por Saccani *et al.* (2005), Gosetti *et al.* (2007) e Simó, Moreno-Arribas e Cifuentes (2008). Além disso, detectores de massas são muito mais caros que os outros detectores e necessitam de mão-de-obra com maior qualificação para serem operados aproveitando-se todo o seu potencial.

Acima foram mostrados apenas alguns dos métodos disponíveis na literatura para análise de histamina ou aminas biogênicas em alimentos. Önal (2007) e Gosetti *et al.* (2007) comentam sobre a existência de vários outros métodos. Önal (2007) faz uma revisão de várias metodologias amplamente utilizadas. Em seu trabalho pode-se perceber que a grande variedade de metodologias se deve à busca por melhorias em métodos mais antigos, como os citados acima. Nos métodos acima podem ser observados basicamente três problemas envolvendo a análise de histamina. O primeiro é com relação à extração. Como os métodos atualmente existentes para extração de histamina da amostra não são seletivos, vários interferentes acabam sendo extraídos juntamente com esse analito. Daí a necessidade da utilização de etapas de limpeza da amostra, citados nos métodos de Vale e Glória (1998),

Patange, Mukundan e Kumar (2005), Antoine *et al.* (2002), além de Soufleros *et al.* (2007). O segundo problema é com relação à derivatização. Como a histamina não oferece boa absorção de luz ultravioleta (UV) ou luz visível (VIS) é necessária prévia derivatização nos métodos que utilizam detectores UV/VIS ou de fluorescência. Métodos como o de Cinquina *et al.* (2004), onde não se faz derivatização para detecção por UV oferecem baixíssima seletividade, pois a detecção do analito sofre interferência de outros componentes da matriz da amostra e da própria fase móvel.

A derivatização é crítica para essas análises por também trazerem vários problemas ao método devido aos reagentes utilizados. O *O*-fatalaldeído e seus análogos não oferecem boa estabilidade aos produtos da reação, precisando ser injetados rapidamente após a derivatização. O 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl), o cloreto 4-dimetilaminoazobenzenosulfônico (Dabsyl-Cl), o 7-fluor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3diazol (NBD-F) e o cloreto de dansil interferem com a detecção do analito, pois não são seletivos na reação formando uma infinidade de tipos de derivados que precisam ser retirados antes de se efetuar a análise, ou então deve-se restringir o seu excesso molar, o que pode reduzir o rendimento da derivatização e a sensibilidade (COHEN; MICHAUD, 1993).

O terceiro problema é o uso de tampões nas fases móveis. O uso de tampões requer um cuidado especial ao término de cada análise. Todo o sistema deve ser lavado exaustivamente quando se trabalha com tampões para que não haja entupimentos ou deposição de sais no leito cromatográfico da coluna, o que reduz a sua eficiência. No caso de deposição de sais na cabeça da bomba quando o sistema estiver desligado, pode provocar a quebra do pistão quando a bomba for novamente religada. Quando se utiliza tampões, mesmo lavando-se a coluna exaustivamente sua vida útil é reduzida.

O uso de colunas de troca iônica também não é desejável, pois normalmente estas requerem tempo maior de análise.

O método oficial de análise de histamina no Brasil, de acordo com a portaria 185 de 1997 do MAPA (BRASIL, 1997), é o mesmo método utilizado pela UE (REGULATION (EC) 2073, 2005) que preconiza que as análises sejam feitas por CLAE.

A análise oficial utiliza para extração ácido perclórico e derivatização com cloreto de dansil, com etapa de purificação feita com éter etílico e outros solventes. A análise é realizada com coluna C18, com eluição em gradiente acetonitrila:água:metanol com adição de ácido clorídrico 0,02M e tempo de análise de 30 minutos, sendo que o tempo de retenção (t_R) da histamina é de 14,7 minutos (MALLE; VALLÉ, 1996).

Apesar do método oficial ser bastante prático em relação aos outros métodos citados acima, como ele utiliza derivatização com dansil necessita limpeza da amostra após a derivatização, fonte de inserção de erros de exatidão e precisão na análise.

2.7 6 Aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil Carbamato, AQC

O AQC é um reagente que foi desenvolvido por Cohen e Michaud em 1993 para ser utilizado como agente derivatizante na análise de aminoácidos por CLAE. O AQC é um carbamato altamente reativo na presença de aminas primárias e secundárias. Em uma reação de apenas uma etapa são produzidas uréias assimétricas altamente estáveis, que podem ser detectadas por fluorescência ou ultravioleta. O AQC se mostra um reagente bastante seletivo, dispensando a limpeza prévia ou posterior da amostra, para retirar adutos interferentes. Pode ser utilizado também em soluções aquosas e na presença de tampões, pois os sais não interferem na reatividade e a reação de hidrólise, que degradando o reagente, demora aproximadamente 15 segundos, enquanto a reação com aminas primárias ou secundárias

demora de 1 a 2 segundos. O único requisito para que a reação ocorra é a necessidade do um meio alcalino, com pH entre 8,2 e 10,0.

A Figura 2 abaixo mostra um esquema da reação do AQC com aminas ou a degradação por hidrólise.

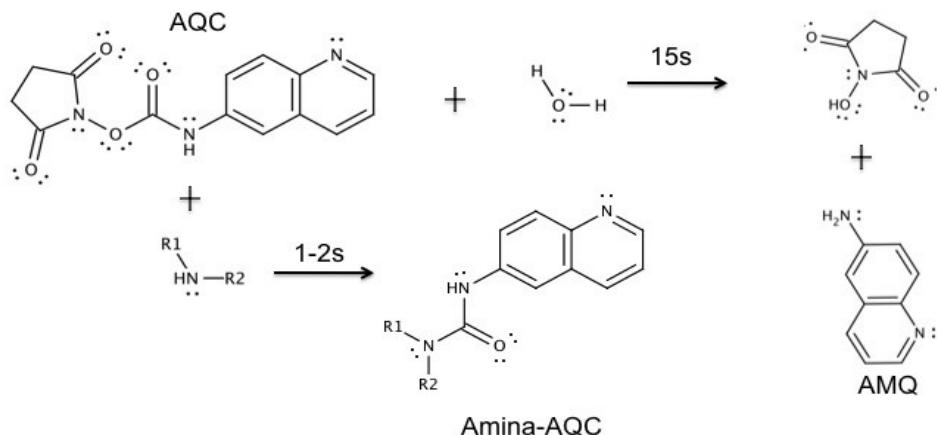


Figura 2: Esquema da reação do AQC com aminas e hidrólise, formando os produtos da derivatização e o AMQ.

No esquema mostrado acima podemos observar a formação de um produto resultante da degradação do AQC, a 6-amino quinolina (AMQ). Como O AQC sempre deve ser usado em excesso para que a derivatização tenha um bom rendimento sempre se encontra como produto o AMQ, juntamente com as aminas derivatizadas.

2.8 Validação

Ao se desenvolver um método, é fundamental proceder a validação do mesmo. A validação fornece garantia ao método de que ele é preciso e exato, ou seja, a análise de uma determinada amostra fornece resultados bem próximos ao valor real da concentração do analito presente na amostra e são reproduutíveis (THOMPSON; ELLION; WOOD, 2002).

Mesmo um método que é sabidamente adequado ao seu propósito e já foi validado necessita de uma nova validação caso esteja sendo implementado em um laboratório diferente, para que seja feita a verificação da funcionalidade do método neste novo laboratório (SOUZA *et al.*, 2007). Nessas condições fala-se em validação intralaboratorial.

Existe também a validação interlaboratorial, cujos objetivo principal é avaliar os resultados de um laboratório ou realizar um ensaio de reprodutibilidade de um método (HORWITZ, 1995).

Basicamente os parâmetros a serem avaliados numa validação intralaboratorial são: linearidade, efeito matriz, seletividade e limites (SOUZA *et al.*, 2007). Apesar de existirem divergências de como esses parâmetros devem ser avaliados, quando se busca acreditação oficial no Brasil deve se utilizar o documento orientador do INMETRO (DOQ-CGC-008, de 2007).

3 PROPOSIÇÃO

A proposta desse trabalho é desenvolver um método de análise de histamina em atum por CLAE utilizando como agente derivatizante o AQC, e avaliar parâmetros de validação de acordo com o documento DOQ-CGCRC-008, de 2007 do INMETRO.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Durante o desenvolvimento dos trabalhos experimentais foram utilizados dois cromatógrafos. Um cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695, com injetor automático, coluna AccQ•Tag®, Waters®, para aminoácidos, com detector de fluorescência também Waters® modelo 2475. Esse equipamento esteve conectado a um computador e foi controlado pelo software Empower® da Waters®. O outro equipamento foi um Shimadzu® modular modelo Prominence®, constituído de duas bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20As, forno CTO-20A, injetor manual Rheodine® com loop de 20 μ L, detector de arranjo de diodos (DAD-UV/VIS) SPD-M20A e módulo de comunicação CBM 20A. Nesse cromatógrafo foi utilizada coluna Waters® XTerra® RP 18 5 μ m, 4,6 X 150mm. O cromatógrafo modular Prominence® foi ligado através de uma rede ethernet a um computador e controlado pelo software LC Solutions® da Shimadzu®. O Alliance® foi utilizado no início dos experimentos para confirmar o sucesso da reação do AQC com a histamina utilizando uma metodologia para aminoácidos (CAMPOS, 2005), contudo, a metodologia específica para análise de histamina foi toda desenvolvida no cromatógrafo Prominence®.

Toda a água utilizada durante os experimentos foi ultra pura, recém coletada em equipamento MilliQ®, com resistividade mínima de 18M Ω /cm e carbono orgânico total (TOC) máximo de 7ppb. Os solventes utilizados, acetonitrila (AcN), ácido acético (AcOH), ácido clorídrico (HCl), ácido perclórico, trietilamina e metanol foram grau HPLC,Tedia®.

Como reagente contendo o AQC utilizou-se o kit para aminoácidos da Waters® AccQ•Tag®, constituído do reagente AQC, a ser ressuspêndido em 1 mL de acetonitrila (que acompanha o kit) e tampão borato, pH 8,8, para a reação.

4.2 Solução Padrão

O padrão de histamina utilizado foi dicloridrato de histamina Sigma (pureza > 99,0%). A solução do padrão a ser derivatizada foi preparada a partir de uma solução estoque 3,0mM preparada em ácido clorídrico 0,1M. Para construção das curvas de calibração foram preparadas diluições, com alíquota de 10 μ L cada, da solução estoque em ácido clorídrico 20mM com concentrações de 338,10; 135,24; 66,720; 33,810; 16,905; 8,4525; 4,2263 e 2,1131 μ g/mL.

4.3 Extração

A extração da histamina do atum foi realizada de acordo com uma modificação do método de Özogul, Özogul e Kuley (2008), utilizando ácido perclórico ao invés de ácido tricloroacético e filtração em filtro Millex® ao invés de papel de filtro Whatman®.

Cerca de 10g de atum foram homogeneizados em Ultra-Turax®, tendo sido 5g transferidos para tubo de centrifuga de 50mL e a histamina extraída com 20mL de ácido perclórico 6% por três minutos sob agitação em vórtex. Em seguida o tubo foi centrifugado a 10000rpm, por 10 minutos, a 4°C, passando uma alíquota de 2mL do sobrenadante em filtro Millex® 0,45 μ m. Uma alíquota de 20 μ L do filtrado foi retirada e transferida para vial de

injetor automático de 1,5mL, sendo colocada, imediatamente, em dessecador com sílica, sob vácuo até completa evaporação do solvente (Figura 3). Antes da derivatização a amostra seca foi ressuspensa em 20 ou 40 μ L de ácido clorídrico 20mM, seguida de 1 minuto de agitação em vórtex.

