EMY TAKEMOTO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADOS *IN NATURA* E EM CONSERVAS

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga, SP

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

T136d

Takemoto, Emy
Desenvolvimento de metodologia por cromatografia líquida de ultra eficiência para determinação de histamina em pescados in natura e em conservas / Emy Takemoto. -- Pirassununga, 2016.
106 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.

1. CLUE 2. Método 3. Peixe 4. Histamina. I. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor"

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e aos meus guias espirituais que me deram saúde, força, coragem, humildade e perseverança para cumprir mais uma etapa da minha vida.

Aos membros da banca pelas opiniões, correções e sugestões.

Ao professor Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pelo apoio, compreensão, orientação e pela total liberdade para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço a professora Dra. Judite Lapa-Guimarães pelo carinho com que me recebeu na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela amizade, sugestões e correções no decorrer deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação e da Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

À Josefa Estela da Conceição Reis e Sandra Fagundes Coutinho Santana, pela amizade e cooperação neste trabalho, funcionárias do Núcleo de Química, Física e Sensorial do Instituto Adolfo Lutz.

A minha Diretora, Regina S. Minazzi Rodrigues pelo apoio.

Ao Instituto Adolfo Lutz por permitir a realização deste trabalho.

À minha amiga, pesquisadora Maria Cristina Santa Barbara pela realização das análises do teor de 2-mercaptoetanol e pelas valiosas sugestões para as medidas de pH.

À pesquisadora Dra. Cristiane Bonaldi Cano pelas discussões enriquecedoras sobre cromatografia líquida, amizade e incentivo.

À pesquisadora Maria de Fátima Henriques Carvalho pelo auxilio na revisão do cálculo de incerteza da medida do método.

Ao Manuel, Claudio, Pedro, Katia, Mislene, Tereza, Solange, Jacira e Maritânia por me auxiliarem na compra do pescado *in natura* em feiras.

À pesquisadora Sabria Aued Pimentel por me apoiar e incentivar sempre.

A todos os funcionários do Núcleo de Química, Física e Sensorial do Instituto Adolfo Lutz.

À Dra. Alice M. Sakuma, coordenadora do projeto FINEP Convênio 01.12.0100.00 IAL pelo apoio.

À FINEP pelo apoio financeiro (Projeto FINEP Convênio 01.12.0100.00 IAL) para a aquisições dos equipamentos e de insumos.

À minha diretora do Centro de Alimentos, Deise A. P. Marsiglia, coordenadora do projeto Renali com apoio FINEP Convênio Referência 1091/2010 pelo apoio.

À Renali com o apoio financeiro da FINEP (Convênio Referência 1091/2010) para a aquisição de alguns insumos.

RESUMO

TAKEMOTO, E. **Desenvolvimento de metodologia por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência para determinação de histamina em pescados *in natura* e em conservas.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

No Brasil, o consumo de pescado *in natura* cresce a cada ano e sua ingestão tem sido associada a problemas de saúde, principalmente, surtos de intoxicação alimentar causado pela histamina, podendo representar risco à saúde do consumidor. A histamina pode provocar erupções na pele, náuseas, dor de cabeça, palpitações, vômitos, dores abdominais, distúrbios respiratórios e taquicardia. O Brasil exporta pescado para os principais mercados consumidores e tem enfrentado barreiras comerciais pela exigência de análises de histamina, com a finalidade de assegurar a qualidade do pescado exportado. Assim sendo, foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) para a determinação dos teores de histamina em peixes. O método desenvolvido mostrou ter boa linearidade, seletividade, exatidão e precisão, ser robusto e com os limites de detecção e quantificação determinados de 0,03 $\mu g\ mL^{-1}$ e 0,10 $\mu g\ mL^{-1}$, respectivamente. A metodologia foi aplicada a amostras de pescados (atum e sardinha) *in natura* e em conservas. Das 12 amostras analisadas de atum *in natura* somente uma apresentou teor de histamina de 1,07 $mg.kg^{-1}$, 05 amostras de sardinha *in natura* apresentaram teores de 26,81, 0,35, 37,25, 9,97 e 0,94 $mg\ kg^{-1}$, respectivamente. Nas amostras de atum em conserva, 02 apresentaram teores de 1,30 e 0,13 $mg\ kg^{-1}$. Enquanto que, 04 amostras de sardinha em conserva continham teores de histamina de 2,49, 68,96 e 11,66 $mg\ kg^{-1}$, e uma das amostras de sardinha em conserva estava com o teor muito acima, cerca de 17 vezes do limite máximo estabelecido pelo MAPA, de 100 $mg\ kg^{-1}$ para conservas de sardinha. Essa quantidade de histamina encontrada pode sugerir a ocorrência de uma intoxicação, representando risco à saúde humana. Além disso, foi calculada a incerteza de medição, pois garante uma maior confiabilidade dos resultados analíticos para tomadas de decisões importantes em Vigilância Sanitária e Saúde Pública.

PALAVRAS-CHAVE: CLUE, método, peixe, histamina.

ABSTRACT

TAKEMOTO, E. **Development methodology for Ultra High Performance Liquid Chromatography for histamine determination fish in fresh and canned.** Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

In Brazil, the consumption of fish in nature grows every year and its intake has been linked to health problems, especially food poisoning outbreaks caused by histamine, which may pose a risk to consumer health. Histamine can cause skin rashes, nausea, headache, palpitations, vomiting, abdominal pain, respiratory disorders and tachycardia. Brazil exports fish to the main consumer markets and has faced trade barriers by requiring histamine analysis, in order to ensure the quality of exported fish. Thus, it was a method developed and validated liquid chromatography ultra efficiency (CLUE) for determining histamine levels in fish. The method was proven to have good linearity, selectivity, accuracy and precision and be robust with the limits of detection and quantification of certain 0,03 ug mL^{-1} and 0.10 ug mL^{-1}, respectively. The methodology was applied to fish samples (tuna and sardines) in fresh and canned. Of the 12 samples analyzed tuna in fresh only one showed histamine content of 1.07 $mg.kg^{-1}$, 05 sardine in fresh samples showed levels of 26.81, 0.35, 37.25, 9.97 and 0.94 mg kg^{-1}, respectively. In the samples of canned tuna, 02 showed levels of 1.30 and 0.13 mg kg^{-1}. While 04 canned sardines containing histamine concentrations of 2.49, 68.96 and 11.66 mg kg^{-1}, and one sample canned sardine content was much higher, about 17 times higher than the maximum limit established by MAPA, 100 mg kg^{-1} for canned sardine. This amount of histamine found may suggest the occurrence of intoxication, representing a risk to human health. In addition, the measurement uncertainty was calculated as it ensures a higher reliability of the analytical results for taking important decisions on Health Surveillance and Public Health.

KEYWORDS: UHPLC, method, fish, histamine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formação de aminas bioativas a partir dos aminoácidos precursores. 24

Figura 2 – Estrutura química de algumas aminas. 25

Figura 3 – Erupções na pele causadas por intoxicação histamínica por peixe da família Scombridae. 30

Figura 4 – Variação na formação de histamina em diferentes regiões do atum 34

Figura 5 – Concentração de histamina em diferentes espécies de peixes nas 72 amostras de alimentos implicados nos surtos ocorridos no Japão (1998 2008). 37

Figura 6 – Modelo químico da reação de par iônico. 41

Figura 7 – Perfil cromatográfico das dez aminas bioativas mais comumente encontradas nos alimentos (CLAE-par iônico, coluna C18 e gradiente de eluição de tampão acetato: acetonitrila). 42

Figura 8 – Reação de amina com *o*-ftalaldeido – OPA. 45

Figura 9 – Fluxograma da extração das aminas biogênicas do pescado. 47

Figura 10 – Cromatograma de histamina extraído do MR FAPAS utilizando FM A com diferentes valores de pHs. 58

Figura 11 – Cromatograma de histamina (MR FAPAS) utilizando diferentes temperaturas. 58

Figura 12 – Cromatograma de padrões de aminas biogënicas 59

Figura 13 – Sistema cromatográfico com o reator de pós-derivatização 60

Figura 14 – Resultados do derivado de histamina utilizando vários formatos de coils. 62

Figura 15 – Gráfico de Pareto do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} obtido para determinação de histamina (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança) e Superfície de resposta. 66

Figura 16 – Gráfico normal dos contrastes 68

Figura 17 – Comparação da inclinação das curvas de histamina em ácido clorídrico e na matriz. 71

Figura 18 – Gráfico de resíduos. 72

Figura 19 – Diagrama de Causa-e-Efeito 77

Figura 20 – Contribuição para incerteza da concentração de histamina obtida no pescado 84

Figura 21 – Cromatogramas do padrão de histamina (A) e da amostra de sardinha em conserva contendo histamina (B). 88

Figura 22 – Presença de triptamina e espermidina na amostra de sardinha em conserva. 88

Quadro 1 Critério de aceitação da recuperação e dos valores de CV em relação à concentração de analito. 55

Equação 1 – Cálculo da Recuperação. 55

Equação 2 – Cálculo do Limite de detecção. 56

Equação 3 – Cálculo do Limite de quantificação. 56

Equação 4 – Modelo gerado na robustez 68

Equação 5 – Cálculo da Determinação da concentração da histamina no pescado. 76

Equação 6 – Cálculo da Incerteza padrão Massa da amostra. 77

Equação 7 – Cálculo da Incerteza padrão associada à calibração da balança. 77

Equação 8 – Cálculo da Incerteza padrão associada à massa do pescado. 78

Equação 9 – Cálculo da Incerteza padrão associada à calibração do balão volumétrico. 78