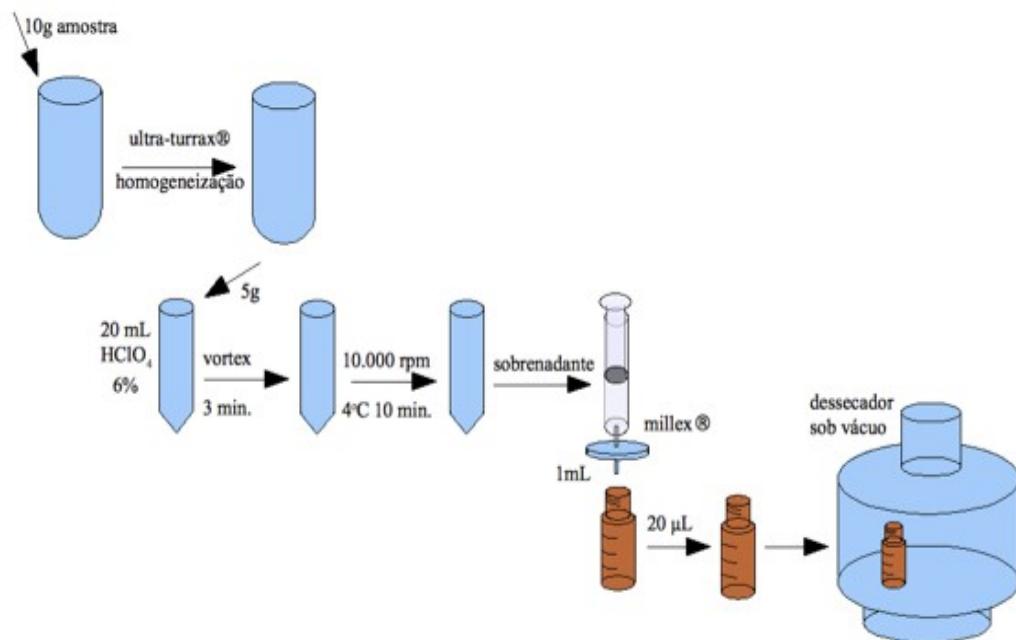


Figura 3: Esquema da extração da histamina.

4.4 Derivatização

A reação de derivatização foi realizada dentro de vials para injetor automático de 1,5mL. A reação ocorre misturando 10 μ L da solução padrão ou do extrato ressuspensione em ácido clorídrico com o tampão borato e, em seguida o AQC (10, 20 ou 30 μ L), sendo o volume final 100 μ L. As variações nos volumes do reagente foram feitas para verificar a influência deste no sucesso da derivatização. Foi realizada também uma derivatização com a amostra ressuspensione e o padrão, 10 μ L de cada, afim de utilizá-lo como padrão interno para confirmação do t_R da histamina e para verificação de efeito de matriz. Nesse caso foi utilizado um branco da amostra.

O tampão foi adicionado logo em seguida ao padrão e/ou amostra, com breve agitação em vórtex e só por último o AQC, para que este não sofresse degradação no pH ácido da solução de ácido clorídrico 20mM. Após a adição do reagente a solução foi brevemente agitada em vórtex (1 a 2 segundos) e em seguida deixada por mais 1 minuto à temperatura ambiente a fim de aguardar o término da reação. Um esquema da derivatização pode ser visto na Figura 4.

Três amostras de padrão derivatizado foram armazenadas à temperatura ambiente por 36 horas antes de serem injetadas para verificação da estabilidade do aduto à temperatura ambiente.

A significância estatística dos resultados foi avaliada através do teste t de Student. Antes de aplicar o teste t é necessária a verificação da homocedasticidade dos dados, que foi realizada pelo teste F de Snedecor.

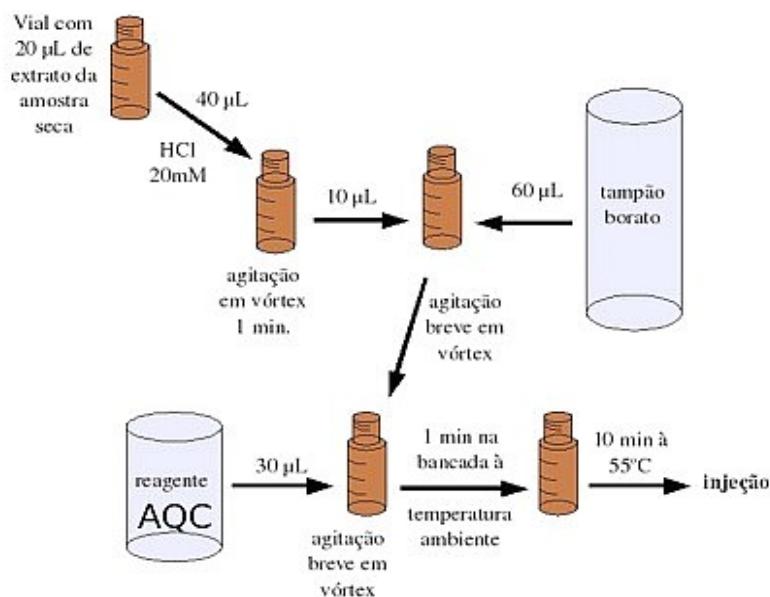


Figura 4: Esquema exemplificando o método de derivatização.

4.5 Análise Cromatográfica

As análises realizadas no cromatógrafo Alliance® foram feitas com a eluição em gradiente utilizada para aminoácidos (CAMPOS, 2005). Essa análise utiliza duas fases móveis. A fase móvel A, acetato de sódio e trietilamina, titulada a um pH 5,05 com ácido fosfórico, e a fase B acetonitrila:água, 60:40. As injeções foram de 5μL e a detecção feita por fluorescência com comprimento onda de excitação de 254nm e de emissão de 395nm.

O desenvolvimento da metodologia cromatográfica específica para histamina foi realizado no cromatógrafo Prominence®. Inicialmente procurou-se separar os produtos da reação do AQC com o padrão e identificar o t_R da histamina. As configurações iniciais foram fluxo 1mL/min e forno a 37°C, utilizando eluição isocrática com fase móvel acetonitrila:água nas seguintes proporções: 50:50; 25:75; 15:85; 10:90; 18:82. Em cada uma dessas proporções foram feitas pelo menos duas injeções, uma da solução padrão, 10μL, derivatizada com 70μL do tampão e 20μL do reagente AQC, e uma solução branca correspondente à uma solução de apenas 20μL do reagente e 80μL do tampão, ou seja, sem padrão. A detecção feita no detector DAD foi iniciada em 254nm, mas passou-se depois a utilizar o comprimento 245nm.

Na eluição em gradiente trabalhou-se com os seguintes parâmetros: fluxo 1mL/min, forno a 37 ou 40°C e eluição com fase móvel acetonitrila:água nas proporções por unidade de tempo descritas nas Tabelas 1 a 5.

Tabela 1: Método gradiente 1.

Tempo (minutos)	0	1	5	10	15	20	20,02	33
Concentração de Acetonitrila (%)	0	0	5	15	60	60	0	0

Tabela 2: Método gradiente 2.

Tempo (minutos)	0	1	5	10	25	28	34
Concentração de Acetonitrila (%)	0	0	5	15	60	0	0

Tabela 3: Método gradiente 3.

Tempo (minutos)	0	5	10	15	17	25	27	29	32
Concentração de Acetonitrila (%)	0	5	15	60	100	100	50	0	0

Tabela 4: Método gradiente 4.

Tempo (minutos)	0	1	5	10	15	25	28	30	35	40
Concentração de Acetonitrila (%)	5	5	10	15	25	25	50	50	5	5

Tabela 5: Método gradiente 5.

Tempo (minutos)	0	1	5	10	25	28	30
Concentração de Acetonitrila (%)	1	1	5	15	60	1	1

O método final utilizado nas etapas a seguir foi o método gradiente 5, sendo o fluxo reduzido para 0,8mL/min, temperatura do forno 40°C, com 0,001% de trietilamina adicionada à água milliQ®.

4.6 Parâmetros de Validação

O método gradiente 5 foi avaliado através de alguns parâmetros de validação executados de acordo com o recomendado pelo documento DOQ-CGCRE-008, de 2007 do INMETRO.

Os parâmetro avaliados foram: seletividade (efeito matriz), linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e repetitividade.

4.6.1 Seletividade

O INMETRO preconiza que a seletividade seja feita com um branco da amostra para então se fazer a comparação da análise com o padrão, e do branco da amostra com adição-padrão. A curva padrão utilizada para a verificação da seletividade foi construída com sete pontos, realizados em triplicata. A curva por adição-padrão feita com branco da amostra foi construída com seis pontos também em triplicata. A seletividade foi verificada por comparação da inclinação de ambas as retas pelo teste *t* de Student, precedidos pelo teste *F* de Snedecor.

4.6.2 Linearidade

As curvas utilizadas para avaliação da linearidade foram as mesmas utilizadas para seletividade.

A linearidade foi avaliada através do cálculo do coeficiente de correlação linear (*r*) e da análise dos resíduos de cada ponto. O *r* foi calculado a partir da regressão linear de sete ou seis pontos da curva de calibração feita com padrão ou com adição-padrão, respectivamente. Cada ponto foi feito em triplicata. A existência de valores aberrantes foi verificada através do teste de Grubs (equação 1).

$$|G_{\text{calc}}| = (X - X_{\text{med}}) / S \quad (\text{equação 1})$$

Onde G_{calc} é o valor de Grubs calculado, a ser comparado com o valor tabelado, X é o provável valor aberrante, X_{med} é a média dos valores do ponto da curva em questão, e S é o desvio padrão do ponto da curva em questão.

A homogeneidade das variâncias (homocedasticidade) dos pontos foi calculada pelo teste de Cochran (equação 2).

$$C = S_{\text{max}}^2 / \sum S^2 \quad (\text{equação 2})$$

Onde C é o valor de Cochran calculado, a ser comparado com o valor tabelado, S_{max}^2 é a maior variância e $\sum S^2$ é o somatório de todas as variâncias.

A análise dos resíduos foi feita calculando-se o valor de *t* para o ponto suspeito (equação 3).

$$t_{\text{calc}} = \text{resíduo} / S_r \sqrt{n} \quad (\text{equação 3})$$

Onde t_{calc} é o *t* calculado a ser comparado com o valor tabelado correspondente a distribuição *t* de Student para ensaios unilaterais com o intervalo de confiança desejado e grau de liberdade ($n-1$). Resíduo é a diferença entre o y da curva de calibração medido e o calculado pela regressão para cada ponto. S_r é o desvio padrão de todos os resíduos e n é o número de pontos da curva de calibração.

4.6.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi estipulada de forma a abranger de 25 a 150% do valor máximo permitido pela legislação europeia que é de 200mg/Kg. Esses valores correspondem respectivamente a 50mg/Kg e 300mg/Kg, o que equivale a concentrações da solução do padrão derivatizada de 0,625 e 3,75 μ g/mL respectivamente. Na prática a faixa de trabalho foi selecionada de 0,423 a 4,06 μ g/mL.

4.6.4 Sensibilidade

A sensibilidade foi calculada através da inclinação da reta da curva de calibração (equação 4).

$$S = dx / dc \quad (\text{equação 4})$$

Onde S é a sensibilidade calculada, dx é a variação da resposta e dc é a variação da concentração.