Equação 10 – Cálculo da variação do volume. 79

Equação 11 – Calculo da incerteza devido à influência da temperatura. 79

Equação 12 – Cálculo da Incerteza padrão associada ao volume do balão volumétrico. 79

Equação 13 – Cálculo da incerteza associada à regressão da curva analítica. 80

Equação 14 – Cálculo do *S.* 81

Equação 15 – Cálculo do S_{xx}. 82

Equação 16 – Determinação da incerteza padrão associada à regressão da curva analítica com ajuste linear para a concentração de histamina em pescado. 82

Equação 17 – Cálculo da incerteza padrão combinada da concentração de histamina em pescado. 84

Equação 18 – Cálculo do número de graus de liberdade efetivos pela equação de Welch-Satterthwaite. 85

Equação 19 – Cálculo da incerteza expandida associada à concentração de histamina no pescado 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nível de histamina relatada em surtos de intoxicação histamínica.....39
Tabela 2 – Composição da Fase móvel A.....51
Tabela 3 – Composição da Fase móvel B de Latorre et al. (2009).....51
Tabela 4 – Composição do reagente de derivatização.....52
Tabela 5 – Planejamento fatorial 2^{4-1} para as amostras de pescado fortificada com histamina (10,0 µg.mL^{-1}).....64
Tabela 6 – Análise estatística da significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações.....65
Tabela 7 – Resultados da ANOVA.....65
Tabela 8 – Valores obtidos do teste de Grubbs para os Grupo 1 e Grupo 2.....70
Tabela 9 – Dados obtidos das recuperações e da precisão nas concentrações 0,75 µg.mL^{-1} e 15 µg.mL^{-1}.....75
Tabela 10 – Intensidade das soluções padrão.....79
Tabela 11 – Dados para substituição na equação 14.....80
Tabela 12 – Resultados parciais para determinação de S.....81
Tabela 13 – Cálculos para a determinação de S_{xx}.....82
Tabela 14 – Fontes de incerteza e respectivas porcentagens de contribuição para a incerteza total.....83
Tabela 15 – Resultados do teor histamina em atum em conserva.....87
Tabela 16 – Resultados do teor histamina em sardinha em conserva.....87
Tabela 17 – Resultados do teor histamina em atum *in natura*.....89
Tabela 18 – Resultados do teor histamina em sardinha *in natura*.....90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADP	Adenosina difosfato
AGM	Agmatina
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AQC	6-Aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato
ATP	Adenosina-trifosfato
bal	balança
BRIJ	Éter dodecil polioxietileneglicol
BVT	Base Nitrogenada Volátil Total
C	Concentração
CAD	Cadaverina
cal	Calibrado
calc	calculado
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	Comunidade Européia
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
cm	Centimetro
CV	Coeficiente de Variação
DAO	Diaminoxidase
DHA	Docosahexaenóico
DMA	Dimetilamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Eletroforese Capilar
EFSA	European Food Safety Authority
EM	Espectrometria de Massas
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPD	Espermidina
EPM	Espermina
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food Agriculture Organization
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FDA	Food and Drug Administration
FEM	Feniletilamina
FL	Fluorescência
FM	Fase móvel
FMOC	9-Fluorenilmetil cloroformato
g	grama
GUM	Guide to the expression of Uncertainly in Measurement
H_3BO_3	Ácido bórico
HDC	Histidina descarboxilase
HIM	Histamina
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IMP	Inosina monofosfato
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO	International Standardization Organization
JCGM	Joint Committee for Guides in Metrology
kg	quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molar
mM	Milimolar
MAO	Monoaminoxidase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCE	Mercaptoetanol
MDCI	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
mg	miligrama
min	minutos
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milimetro
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MMQ	Método dos Mínimos Quadrados
MR	Material de Referência
N	Nitrogênio
nm	nanômetro
NATA	National Association of Testing Authorities
NOAEL	Nível de Efeito Adverso Não Observado
ODS	Octadecilsilano
OPA	*Orto*-ftalaldeído
PAO	Poliaminoxidase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIC	Cromatografia de Par Iônico
ppm	Partes por milhão
PUT	Putrescina
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
Rs	Resolução
RSD	Desvio Padrão Relativo
RSD_r	Desvio Padrão Relativo da Repetibilidade
RSD_R	Desvio Padrão Relativo da Reprodutibilidade
s	Desvio Padrão
SRT	Serotonina
TCA	Ácido tricloroacético
temp	Temperatura
TIM	Tiramina
TMA	Trimetilamina
TRM	Triptamina
UK	United Kingdom
UE	União Européia
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
UV	Ultra-violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