4.6.5 Limite de detecção

O LD pode ser calculado de várias formas, entretanto, o INMETRO recomenda que ele seja calculado utilizando-se um branco da amostra. Foram feitas sete injeções dessa amostra no método final, em seguida, em cada uma, foi quantificada a área do ruído da linha de base na região do t_R da histamina. O LD foi calculado de acordo com a equação 5, abaixo.

$$LD = X_{\text{med}} + (tS) \quad (\text{equação 5})$$

Onde X_{med} é a média do ruído nas sete injeções, t é valor da distribuição t de Student para ensaios unilaterais com grau de liberdade do ensaio $n-1$, onde n é o número de repetições e o nível de significância desejado, que foi de 95%. S é o desvio padrão das médias.

4.6.6 Limite de quantificação

Segundo a norma do INMETRO o limite de quantificação corresponde a média dos valores do branco somando-se cinco, seis ou dez desvios-padrão. Na prática corresponde ao menor ponto da curva de calibração.

4.6.7 Repetitividade

A repetitividade foi calculada através da injeção do padrão na concentração de 3,381 μ g/mL sete vezes, pelo mesmo analista, treinado, no mesmo equipamento num intervalo de tempo de três dias. Foi calculada a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

4.7 Análise das Amostras de Atum

Utilizando-se o método gradiente 5 final foram analisadas nove amostras de atum enlatado de três marcas diferentes, de acordo com a tabela 2. Quatro da marca A, mais barata,

quatro da marca B e uma da marca C de preços mais altos. As marcas B e C se enquadravam na mesma faixa de preço.

Tabela 6: Tipos de atum enlatado analisados.

	Ao natural	Em óleo
Sólido	A1, B1	A2, B2
Ralado	A3, B3, C	A4, B4

Por fim foi feita uma mistura de todo o conteúdo das marcas B e C que foi liofilizada, ou seja, a análise foi feita em amostra seca, a fim de se avaliar a influência do teor de água na detecção e quantificação da histamina.

As extrações foram feitas de acordo com o descrito na seção 4.3, com alíquotas de 10 μ L do sobrenadante levadas ao dessecador. A derivatização foi feita de acordo com o descrito na seção 4.4, sendo que o volume de reagente adicionado foi de 30 μ L. Foram realizadas duas injeções de cada amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração

No método utilizado por Özogul, Özogul e Kuley (2008) para extração das aminas biogênicas a extração é feita com ácido tricloroacético e, após centrifugação, o sobrenadante é filtrado em papel de filtro. As modificações feitas no método citado acima objetivaram a maximização da recuperação do analito e a facilidade e rapidez de se utilizar filtros de seringa ao invés de papel de filtro.

5.2 Derivatização

No cromatógrafo Alliance® foram feitas três injeções de 5 μ L do padrão de histamina a uma concentração de 3,381 μ g/mL utilizando 20 μ L da solução reagente. Em cada injeção uma massa de 16,905pg de histamina foi analisada, o que correspondeu a áreas de 376899, 404604 e 395790 (Figura 5). Utilizando-se volumes de 10 e 30 μ L do reagente não foi observada diferença no rendimento da reação de derivatização com padrões. Os picos referentes à histamina resultaram numa mesma área, não sendo verificada diferença significativa pelo teste t . O t_R médio da histamina foi de 22,3 minutos. Para as amostras armazenadas por 36 horas à temperatura ambiente também não foram observadas diferenças significativas. As amostras adição-padrão que não foram levadas à estufa apresentaram maior ruído de linha de base, em relação às amostras que permaneceram em estufa a 55°C por 10 minutos antes de serem injetadas.

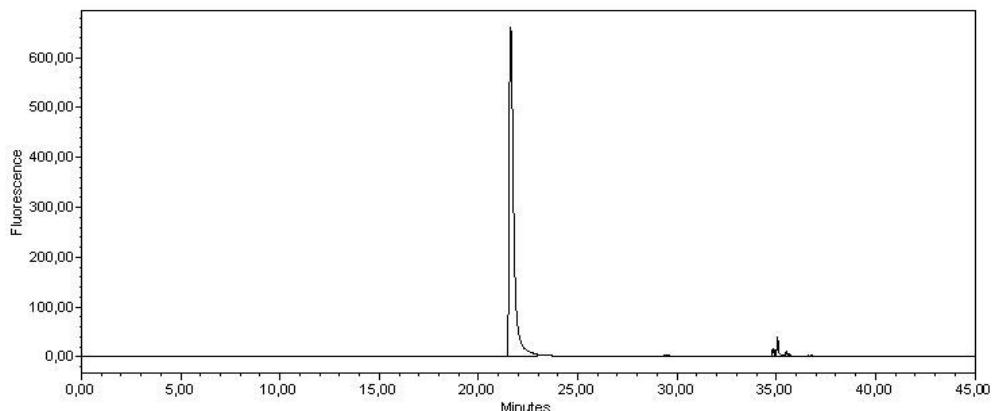


Figura 5: Cromatograma de padrão de histamina após derivatização com AQC.

A presença de apenas um pico indica que o AQC está reagindo com apenas um sítio na molécula de histamina, apesar da existência de três nitrogênios que poderiam reagir (os sinais próximos de 35 minutos são referentes ao retorno ao gradiente inicial). A estrutura molecular do aduto é mostrada abaixo (Figura 6).

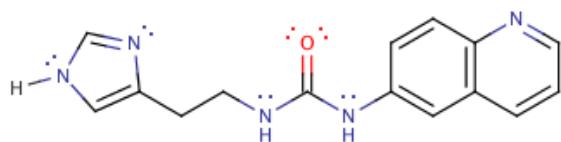


Figura 6: Estrutura da histamina derivatizada com AQC.

Os dois nitrogênios presentes no anel imidazol não possuem seus pares de elétrons disponíveis para reagir com a carbonila eletrofílica da parte carbamato do AQC. Esses pares eletrônicos participam da aromaticidade do anel imidazol, estando deslocalizados na nuvem π do anel, não sendo disponíveis para reação (Figura 7). Além disso o anel imidazol se apresenta como tautômero, tornando os pares de elétrons dos dois nitrogênios igualmente deslocalizados.

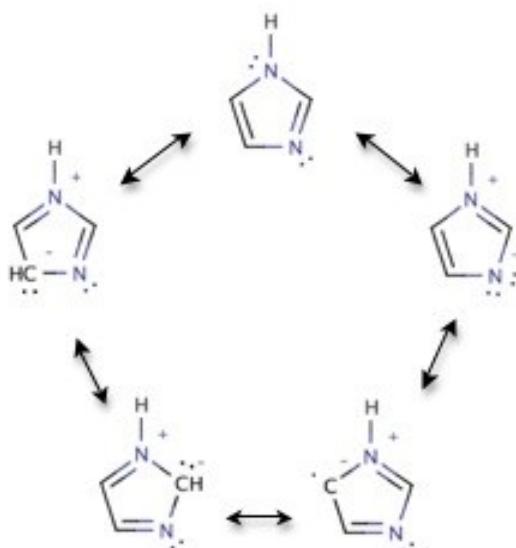


Figura 7: Algumas estruturas de hiperconjugação do anel imidazol.

Utilizando para análise a metodologia desenvolvida no cromatógrafo Prominence[®] pode-se observar a presença de um pico com t_R 16,15 minutos absorvendo fortemente em 245nm (Figura 8), que não aparece no método utilizado no Alliance[®], que utiliza detecção por fluorescência (Figura 5). Essa é uma das desvantagens dos métodos que utilizam detector de UV. Esse pico é referente ao AMQ, resultante da hidrólise do excesso do reagente, AQC. Como o AMQ absorve fortemente num comprimento de onda próximo ao das aminas derivatizadas, cujo máximo de absorção é em 245nm, e elui como um pico relativamente bem alargado, deve-se tomar cuidado no desenvolvimento de novos métodos para que os analitos alvos não eluam num t_R muito próximo ao do AMQ, de forma que estes não estejam coelucindo. No caso da utilização de detectores de fluorescência este problema é contornado ajustando o comprimento de onda de emissão (COHEN; MICHAUD, 1993). Moléculas fluorescentes são aquelas capazes de absorver luz em um determinado comprimento de onda e, em seguida, emitir luz num comprimento de onda maior. No método de Campos (2005), onde se utiliza detecção dos aminoácidos por fluorescência, a excitação é feita em 254nm e a absorção em 395nm. Essa medida promove uma detecção seletiva para as aminas

derivatizadas, mesmo que haja coeluição com AMQ. Isso se dá devido ao máximo de emissão do AMQ ocorrer em torno de 450nm e em 395nm apresenta uma emissão bem fraca, que não pode ser observada no cromatograma da Figura 5, acima.

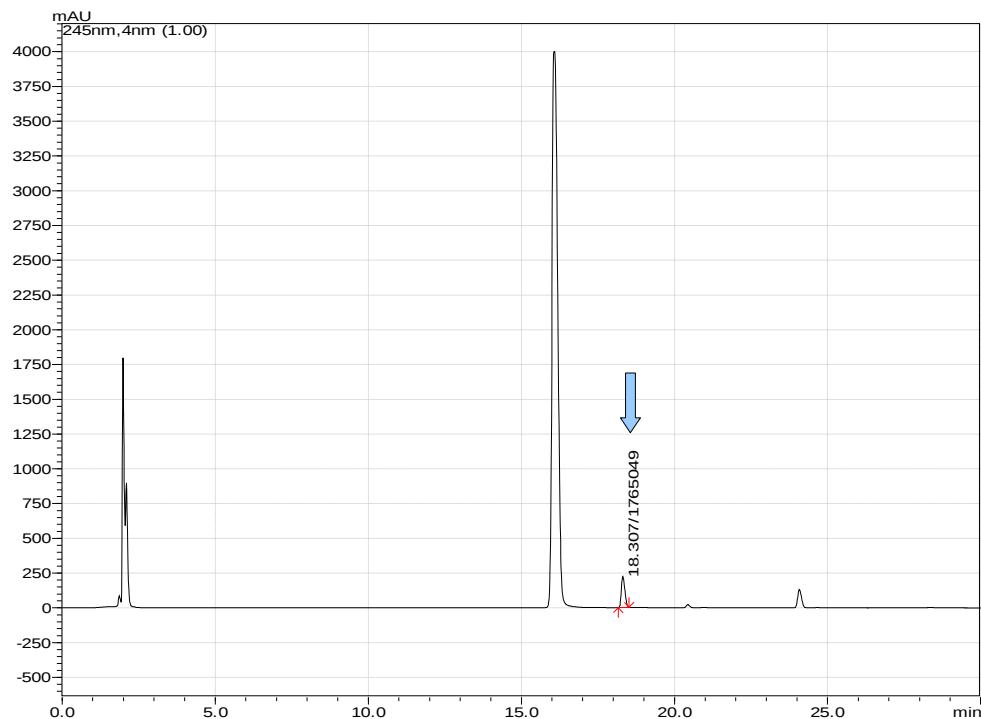


Figura 8: Cromatograma do padrão de histamina com eluição em gradiente, no método final, com detecção por UV, 245nm. A seta marca o pico referente à histamina.

Com o cromatograma do padrão de histamina feito no detector de arranjo de diodos (Figura 8) foi possível determinar o comprimento máximo de absorção da histamina derivatizada através da varredura feita pelo detector na faixa do UV e do VIS. O máximo de absorção da histamina derivatizada com AQC foi em 245nm (curva azul escuro na Figura 9). Esse valor foi então fixado para as análises seguintes.