a = Bo	Coeficiente linear
A_j	j-ésima medida de resposta do i-ésimo padrão
b = B_1	Coeficiente angular
c_j	concentração j-ésimo padrão de histamina
C_o	Concentração obtida a partir da curva analítica
C_{his}	Concentração de histamina
C médio ($\overline{c}$)	Valor médio dos diferentes padrões de calibração
C_{Co}	Derivada parcial da concentração de histamina obtida a partir da curva analítica
G	Valor de Grubbs
F	Estatística crítica de Fischer
k	Fator de Abrangência
$m_{am.}$	Massa da amostra
n	número de medições para a curva de calibração
o	orto
p	Valor-p
p = N	número de medições para determinar C_o
R	Coeficiente de Correlação de Pearson
r^2	Coeficiente de Determinação
S = Sy	Desvio padrão residual da reta
S_{xx}	Soma quadrática
ufc	Unidade de formação de colônias
µg	Micrograma
µm	Micrometro
U	Incerteza expandida
v/v	Volume por volume
V_f	Volume final
V_o	Volume do balão volumétrico
y	Média das áreas da amostra
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
γ	coeficiente de expansão da água
ΔT	Variação da temperatura
u	Incerteza padrão
$u(C_o)$	Incerteza padrão associada à regressão da curva analítica
$u_{C_{C_{his}}}$	Incerteza combinada da concentração de histamina
$u_{m_{am.}}$	Incerteza padrão associada à massa da amostra
$u_{V_{extr.}}$	Incerteza padrão associada à volumetria da extração
$V_{extr.}$	Volumetria da extração
ν_{eff}	Graus de liberdade efetivos de Welch-Satterthwaite
∞	Infinito
∂	Derivada

SUMÁRIO

1 *INTRODUÇÃO* 17
2 *OBJETIVOS* 20
3 *REVISAO DA LITERATURA* 21
3.1 ASPECTOS DA QUALIDADE DO PEIXE 21
3.2 AMINAS BIOATIVAS 23
3.2.1 Definição e classificação das aminas biogênicas 23
3.2.2 Formação das aminas biogênicas 26
3.2.3 Funções das aminas biogênicas 27
3.2.4 Implicações toxicológicas das aminas biogênicas 28
3.2.5 Aminas biogênicas como critério de qualidade 30
3.2.6 Produção de histamina em pescados 31
3.2.7 Efeito do processamento de pescado sobre a produção histamina 35
3.3 INTOXICAÇÃO HISTAMÍNICA 36
3.3.1 Ocorrência de surtos envolvendo o consumo de pescado 36
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS 39
3.4.1 Extração 40
3.4.2 Separação cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 40
3.4.3 Separação cromatográfica por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência 42
3.4.4 Método de detecção 44
3.4.4.1 Detecção por fluorescência 44
4 *MATERIAL E MÉTODO* 46
4.1 MATERIAL 46
4.2 MÉTODO DE ANÁLISE 48
4.2.1 Determinação de histamina por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detecção por Fluorescência 48
4.2.2 Instrumentação 48
4.2.3 Soluções padrões 49
4.2.4 Condições cromatográficas 49
4.2.4.1 Fases móveis 49
4.2.4.2 Reagente de derivatização 50

4.2.5 Otimização das condições cromatográficas para a separação de histamina e outras aminas por CLUE-FL..... 50
4.2.6 Estudo da robustez..... 51
4.2.7 Validação da metodologia para análise de histamina em pescado por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência-Fluorescência..... 52
4.2.7.1 Parâmetros de desempenho analítico de validação..... 53
4.2.7.1.1 Seletividade..... 53
4.2.7.1.2 Linearidade e/ou faixa de trabalho..... 53
4.2.7.1.3 Precisão..... 54
4.2.7.1.4 Exatidão..... 54
4.2.7.1.5 Limites de detecção e quantificação..... 55
4.2.8 Cálculo de incerteza da medição..... 56
4.2.9 Aplicação da metodologia na quantificação de histamina em pescados.. 56
5 *RESULTADOS E DISCUSSÕES*..... 57
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A SEPARAÇÃO DE HISTAMINA E OUTRAS AMINAS POR CROMATOGRAIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA PAR IÔNICO, DERIVAÇÃO PÓS COLUNA COM O-FTALALDEÍDO E DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA 57
5.2 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO..... 59
5.3 ESTUDO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA PAR IÔNICO, DERIVAÇÃO PÓS COLUNA COM *O*- FTALALDEÍDO E DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA..... 62
5.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE HISTAMINA EM PESCADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA..... 69
5.4.1 Seletividade..... 69
5.4.2 Linearidade e/ou faixa de trabalho..... 71
5.4.3 Limites de detecção e quantificação 73
5.4.4 Precisão..... 74
5.4.5 Exatidão..... 74
5.5 CÁLCULO DE INCERTEZA DA MEDIÇÃO..... 75
5.5.1 Especificação do mensurando..... 76
5.5.2 Identificação das fontes de incerteza pelo diagrama de causa-e-efeito... 76
5.5.3 Quantificação dos componentes de incerteza..... 77
5.5.4 Contribuições percentuais das fontes de incertezas..... 83
5.5.5 Determinação da incerteza padrão combinada da concentração de

histamina em pescado..... 84
5.5.6 Determinação da incerteza expandida..... 86
5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NA QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADOS..... 86
6 *CONCLUSÕES*..... 91
REFERÊNCIAS..... 92