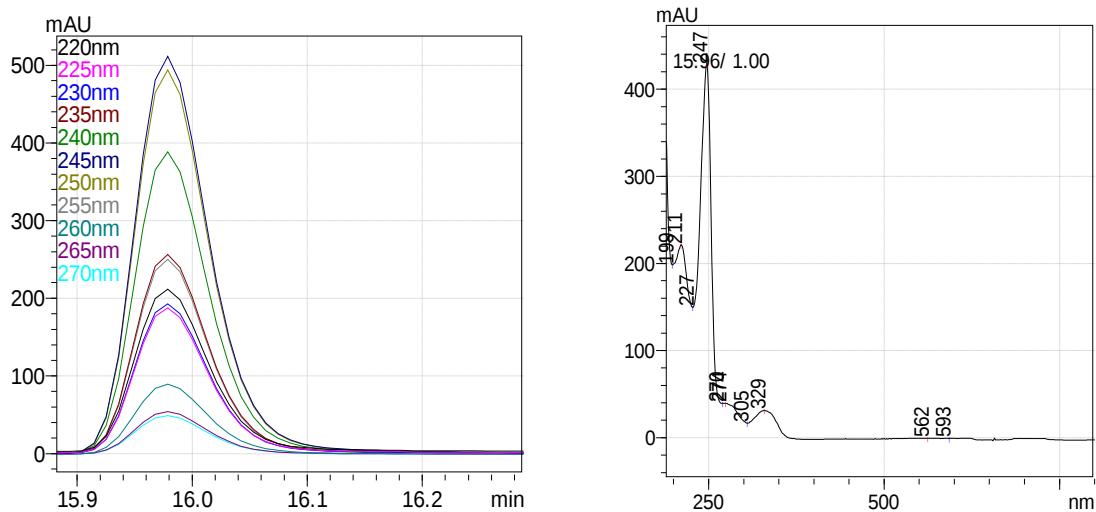


Figura 9: Curva de absorção de luz ultra-violeta e visível do aduto da histamina.

Quando se passou à derivatização da amostra de atum foi observado que o volume de ressuspensão da alíquota retirada para secagem em dessecador e o volume utilizado do reagente se mostraram críticos para a eficiência da derivatização. As alíquotas ressuspensas em 20 μ L e derivatizadas com 10, 20 e 30 μ L do reagente AQC apresentaram coloração amarelada após o término da reação, não sendo observados picos na região do t_R da histamina. A princípio suspeitou-se da degradação do reagente, então foi testada a derivatização com padrão na concentração de 3,381 μ g/mL e da amostra com adição-padrão na mesma concentração. A reação do padrão ocorreu como esperado, mas a da amostra com adição-padrão permaneceu sem apresentar picos no t_R esperado para histamina, que nesse método (método gradiente 4 com fluxo 1mL/min) foi de 15,78 minutos (Figura 10). Esse dado serviu de indicativo de que os componentes da matriz da amostra interferem na reação de derivatização. Segundo Campos (2005) a coloração amarelada se deve a um excesso de proteínas na amostra. Este excesso de proteínas presentes poderia estar consumindo o reagente, ou de alguma forma impedindo sua reação com a histamina. Utilizando um volume de ressuspensão de 40 μ L a reação ocorreu como esperado não sendo observada a coloração amarela.

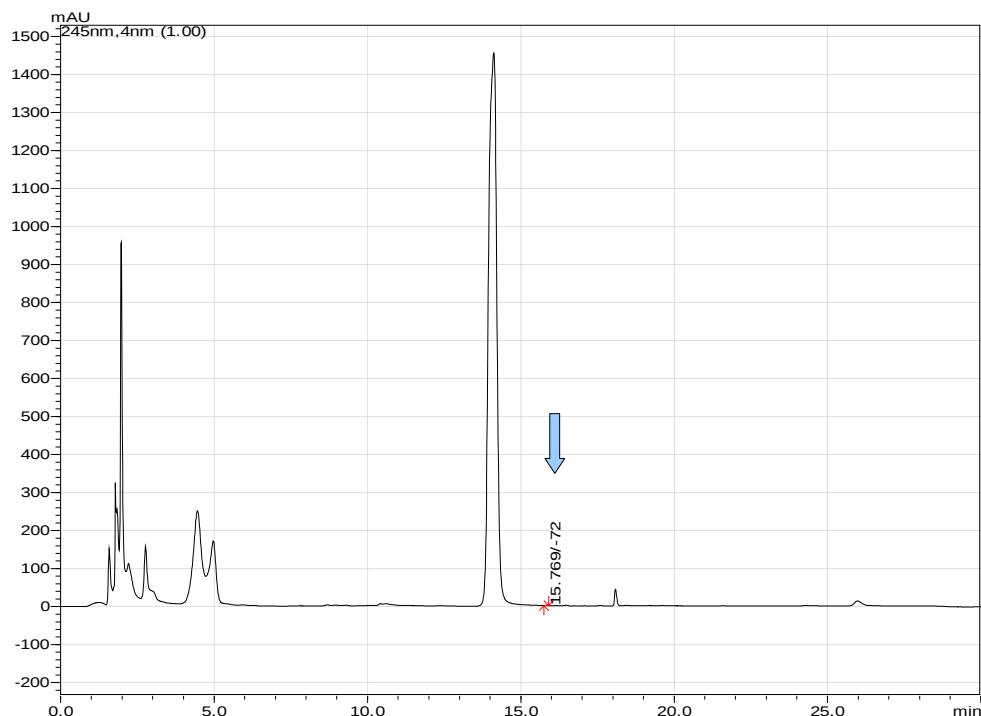


Figura 10: Cromatograma de amostra de atum liofilizado com adição-padrão, em que não ocorreu derivatização. A seta marca o t_R da histamina, onde deveria aparecer o pico.

Segundo Cohen e De Antonis (1994) para que haja uma otimização na reação de derivatização o reagente deve estar em excesso molar mínimo de duas vezes e meia o total de aminas, aminoácidos e/ou proteínas presentes na amostra. Por isso foi fundamental verificar se uma modificação no volume de reagente utilizado altera significativamente os valores observados das áreas nos ensaios por adição-padrão. Apesar de não ter sido observada diferença na área do pico referente à histamina quando se varia o volume de reagente utilizado na derivatização do padrão, foi verificada diferença significativa entre as áreas do

pico da histamina derivatizada para os volumes 10 e 20 μ L do reagente ($p = 0,01134$). Entretanto não observou-se essa diferença entre os volumes de 20 e 30 μ L ($p > 0,05$). Diante desse resultado, optou-se por padronizar o volume de 30 μ L do reagente para garantir o excesso molar. A comprovação do excesso do reagente pode ser observado por um pico com grande área e forte absorção no meio do cromatograma.

Como pode ser observado nos resultados acima, a derivatização de aminas biogênicas com AQC traz grande vantagem sobre os outros métodos de derivatização (GENNARO *et al.*, 2003; LAPA-GUIMARÃES; PICKOVA, 2004; LOUKOU; ZOTOU, 2003; INNOCENTE *et al.*, 2007; MO DUGO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2004), dispensando limpeza prévia da amostra, isto é, a prévia eliminação dos interferentes da matriz, ou mesmo a limpeza posterior, que elimina produtos interferentes gerados após a derivatização. Além disso, a uréia formada oferece estabilidade de pelo menos 36 horas, o que já havia sido previamente demonstrado em amostras de vinho (BUSTO; GUASCH; BORRULL, 1996; KOVÁCS; SIMON-SARKADI; GANZLER, 1999; HERNÁNDEZ-ORTE *et al.*, 2006; MARCO; AZPILICUETA, 2006). A estabilidade prolongada é importante para as análises de rotina, pois nesses casos as amostras são preparadas em grande quantidade e colocadas em injetor automático, esperando serem analisadas uma a uma, etapa que pode ser realizada após o expediente, agilizando o trabalho do laboratório.

5.3 Análise Cromatográfica

5.3.1 Método isocrático

O desenvolvimento das análises cromatográficas foi iniciado com eluições isocráticas. Proporções acetonitrila:água acima de 20:80 não resultaram na separação dos componentes da reação como podemos observar no cromatograma da Figura 11, abaixo, na proporção acetonitrila:água 50:50.

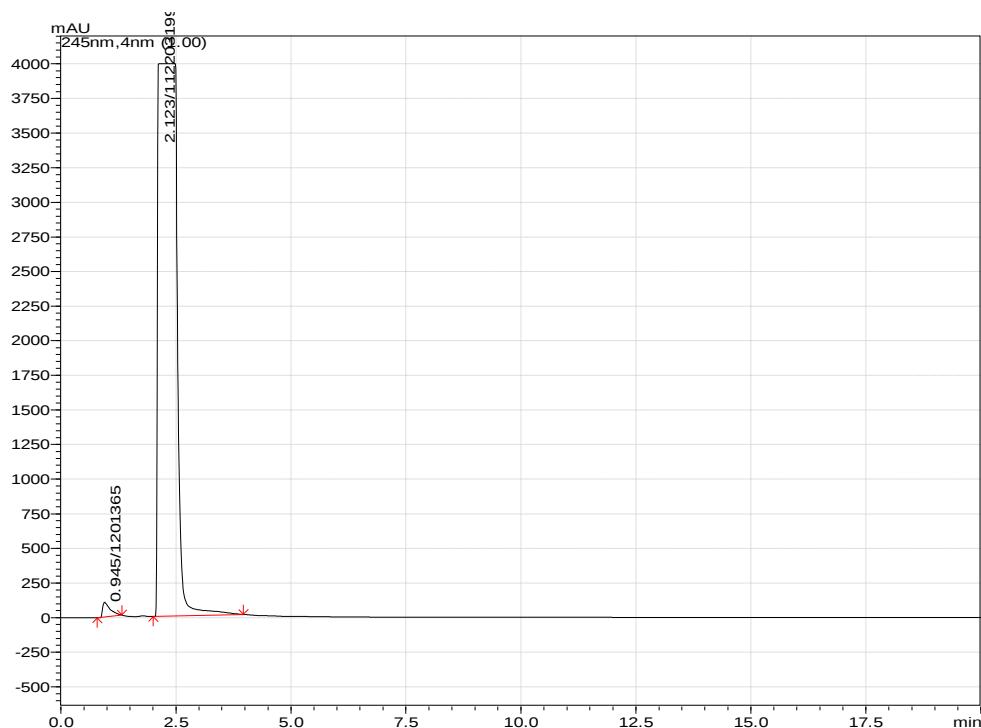


Figura 11: Cromatograma de padrão em método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O}$ 50:50.

Nessas proporções os componentes da solução foram eluídos muito rapidamente pela coluna e não ficaram retidos o suficiente para ocorrer separação, o que pode ser observado nas figuras acima pelo pico com t_R 2,12 minutos.

A estratégia foi então aumentar a polaridade da fase móvel, diminuindo a força de eluição através da redução da concentração de acetonitrila. Essa modificação aumenta o t_R , e, dessa forma, aumenta a interação dos componentes da solução com a fase estacionária da coluna, melhorando-se a resolução da separação. Proporções 15:85 e 10:90 resultaram em separação suficiente para identificar o pico referente à histamina (Figura 12).

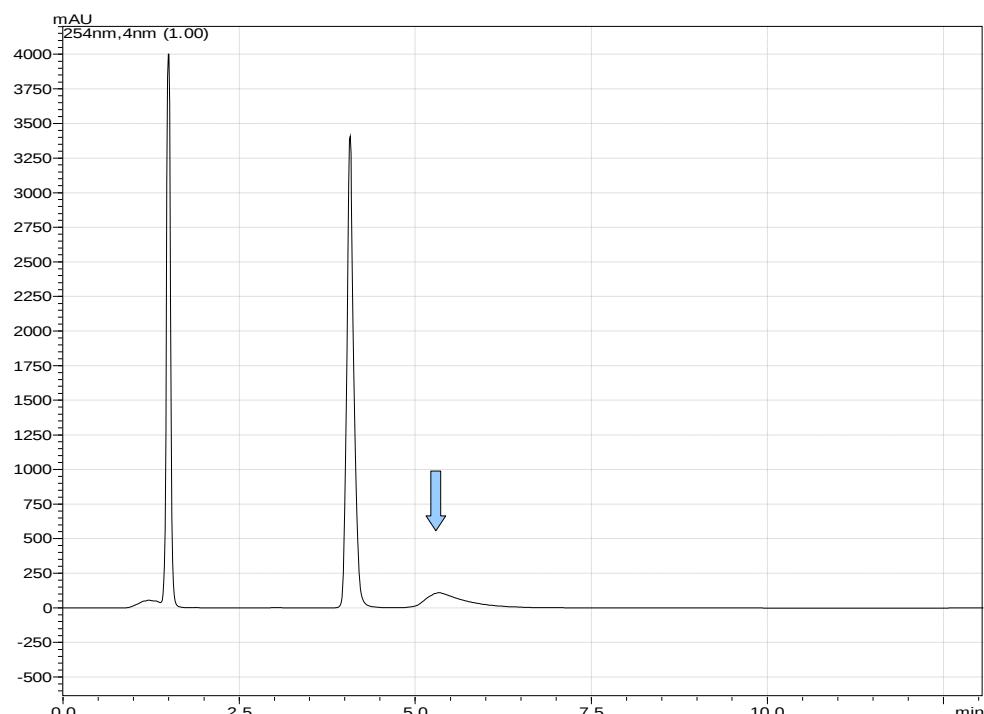


Figura 12: Cromatograma de parão em método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O}$ (15:85). A seta marca o pico referente à histamina.

Contudo, pode-se observar que houve demasiado alargamento do pico da histamina nessas proporções, devido ao aumento do t_R , que aumenta a dispersão do analito na fase estacionária. Nota-se também a formação de cauda no pico referente à histamina (t_R 5,32 minutos).

A formação de cauda é comum nas análises de compostos de natureza básica, em especial aminas, o que dificulta a sua análise por fase reversa. A cauda pode se formar por duas razões em colunas de fase reversa: interação dos grupamentos amino com os silanóis livres, residuais, ou pela presença de ambas as formas, protonada e neutra das aminas em pH neutro ou ácido (Figura 13).

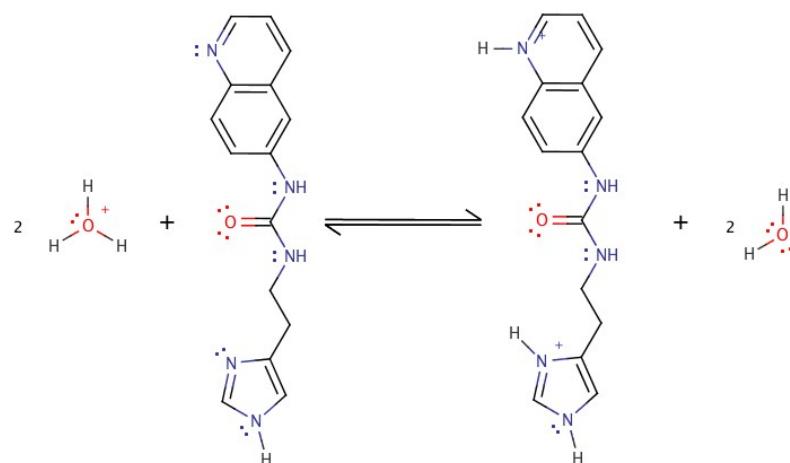


Figura 13: Equilíbrio das formas protonada e neutra da histamina derivatizada com AQC em pH neutro ou levemente ácido.

As colunas XTerra® são colunas com alto grau de capeamento, possuindo poucos silanóis livres para esse tipo de interação (Figura 14).

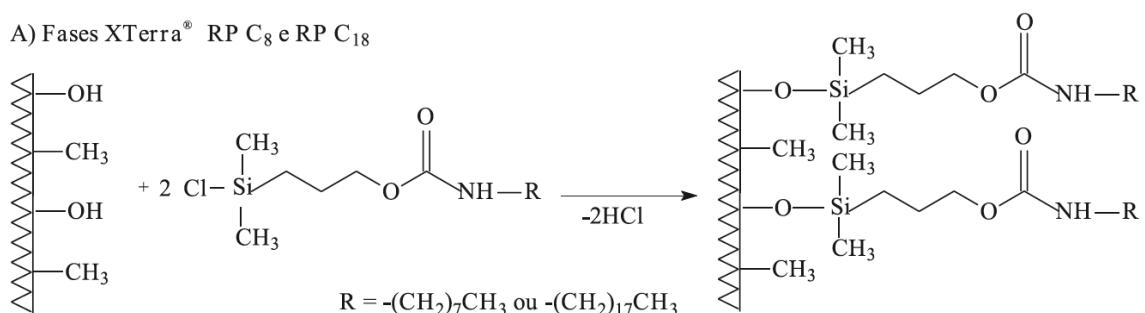


Figura 14: Síntese das fases estacionárias das colunas de fase reversa RP C₈ e RP C₁₈, XTerra®, da Waters® (SILVA *et al.*, 2004).

Portanto, a hipótese mais provável para a formação de cauda é a ionização dos nitrogênios dos anéis heterocíclicos, imidazol e quinolínico.

O alargamento do pico pode ser reduzido mudando-se as proporções da fase móvel, objetivando uma diminuição no t_R do analito; alterando o modo de eluição, passando nesse caso à eluir em gradiente, ou aumentando a transferência de massa, que pode ser conseguida aumentando-se a temperatura da coluna. Ao ser utilizada fase móvel na proporção 18:82 houve redução significativa do alargamento, mas a forma do pico ainda continuou pouco satisfatória, havendo persistência da cauda (Figura 15).

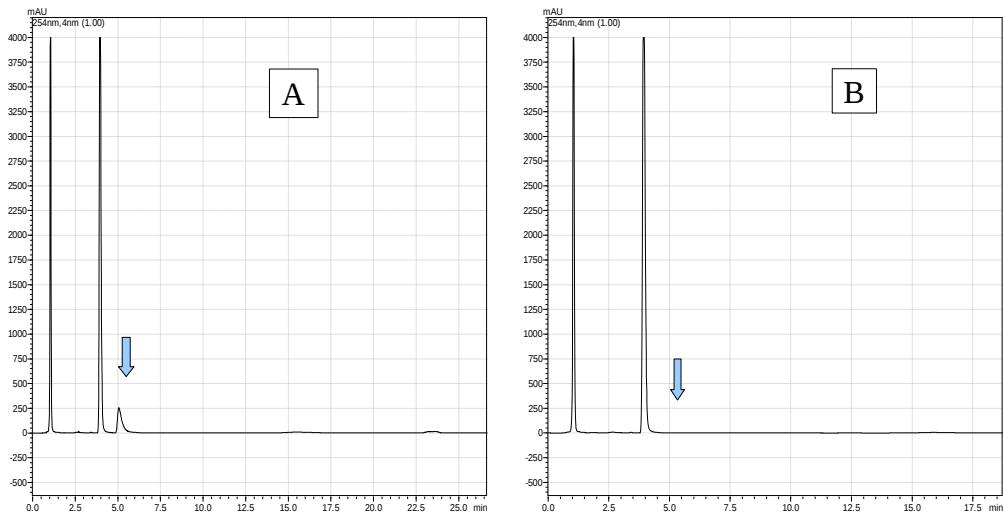


Figura 15: A) Cromatograma de padrão em método isocrático $\text{AcN}:\text{H}_2\text{O}$ (18:82), t_{R} histamina, 5,12 minutos. B) Branco do reagente. A seta marca o t_{R} referente à histamina.

Já a formação de cauda pode ser resolvida deslocando-se o equilíbrio da reação de protonação das aminas para um dos lados. Acrescentando-se ácido para reduzir o pH desloca-se o equilíbrio para a formação da forma protonada do derivado da histamina. Essa forma por possuir uma carga positiva é mais polar do que a forma não protonada, interagindo menos com a fase estacionária da coluna, apresentando um t_{R} menor. Já a adição de uma base, como a trietilamina, desloca o equilíbrio para o outro lado, favorecendo a formação da forma não protonada, o que diminui a sua hidrofilicidade, aumentando a interação com a fase estacionária da coluna.

A acidificação com 0,05% de ácido acético glacial resultou numa eluição muito rápida da histamina, juntando novamente os picos do AMQ e da histamina (Figura 16).

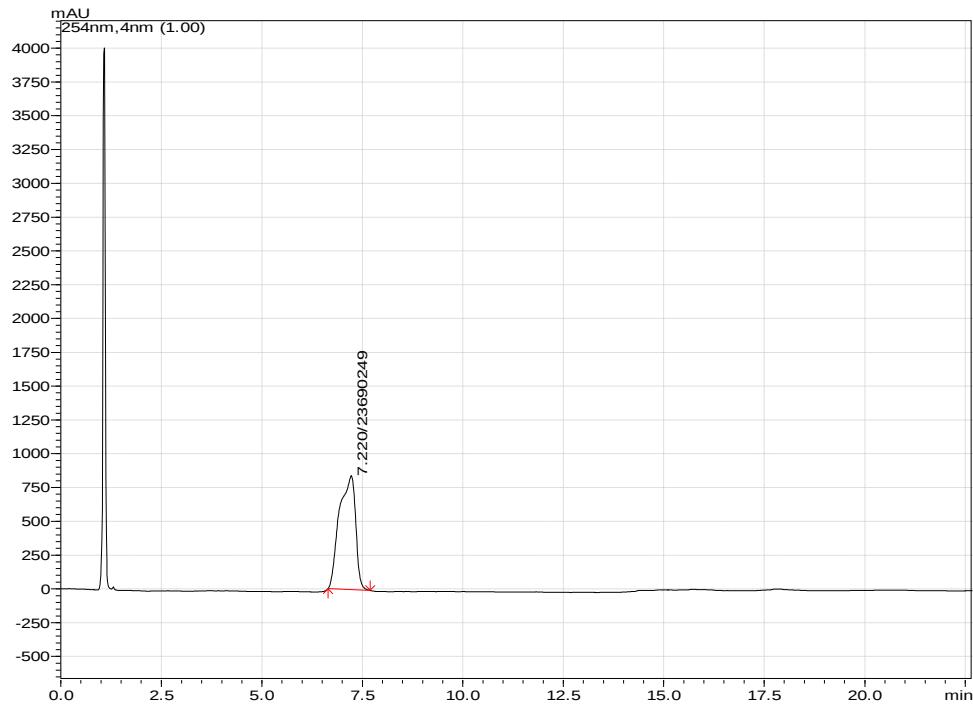


Figura 16: Cromatograma de padrão em método isocrático $\text{AcN:H}_2\text{O} + \text{AcOH}$ 0,05% (10:90).

Como a adição de ácido acético à fase não surtiu o efeito desejado optou-se pelo o método de eluição sem ácido acético, na proporção acetonitrila:água 18:82. Contudo, quando a concentração do padrão foi aumentada novamente perdia-se resolução e o pico do derivado da histamina apresentava forma bastante alargada, com a presença de um “ombro” à esquerda (Figura 17).