1 INTRODUÇÃO

Em função da globalização, mudanças na alimentação vêm sendo adotadas no mundo inteiro. Assim, novos hábitos alimentares têm sido introduzidos, dentre estes, o de consumir peixes frescos *in natura*, resfriados ou congelados, principalmente atum devido à influência da culinária japonesa. No Brasil, o consumo de pescado *in natura* cresce a cada ano, sendo o peixe cru (sushi e sashimi) disponibilizado em estabelecimentos especializados (MOURA FILHO et al., 2007). Dados estatísticos da FAO (2012) evidenciam aumento na produção mundial da pesca e da aquicultura de 140,7 milhões de toneladas em 2007 para 158,0 milhões de toneladas em 2012. Destacam-se as capturas de atum e espécies afins que estabeleceram um novo recorde de mais de 7 milhões de toneladas em 2012, sendo o atum *skipjack* (*Katsuwonus pelamis*) uma das espécies mais capturadas, ocupando o 3º lugar no *ranking* de captura marinha, e as capturas de Sardinellas Nei (*Sardinella* spp), o 4º lugar, de 23 espécies e gêneros. Essas 23 espécies e gêneros representam cerca de 40% do total mundial de captura marinha (FAO, 2012).

Segundo a FAO (2012), o Brasil tem melhorado seu *ranking* global nos últimos anos, ocupando o 10º lugar na captura em águas continentais brasileiras ("inland Waters"). Sua produção em 2003 era de 227.551 mil toneladas passando para 266.042 mil toneladas em 2012.

No Brasil, o atum responde por 13% do valor total das exportações. Entre janeiro e agosto de 2012, o Brasil obteve recorde nas exportações de atuns, segundo dados do Sistema Integrado de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (SISCOMEX/MDIC). As 13,5 mil toneladas exportadas em 2012 superaram as duas maiores exportações registradas nos últimos 10 anos: 10,8 mil toneladas em 2011 e 9,8 mil toneladas em 2002 (BRASIL, 2013). Apesar de o Brasil ser exportador desse produto, a produção ainda é insuficiente e, grande parte do atum consumido é importada de outros países (BRASIL, 2010).

Outra espécie muito consumida pelos brasileiros é a sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) da família *Clupeidae*. É um dos mais importantes recursos pesqueiros capturados ao longo da plataforma continental do Sudeste-Sul do Brasil entre o Cabo de Santo Tomé e o Cabo de Santa Marta Grande (DALLAGNOLO; SCHWINGEL; PEREZ, 2010). A produção brasileira em 2009 foi de 83.920 mil toneladas (CERGOLA; NETO, 2011), entretanto, segundo Dallagnolo; Schwingel;

Perez (2010) a produção tem condicionado a necessidade de importação de sardinha pelas empresas enlatadoras de Santa Catarina, as quais necessitam de um volume mínimo para atender suas demandas de produção de pescado enlatado.

Os peixes, em geral, são muito perecíveis em comparação com outros produtos de origem animal, devido não só às suas características intrínsecas, mas também ao *habitat* natural, obtenção da matéria-prima, transporte, desembarque, processamento, armazenamento e o modo de exposição no varejo. Assim, a elevada atividade de água nos tecidos, a composição química, o teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis, bem como a natureza psicrófila da flora bacteriana, determinam a ocorrência de um conjunto de alterações que rapidamente contribuem para a sua desvalorização ou mesmo rejeição (NUNES et al., 2007; SILVA, 2008; JAY, 2009).

Algumas espécies de peixes apresentam altos] teores de histidina livre na musculatura, segundo o FAO HEADQUARTERS (2012) essas concentrações têm variado de 2.600 a 25.070 mg kg^{-1} de histidina. Como consequência, esses altos níveis de histidina possuem tendência à produção de histamina a partir da descarboxilação deste aminoácido por enzimas descarboxilases de microrganismos, como é o caso do atum pertencente à família *Scombridae*. Teores elevados de histamina e de outras aminas biogênicas no pescado podem causar intoxicação alimentar (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994, HUNGERFORD, 2010). Peixes como o bonito, cavala, albacora, dourado, sardinha, salmão, anchova e arenque são os mais implicados na intoxicação por histamina (SMITH, 1980-81; SHALABY,1996; GOUVEIA, 2009, HUNGERFORD, 2010; FAO HEADQUARTERS, 2012). De acordo com o FDA (2011), o resfriamento rápido do peixe imediatamente após a captura e a manutenção deste sob temperaturas inferiores a 4,4°C é a melhor estratégia para evitar a formação de histamina. Falhas eventuais nesta cadeia podem favorecer o crescimento de microrganismos e a elevação nos teores de histamina (FAO, 2011).

Com base nestas informações existem duas razões para a determinação de histamina em pescado, o seu potencial de toxicidade e a possibilidade de usar os seus teores como indicadores de qualidade em alimentos (ÖNAL, 2007). A União Européia tem exigido análises de histamina para a importação de atuns e afins. Ainda, a qualidade de atuns e afins exportados pelo Brasil para a Europa tem sido fator determinante no estabelecimento de barreiras à exportação do pescado brasileiro. O regulamento CE nº 2073/2005 adotado pela União Européia exigiu certificados de testes laboratoriais para constatar os níveis de metais pesados,

antibióticos e histamina aos exportadores de pescados histaminogênicos, substâncias estas relacionadas à segurança do consumidor (UE, 2005). Para a histamina, a União Européia estabeleceu o limite de 100 a 200 mg kg^{-1}, uma coleta de nove (09) amostras por lote e o uso de cromatografia líquida de alta eficiência na análise da histamina. Para os Estados Unidos, o limite estabelecido para a histamina é de 50 mg kg^{-1} para o pescado no porto e produto enlatado (FDA, 2011) sendo a cromatografia líquida de alta eficiência um dos métodos recomendados. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997) por meio da Portaria 185/1997 da Secretaria de Defesa Agropecuária estabelece nível máximo de histamina de 100 ppm no músculo de peixes frescos das espécies pertencentes às famílias *Scombridae, Scombresocidae, Clupeidae, Coryyphaenidae.* Assim como, para as conservas de atuns e bonitos e sardinhas, o nível de histamina no produto final não deve ser superior a 100 mg kg^{-1}, tomando como base a média das amostras analisadas; e nenhuma unidade da amostra pode apresentar resultado superior a 200 mg kg^{-1} (BRASIL, 2011).

Vários métodos têm sido propostos para a análise de histamina em pescado tais como: cromatografia em camada delgada (CCD) (LIEBER; TAYLOR, 1978; LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004), cromatografia gasosa (CG) (HWANG, WANG; CHOONG, 2003), eletroforese capilar (EC) (GALLARDO et al., 1997; ZHANG; SUN, 2004; KVASNICKA; VOLDRICH, 2006), entretanto o mais usado é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (MEITZ & KARMAS, 1978; IZQUIERDO-PULIDO; VIDAL-CAROU; MARINÉ-FONT, 1993 ;VECIANA-NOGUES et al.,1995; MALLE et al., 1996; GLÓRIA et al., 1999; BRILLANTES; SAMOSORN, 2001). Apesar de eficiente, sensível e seletivo, o método necessita de um tempo excessivo para análise, tornando-se inviável em relação ao tempo de analise e aos resíduos químicos gerados.

Portanto, é de fundamental importância desenvolver métodos analíticos para a quantificação de histamina em pescado que sejam simples, reprodutíveis e rápidos, para o fornecimento de respostas que possam prontamente auxiliar, tanto para o diagnóstico de intoxicação alimentar como para a liberação comercial do pescado, já que os peixes não podem ser liberados até a obtenção dos resultados de análise. A cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por fluorescência (CLUE-FL), uma das técnicas consideradas mais avançadas em termos de separação e detecção, apresenta-se como excelente alternativa para a determinação de histamina e de outras aminas bioativas em amostras de pescado.

2 OBJETIVOS

Objetivou-se desenvolver, validar e aplicar o método para a determinação de histamina e outras aminas biogênicas em pescado e conservas de pescado por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência por par iônico, derivatização pós coluna com o-ftaladeído e detecção fluorimétrica.

Os objetivos específicos foram:

a) Otimizar as condições cromatográficas para a separação da histamina e das outras aminas biogênicas por CLUE-FL.

b) Validar o método por CLUE-FL de acordo com os parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação para histamina.

b) Aplicar a metodologia validada para determinar a ocorrência e os teores de histamina em pescado (atuns e sardinhas *in natura* e em conservas) adquiridos em estabelecimentos comerciais e em feiras livres do Município de São Paulo/Brasil.

d) Calcular a estimativa da incerteza de medição no método CLUE-FL, segundo ISO-GUM (*International Standardization Organization-Guide to the expression of Uncertainly in Measurement* (JCGM, 2008), EURACHEM/CITAC (2012) e Oliveira et al (2015) e aplicar a um resultado obtido do teor de histamina em pescado.