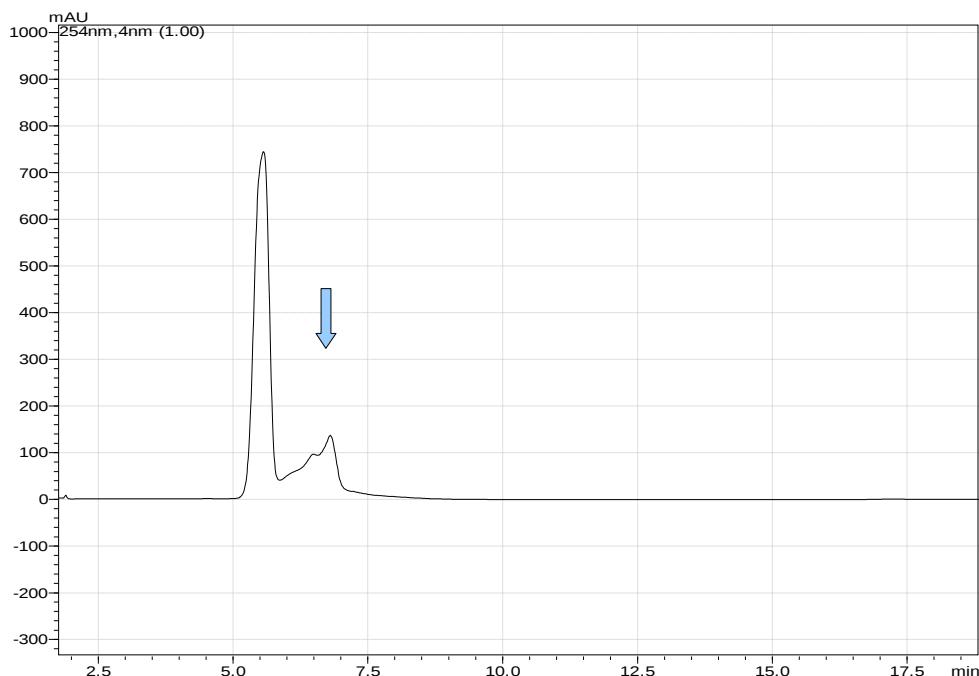


Figura 17: Cromatograma de padrão de histamina (3,381 μ g/mL) em método isocrático AcN:H₂O (18:82).

Os métodos isocráticos de eluição constituem a forma preferencial de método, pois além de não requererem tempo extra de análise para estabilização da coluna ao final de cada análise, antes da próxima injeção, podem ser utilizados em sistemas com bombas mais simples, que não são capazes de realizar eluição em gradiente. Entretanto, as dificuldades mostradas anteriormente em conseguir separações eficientes do padrão derivatizado impossibilitaram o desenvolvimento de um método com esse tipo de eluição.

5.3.2 Método gradiente

Os resultados observados nos métodos isocráticos mostraram que com fases móveis muito fortes ou de força mediana os componentes da amostra eluem muito rapidamente, não havendo separação, ou separando com baixa resolução. Diante disso decidiu-se iniciar a eluição com fase móvel 100% água, ou uma concentração muito baixa de acetonitrila, para em seguida aumentar lentamente a concentração de acetonitrila, reduzindo a hidrofilicidade da fase móvel, permitindo, dessa forma, a eluição dos componentes menos hidrofílicos que tendem a ficar retidos na coluna devido à forte interação com a fase estacionária, entre eles o aduto da histamina.

Já no primeiro método testado, método gradiente 1, conseguiu-se uma ótima separação entre os compostos presentes na solução padrão (Figura 18).

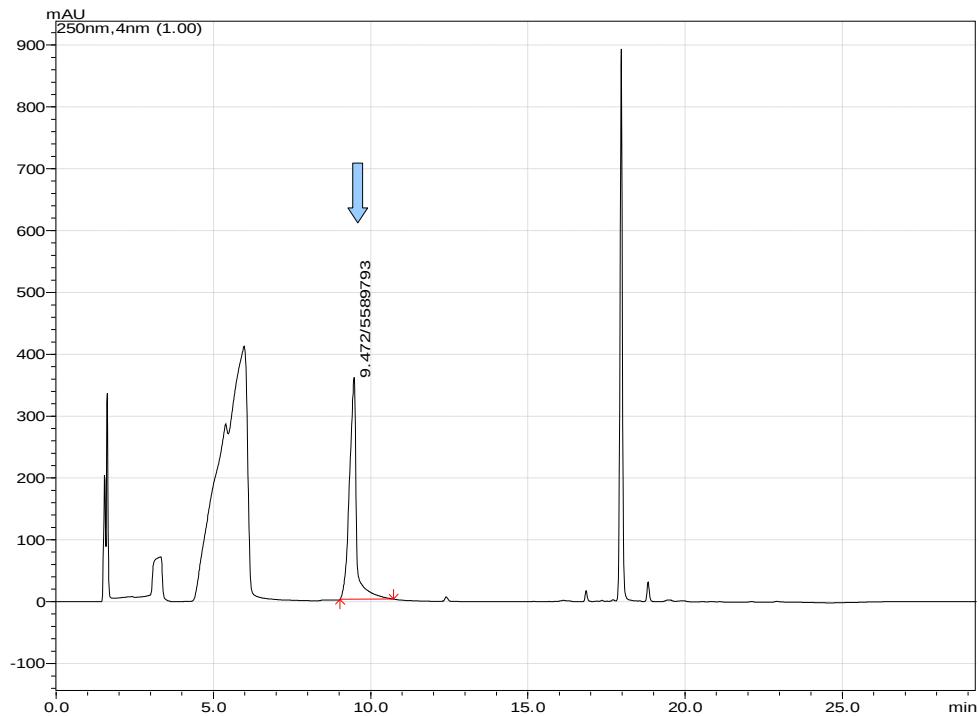


Figura 18: Cromatograma do padrão de histamina realizado com o método gradiente 1. Pico referente à histamina com t_R 9,47 minutos. A seta marca o pico referente à histamina.

Como mesmo após a eluição com método gradiente o pico referente à histamina continuava a apresentar cauda optou-se por fazer adição de trietilamina à água milliQ®. A trietilamina promove um aumento do pH da fase móvel deslocando o equilíbrio para a forma neutra (Figura 13), além disso em colunas não capeadas interage com os silanóis livres impedindo-os de interagir com os analitos. No chromatograma a seguir (Figura 19) pode-se observar que a adição de 0,001% de trietilamina se mostrou a melhor opção para resolver o problema da formação de cauda, melhorando, inclusive, o aspecto geral do chromatograma.

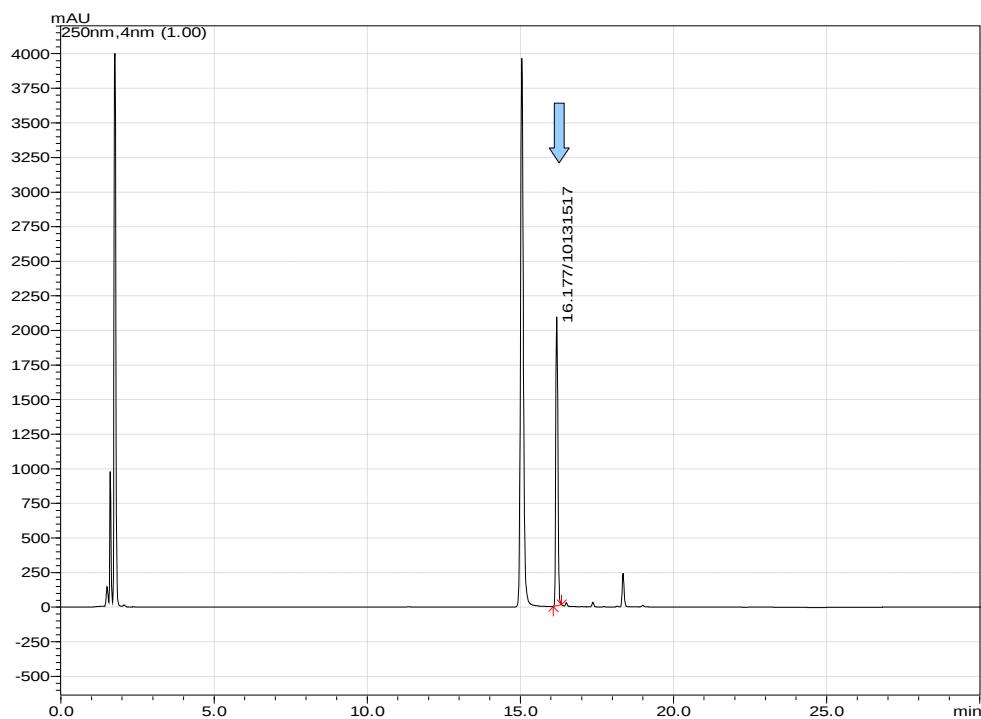


Figura 19: Cromatograma do padrão de histamina realizado pelo método gradiente 1, com 0,001% de trietilamina adicionada à água milliQ®. Pico referente à histamina com t_R 16,18 minutos. A seta marca o pico referente à histamina.

Nota-se que além do pico referente à histamina não apresentar mais cauda ele ficou mais fino. O pico do AMQ também teve seu formato alterado. A adição de trietilamina também fez com que essas duas substâncias ficassem mais retidas, aumentando em 6,7 minutos o t_R do aduto da histamina e em aproximadamente 9,55 minutos o t_R do AMQ.

A adição de trietilamina em fases móveis não tamponadas aumenta excessivamente o pH, o que pode causar hidrólise da fase estacionária de alguns tipos de colunas de fase reversa. Colunas de fase reversa normalmente não podem ser utilizadas em meios básicos. Nessas condições as hidroxílas livres reagem facilmente com os silanóis residuais, promovendo a dissolução da sílica (SILVA *et al.*, 2004). A perda de fase reduz aos poucos a eficiência da coluna, progressivamente levando a formação frontal de cauda.

As colunas XTerra® constituem uma boa opção para se trabalhar com a separação de aminas, pois sendo feitas de um material híbrido (sílica/polímero) podem suportar um pH de até 11,5 sem haver perda de eficiência (CHENG *et al.*, 2000).

O cromatograma abaixo é referente à uma amostra de atum úmida, sem a presença do analito adicionada de padrão, analisada pelo método gradiente 5 final com adição de 0,001% de trietilamina à fase móvel (Figura 20).

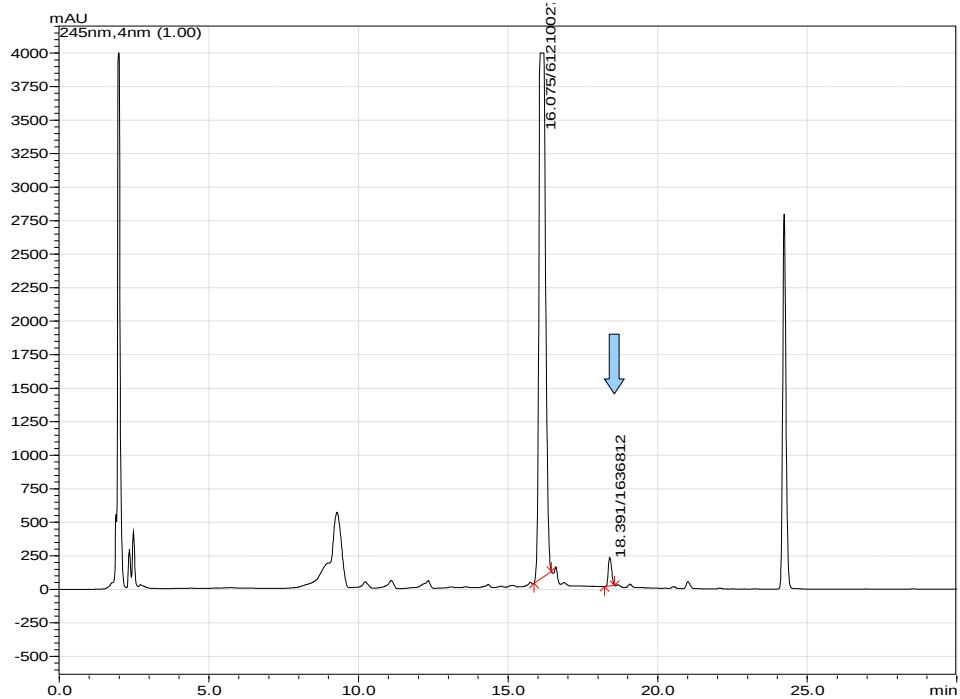


Figura 20: Cromatograma de amostra de atum úmida, acrescentado de $3,381\mu\text{g/mL}$ de padrão realizado no método gradiente 5 final. A seta marca o pico referente à histamina.

Quando da derivatização da amostra de atum liofilizado (amostra seca) não se observou a presença de histamina, então fez-se uma nova derivatização acrescentando padrão de histamina para confirmação e obteve-se o cromatograma mostrado na Figura 21.

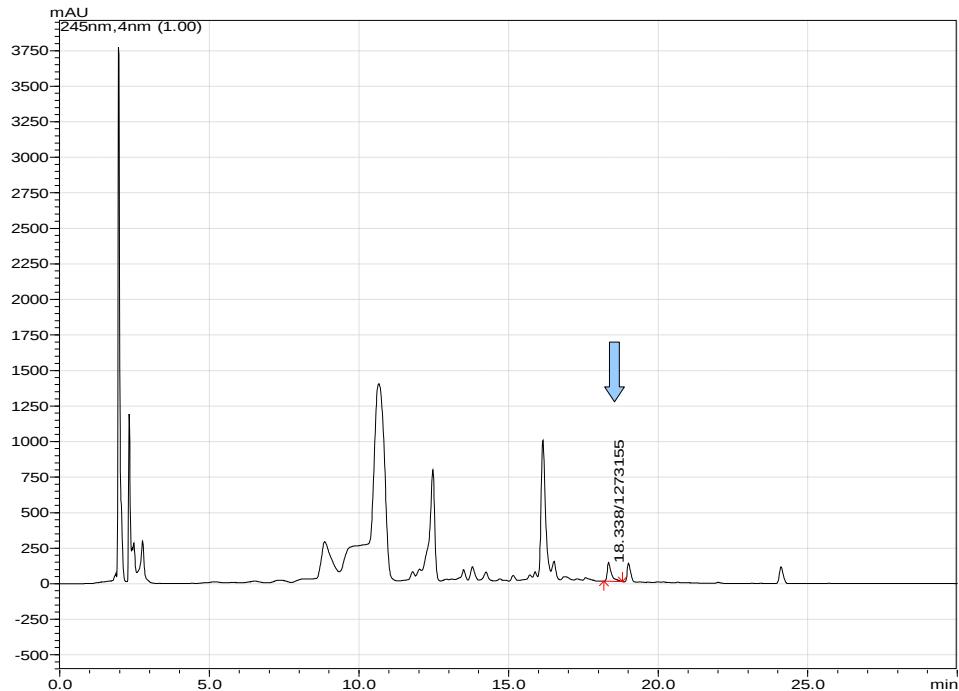


Figura 21: Cromatograma de branco de amostra de atum seca, acrescentado de 3,381 μ g/mL de padrão realizado no método gradiente 5 final. A seta marca o pico referente à histamina.

Observa-se a presença de grande quantidade de interferentes no início da análise, e de pequenos picos próximos ao t_R da histamina. Isso já era esperado, pois como buscou-se desenvolver uma metodologia rápida, a extração não foi seletiva e não foi realizada etapa de limpeza prévia da amostra. O objetivo era desenvolver um método cromatográfico que separasse o pico da histamina dos demais interferentes, possibilitando a correta identificação e quantificação do pico referente à histamina. É importante ressaltar que os outros métodos citados previamente, que não utilizam o AQC como agente derivatizante, não possibilitam a derivatização da amostra sem que seja feita a limpeza prévia da mesma, o que constitui uma grande vantagem desse método de derivatização.

A análise com a amostra liofilizada mostrou um cromatograma com uma concentração maior de interferentes. Isso pode ser notado devido à falta do pico do AMQ absorvendo forte no meio do cromatograma. Provavelmente devido ao consumo do reagente a derivatização resultou num sinal menor da histamina, 1273155. Na análise da amostra úmida foi calculada uma área de 1638812. Por esta razão as análises devem ser feitas preferencialmente com a amostra úmida, ou deve se pesar uma menor quantidade de amostra para realizar a extração quando esta estiver liofilizada.

Buscando melhorar ainda mais a resolução do cromatograma foram feitas outras modificações no método cromatográfico, resultando nos métodos 2, 3 e 4. Entretanto, nenhum desses métodos ofereceu melhoria da resolução em relação ao método 1, além de aumentarem o t_R do aduto da histamina e o tempo total de análise. A modificação de temperatura da coluna de 37°C para 40°C, visando aumento na transferência de massa, também não resultou em melhoria da resolução. Contudo, reduzir o fluxo da análise para 0,8mL/min melhorou significativamente a resolução do cromatograma, afastando o pico do aduto da histamina do pico do AMQ, que por estar em grande quantidade promove uma pequena alteração na linha

de base da região à sua direita, isso resultou no método gradiente 5 final .

Trabalhar com eluições em gradiente iniciando a análise com fase móvel 100% água demanda mais tempo para estabilizar a pressão da coluna ao término de cada análise, passou-se então ao método gradiente 5, que se inicia com 1% de acetonitrila. Essa medida reduziu o tempo de estabilização para 2 minutos, com uma variação ao final desse tempo de não mais que 35psi.

O método final escolhido foi o método gradiente 5, com 0,001% de acetonitrila adicionada à água milliQ®, fluxo 0,8mL/min e forno a 40°C. Nesse método o t_R médio da histamina foi de 18,339 minutos, com um coeficiente de variação de 0,16%. Esse método cromatográfico para histamina é um dos poucos desenvolvidos até agora que não utilizam tampão para a eluição, o que elimina os problemas relacionados com a utilização de sais na fase móvel, principalmente a precipitação e o entupimento do sistema ou deposição na coluna.

A detecção do analito utilizando DAD apesar de oferecer uma resolução menor e maior ruído da linha de base do que a detecção por fluorescência satisfaz perfeitamente as necessidades da metodologia de análise de histamina desenvolvida, dispensando o uso de detector de fluorescência.

5.4 Parâmetros de Validação

5.4.1 Seletividade

Na validação de métodos analíticos, deve-se avaliar a sua seletividade ou a sua especificidade. Diz-se especificidade quando o método em questão oferece resposta apenas ao analito, ignorando os outros componentes da amostra. Quando o método responde à outras substâncias além do analito fala-se em seletividade. O objetivo desse ensaio é verificar se os outros componentes da matriz que oferecem resposta do detector interferem na detecção do analito, podendo dessa forma levar a resultados inexatos.

As Figuras 22 e 23 representam as curvas de calibração do padrão e da amostra com adição-padrão, respectivamente.

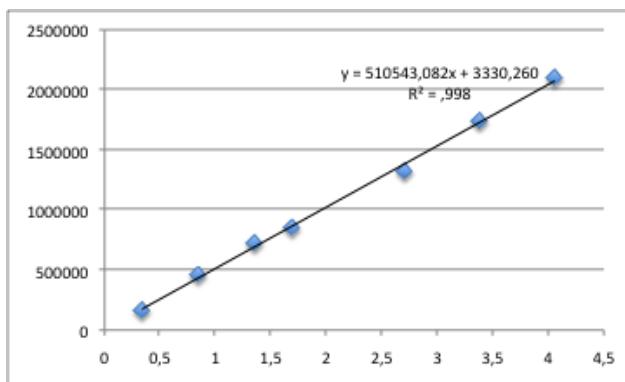


Figura 22: Curva de calibração feita com padrão. Média dos valores em triplicata.

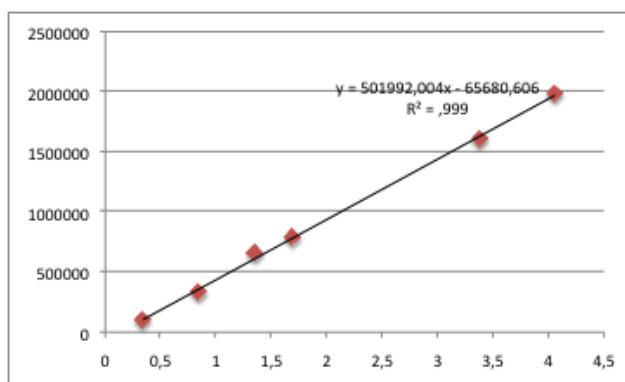


Figura 23: Curva de calibração por adição-padrão em branco da amostra. Média dos valores em triplicata.

Apesar da pequena diferença de seletividade observada, que nos gráficos pode ser interpretado como a diferença nas médias dos coeficientes angulares das duas curvas (valor que acompanha a variável X), ela não foi considerada significativa pelo teste *t* de Student ($p > 0,05$). Na Figura 24 pode-se observar que o coeficiente de inclinação da curva por adição-padrão é um pouco menor que o da curva com padrão. Entretanto, essa diferença não alterou significativamente a seletividade, portanto, estatisticamente não há efeito matriz no método desenvolvido. Quando é verificada a existência do efeito matriz é importante que a curva de calibração seja feita utilizando o branco da amostra, para que não haja erros de exatidão

devido à menor sensibilidade do detector ao analito na presença das outras substâncias da matriz.

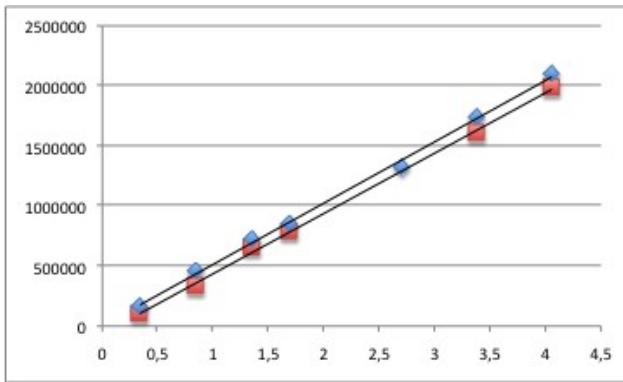


Figura 24: Comparação das curvas de calibração do padrão e adição-padrão.

É importante ressaltar que esses resultados podem ser diferentes se for utilizado na análise injetor automático. Esses injetores oferecem precisão maior à análise, resultando em variâncias menores. Como a variância é um dos parâmetros avaliados no teste t de Student para verificação da significância da diferença entre dois grupos de dados, com variâncias menores o t calculado tende a ser maior, o que pode gerar diferenças significativas entre as duas curvas comparadas acima.

5.4.2 Linearidade

O coeficiente de correlação linear de ambas as curvas de calibração foi satisfatório, com r^2 maior que 0,99. Para a construção da curva foram descartados três valores aberrantes que correspondiam a um mesmo ponto na curva de calibração com padrão.

As variáveis foram consideradas homogêneas e com o auxílio do gráfico de resíduos fez-se uma busca por valores que poderiam não pertencer à curva (Figura 25).