3 REVISAO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS DA QUALIDADE DO PEIXE

Os peixes têm um papel importante na nossa alimentação como fontes de proteína, vitaminas A, D, E e do complexo B, certos minerais e lipídios. Além disso, a fração lipídica apresenta um elevado teor de ácidos graxos ômega-3, principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) componentes biologicamente ativos que desempenham importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina (KINSELLA, 1988).

De acordo com o Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (BRASIL, 1997) é considerado como “peixe fresco” aquele obtido de espécimes saudáveis e de qualidade adequada ao consumo humano, convenientemente lavado e que seja conservado somente pelo resfriamento a uma temperatura próximo a do ponto de fusão do gelo, devendo apresentar as seguintes características sensoriais: ser isento de toda e qualquer evidência de decomposição, manchas por hematomas, coloração distinta à normal para a espécie considerada, incisões ou rupturas das superfícies externas, escamas unidas entre si e fortemente aderidas à pele, translúcidas e com brilho metálico, não podendo ser viscosas. Os olhos devem ocupar a cavidade orbitária e serem brilhantes e salientes, opérculo rígido, oferecendo resistência à sua abertura, face interna nacarada com os vasos sanguíneos cheios e fixos, as brânquias de coloração rosada ao vermelho intenso, úmidas e brilhantes, ausência de muco, os músculos aderidos aos ossos fortemente e de elasticidade marcante, odor, sabor e cor característicos da espécie em estudo.

No entanto, estas características de frescor são perdidas rapidamente, uma vez que o pescado é um dos alimentos mais perecíveis entre os de origem animal devido a sua própria composição, necessitando de procedimentos adequados de manipulação, desde a captura até o consumo para retardar a deterioração. Os fatores responsáveis pela deterioração são o pH próximo à neutralidade, a elevada atividade de água nos tecidos, o alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis, o elevado teor de lipídeos insaturados e a rápida ação destrutiva das enzimas naturalmente presentes nos tecidos (ARNALD; BROWN, 1978; BALDINI, 1982; LEITÃO, 1984; BERAQUET; LINDO, 1985; ABABOUCH et al., 1991; FAO HEADQUARTERS, 2012). As alterações químicas, bacterianas e/ou enzimáticas que ocorrem no músculo do pescado durante o processo de deterioração dependem

da microbiota, a qual é influenciada pelo tipo de habitat aquático em que vivem (TAYLOR, 1985). A causa predominante de deterioração, entretanto, dependerá da composição química do peixe, da ecologia microbiana e das condições de manuseio e armazenamento (LEITÃO, 1988; ASHIE et al., 1996; SÁNCHEZ-CASCADO, 2005). Após a captura do pescado pode ocorrer a contaminação por fatores externos tais como gelo, manuseio, equipamentos e pessoal, e esses fatores podem modificar ou aumentar a microbiota. Com a morte do animal, as defesas naturais deixam de atuar e as bactérias começam a agir (BERAQUET; LINDO, 1985). Peixes deteriorados passam a apresentar as seguintes características: escamas opacas, que se soltam facilmente; olhos turvos com pupilas branco-leitosas; guelras pálidas ou escuras; carne amolecida, cinzenta, sem brilho e sem elasticidade; cheiro desagradável de amônia, tornando-se impróprio para o consumo (NUNES,1994; ESTEVES; ANÍBAL, 2007).

Pode-se aumentar a vida útil de peixes utilizando-se métodos químicos de preservação adicionando-se aditivos alimentares como sorbato de potássio, nitrito de sódio, glicona-delta-lactona e glicina, essas substâncias inibem o crescimento da bactéria produtora de histamina (CHAKRABARTI, 1988; ASHIE et al., 1996; NAILA et al., 2010). Outras técnicas têm sido utilizadas como a irradiação; a alta pressão e o armazenamento sob atmosfera modificada (ÖZOGUL; ÖZOGUL, 2006; NAILA et al., 2010).

A perda de frescor do pescado e, conseqüentemente, o decréscimo de qualidade, vem sendo estudada por meio de métodos sensoriais, físico-químicos e microbiológicos. No entanto, nenhum método isolado é suficiente para determinar o frescor do pescado. A análise sensorial permite perceber rapidamente alterações mais evidentes. Porém, a natureza subjetiva dos métodos sensoriais exige a adoção de critérios de avaliação harmonizados e a participação de provadores treinados e familiarizados com os produtos da pesca (NUNES et al., 2007).

Muitos índices químicos para o controle de qualidade do pescado estão baseados nas alterações quantitativas ou qualitativas de compostos da fração nitrogenada não protéica do músculo. Esta fração engloba substâncias de baixo peso molecular de diversas origens, presentes naturalmente no músculo ou formadas pela ação de enzimas endógenas ou exógenas, estas últimas produzidas pela proliferação dos microrganismos. A detecção de alterações progressivas destas substâncias no músculo do pescado durante o armazenamento é o primeiro requisito para considerar tais substâncias como potenciais índices de frescor (LAPA-

GUIMARÃES, 2005).