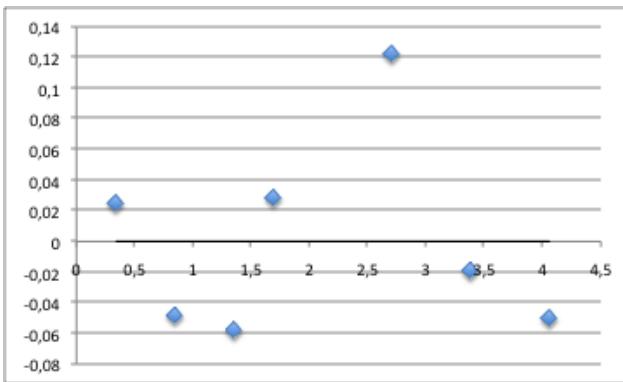


Figura 25: Gráfico de resíduos da curva de calibração padrão.

Observando o gráfico de resíduos foi identificado um ponto suspeito, 0,12227996. O t calculado para este ponto foi de 1,321 e o tabelado para um nível de significância de 95% e grau de liberdade seis é de 2,447, logo, como o t calculado é menor que o tabelado o resíduo suspeito pertence à curva.

Pelo gráfico da Figura 25, acima, pode-se observar também que não há tendência dos pontos da curva de calibração em se situarem em um dos lados da curva, mostrando que a metodologia desenvolvida não tende a dar um determinado resultado.

Os resultados acima mostram que a metodologia oferece linearidade em toda a faixa de trabalho selecionada, não sendo tendenciosa.

5.4.3 Sensibilidade

A sensibilidade calculada foi de 510745. Observando a inclinação da reta do gráfico da Figura 22 nota-se que o método oferece boa sensibilidade. Uma reta com uma pequena inclinação indica uma pequena sensibilidade do método, ou seja, o equipamento não é capaz de diferenciar uma pequena variação na concentração da solução injetada. Essa resposta é atribuída ao detector. Nesse caso o detector de arranjo de diodos utilizado oferece sensibilidade satisfatória a análise de histamina pelo método desenvolvido.

5.4.4 Limite de detecção

O limite de detecção calculado foi de $0,02\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 1,6 mg/Kg de histamina na amostra de atum extraída de acordo com o método desenvolvido no trabalho. Esse valor é bastante satisfatório, tendo em vista o limite de 100mg/Kg previsto na legislação.

5.4.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação estipulado foi o menor ponto da curva de calibração, ou seja, $0,423\mu\text{g/mL}$ o que corresponde à uma quantidade de 33,84mg/Kg de histamina na amostra de atum extraída de acordo com o método desenvolvido no trabalho.

Apesar de parecer alto, esse limite de quantificação é satisfatório, pois está bem abaixo do valor máximo permitido pela legislação brasileira, 100mg/Kg.

5.4.6 Repetitividade

A média das áreas, foi de 1711176, o desvio padrão foi 47107, com um coeficiente de variação de 2,8%.

Análises feitas com injeção manual normalmente possuem desvio padrão maior do que as realizadas por um injetor automático. Os injetores automáticos são bem mais precisos, entretanto os valores obtidos com a injeção manual satisfazem a necessidade da metodologia desenvolvida.

5.5 Análise das Amostras de Atum

Em todas as nove amostras de atum enlatado analisadas, não foram encontrados índices de histamina acima do limite de detecção, indicando que todas as três marcas avaliadas estavam em conformidade com a legislação nacional. A liofilização das amostras também não resultou em aparecimento de pico acima do limite de detecção na região que corresponde ao t_R da histamina, entretanto, aumentou o ruído da linha de base, aumentando o limite de detecção.

A formação de histamina em pescados é extremamente dependente do tempo e

temperatura de armazenamento, por isso as quantidades de histamina em amostras de pescados é muito variável, muitas vezes, estando abaixo dos limites de detecção dos métodos (KIM, 2009; CHEN, 2008).

6 CONCLUSÃO

A metodologia final desenvolvida para análise de histamina em atum satisfaz as necessidades legais exigidas pelos órgãos nacionais e internacionais de vigilância sanitária, oferecendo limites de detecção e quantificação bem abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação. É rápida, de fácil manipulação por analistas treinados e gera derivados estáveis. Dispensa o uso de tampões a detecção opcional por fluorescência a 254nm de excitação e 395nm de emissão aumenta a sensibilidade, a razão sinal/ruído e elimina interferentes na análise. A metodologia desenvolvida foi:

- Extração:

Cerca de 5g da amostra homogeneizada extraída com 20mL de ácido perclórico 6% sob agitação em vórtex, seguido de centrifugação e filtração.

- Derivatização:

A proporção volume de secagem : volume de ressuspensão deve ser 1:2. Deve-se utilizar para a reação 10µL da amostra ressuspandida, 60µL do tampão borato e 30µL do AQC.

- Cromatografia:

Eluição gradiente, utilizando acetonitrila e água adicionada de 0,001% de trietilamina de acordo com a Tabela 5. Coluna XTerra® RP18 5µm, 4,6 X 150mm, fluxo 0,8mL/min, forno da coluna a 40°C, volume de injeção 20µL e detecção a 245nm.

Os parâmetros de validação avaliados demonstraram que o método é confiável, tendo como perspectiva ser repassado futuramente ao INMETRO, após ensaios de recuperação, para uma validação interlaboratorial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTO, M. R.; ARENA, M. E.; NADRA, M. C. M. de A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. **Food Control**, v. 13, p. 125-129, 2002.
- ANTOINE, F. R. *et al.* Gas Chromatographic Analysis of Histamine in Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4754-4759, 2002.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997**. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado). Brasília: Ministério da Agricultura, 1997.
- BUSTO, O.; GUASCH, J.; BORRULL, J. Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. **Journal of Chromatography A**, v. 737, p. 205-213, 1996.
- CAMPOS, R. S. **Estudo da Derivatização Pré-coluna com 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato para Análise de Aminoácidos em Alimentos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.
- CHANG, S. C. *et al.* Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. **Food Control**, v. 19, p. 16-21, 2008.
- CHEN, H.-C. *et al.* Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. **Food Chemistry**, v. 106, p. 612-618, 2008.
- CHENG, Y.-F. *et al.* Hybrid Organic-Inorganic Particle Technology: Breaking Through Traditional Barriers of HPLC Separations. **LCGC**, v. 18, n.11, p. 1162-1172, 2000.
- CINQUINA, A. L. *et al.* Validation and comparison of analytical methods for the

determination of histamine in tuna fish samples. **Journal od Chromatogrphy A**, v. 1032, p. 79-85, 2004.

COHEN, S. A.; DE ANTONIS, K. M. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate: Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. **Journal of Chromatography A**, v. 661, p. 25-34, 1994.

_____.; MICHAUD, D. P. Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 211, p. 279-287, 1993.

EMBORG, J.; DALGAARD, P. Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation os psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases os histamine fish poisoning. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 4, p. 897-906, 2006.

_____.; LAURSEN, B. G.; DALGAARD, P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C - effect of vacuum - and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 263-279, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Decomposition and histamine in raw, frozen tuna and mahi-mahi, canned tuna; and related species. **Compliance Policy Guides**, 7108.240 (Section 540.525) 1996.

FELDMAN, K. A. *et al.* A large outbreak of scombroid fish poisoning associated with eating escolar fish (*Lepidocybium flavobrunneum*). **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 1, p. 29-33, 2005.

GENNARO, M. C. *et al.* A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). **Food Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 245-251, 2003.

GOSETTI, F. *et al.* High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, n. 2, p. 151-157, 2007.

HERNÁNDEZ-ORTE, P. *et al.* Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 160-164,

2006.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, n. 2, p. 331-343, 1995.

HUSS, H. H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Documento Técnico sobre as pescas, n. 334. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Roma, 1997. 176p.

HWANG, B.-S.; WANG, J.-T.; CHOONG, Y.-M. A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products. **Food Chemistry**, v. 82, p. 329-334, 2003.

INNOCENTE, N. *et al.* Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. **Food Chemistry**, v. 1, p. 1285-1289, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO) **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químico**, Rio de Janeiro, DOQ-CGCRE-008, 25p., 2007.

JAY, J. M. Frutos do Mar. In: _____. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 6.

KANKI, M. *et al.* *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 79-87, 2004.

KIM, M.-K.; MAH, J.-H.; HWANG, H.-J. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. **Food Chemistry**, v. 116, p. 87-95, 2009.

KOVÁCS, A.; SIMON-SARKADI, L.; GANZLER, K. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 836, p. 305-313, 1999.

LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 223-232, 2004.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food**

Microbiology, v. 58, p. 1-37, 2000.

LOUKOU, Z.; ZOTOU, A. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylatedamines by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 996, p. 103-113, 2003.

MALLE, P.; VALLÉ, M. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 1, 1996.

MARCO, A. G.; AZPILICUETA, C. A. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. **Food Chemistry**, v. 99, p. 680-685, 2006.

MERCOSUL/GMC/RES N° 40/94. Identidade e qualidade do peixe fresco. **XIV Reunião do Grupo Mercado Comum**. Buenos Aires, 1994.

MIRANDA, S.H.G de *et al.* Normas sanitárias: proteção ou protecionismo. **Informações Econômicas**, v.34, n.2, p.25-35, 2004.

MO DUGO, G. *et al.* Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. **Food Chemistry**, v. 95, p. 672-676, 2006.

NELSON, W. L. Antihistamines and Related Antiallergic and Antiulcer Agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5 ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2002, cap. 33.

OLIVEIRA, H. A. C. de *et al.* Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 179-188, 2004.

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.; ÖZOGUL, Y.; KULEY, E. Nucleotide degradation and biogenic amine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chill temperature (4°C). **Food Chemistry**, v. 108, p. 933-941, 2008.

PALEOLOGOS, E. K.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Food Microbiology**, v. 21, p. 549-557, 2004.

PATANGE, S. B.; MUKUNDAN, M. K.; KUMAR, K. A. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. **Food Control**, v. 16, p. 465-472, 2005.

RASFF. **The Rapid Alert System for Food and Feed Annual Report**, 2003-2007. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm>. Acesso em 23 jan. 2009.

REGULATION (EC). Commission Regulation (EC) n° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of European Union**, L 338/1-26, 2005.

REGULAMENTO (CE) n° 178/2002 de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos gêneros alimentícios . **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, L 31/1, 2002.

ROSSANO, R *et al.* Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicholus* (L., 1758): a study by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 830, n. 1, p. 161-164, 2006.

SACCANI, G. *et al.* Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 43-50, 2005.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SILVA, C. R. *et al.* Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SIMÓ, C.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; CIFUENTES, A. Ion-trap versus time-of-flight mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis to analyze biogenic amines in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 150-156, 2008.

SOUFLEROS, E. H. *et al.* Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. **Food Chemistry**, v. 101, p. 704-716, 2007.

SOUZA, S. V. C. *et al.* Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermentinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 4, p. 823-836, 2007.

SPERS, E. E.; KASSOUF, A. L. A Segurança dos alimentos: uma preocupação crescente. **Revista Higiene Alimentar**, v.v10, n. 44, p. 18-19, 1996.

TAYLOR, S. L. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. **Clinical Toxicology**, v. 27, p. 225–240, 1989.

_____. Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 17, p. 91–117, 1986.

_____. HUI, J. Y.; LYONS, D. E. Toxicology of scombroid poisoning. In: Ragelis, E. P. (Ed.) **Seafood Toxins**. Washington: American Chemical Society, 1984, p. 147-430.

THOMPSON, M.; ELLION, S.R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods Analysis. **Pure and Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.

VALE, S.; GLÓRIA, M. B. A. Biogenic Amines in brazilian cheeses. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 343-348, 1998.

VALLÉ, M.; MALLE, P.; BOUQUELET, S. Optimization of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Amines in Fish. **Journal of AOAC International**, v. 80, n 1, p. 49-56 , 1997.