O teor de bases nitrogenadas voláteis, que engloba amônia, trimetilamina (N-TMA) e a dimetilamina (N-DMA), e a monometilamina, conhecidas também como bases nitrogenadas voláteis totais (N-BVT), tem sido empregado como índice de frescor para pescado (SÁNCHEZ-CASCADO, 2005). A determinação da degradação do ATP e seus metabólitos é outro método para determinar o frescor. Após a morte, na maioria dos pescados, ocorre a degradação do ATP rapidamente a IMP (inosinamonofosfato) formando ADP e AMP pela atividade de enzimas endógenas e a posterior degradação da IMP a inosina e hipoxantina. Esse método tem a vantagem de avaliar a perda de frescor antes da proliferação bacteriana (SÁNCHEZ-CASCADO, 2005).

Outro método utilizado como critério de qualidade é a determinação de aminas biogênicas (BULUSHI et al., 2009). As aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular, presentes em animais, plantas e microrganismos como conseqüência de diversos processos metabólicos. No pescado a descarboxilação de aminoácidos por enzimas descarboxilases de microrganismos, originam elevados teores de aminas biogênicas e sua quantificação reflete o estado de conservação do pescado (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994). Mietz & Karmas (1977) e Yamanaka (1990) observaram ser a relação entre cinco aminas biogênicas (histamina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina) um bom índice de qualidade para atum e sardinha. Vários índices de qualidade química, a semelhança destes, foram propostos para alimentos baseados nos teores de aminas bioativas, dentre eles, pescado (VECIANA-NOGUÉS et al., 1997), carne de frango e produtos derivados (SILVA & GLÓRIA, 2002) e produtos de origem vegetal (LAVIZZARI et al., 2006). Além de úteis como critério de qualidade, teores elevados de histamina e de outras aminas biogênicas em alimentos podem indicar o potencial do alimento em causar intoxicação alimentar (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994).

3.2 AMINAS BIOATIVAS

3.2.1 Definição e classificação das aminas bioativas

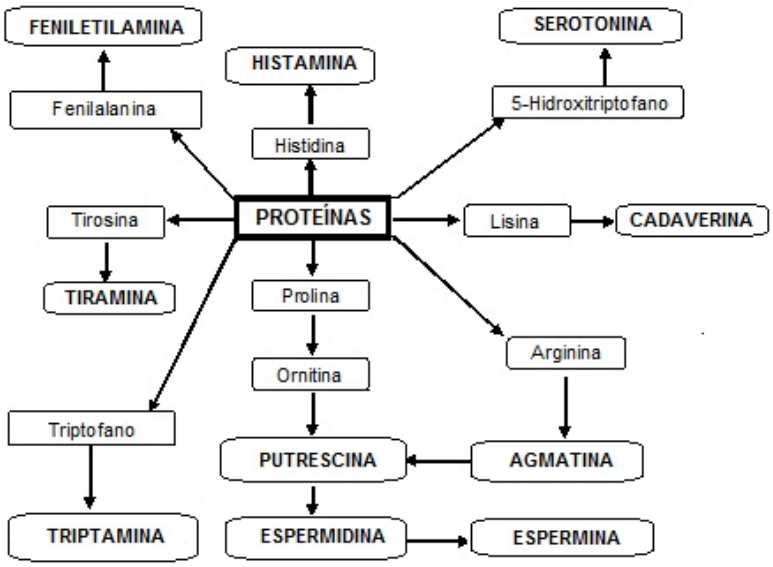
As aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas de baixo peso molecular. Esses compostos orgânicos são substâncias formadas em processos bioquímicos e que participam de importantes atividades metabólicas e

fisiológicas nos organismos vivos, desempenhando diversas funções biológicas. São encontradas em alimentos de origem animal, vegetal, bem como em alimentos fermentados (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994; TAYLOR, 1985; SUZZI; GARDINI, 2003; CINQUINA et al., 2004; GLÓRIA, 2005; LAVIZZARI et al., 2006; TANG et al., 2009; SINGH et al., 2012; VISCIANO et al., 2012).

A designação das aminas bioativas, em sua maioria, é em função dos aminoácidos precursores (Figura 1). As aminas histamina, tiramina e triptamina originam-se dos aminoácidos histidina, tirosina e triptofano, respectivamente. Enquanto que, os nomes cadaverina e putrescina, originam-se do fato destas aminas terem sido encontradas em produtos em decomposição ou putrefação. Já a espermina e espermidina se referem ao fluido seminal, de onde foram isoladas pela primeira vez (GLÓRIA, 2005).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química (Figura 2), da via biossintética e da função que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina).

Figura 1 – Formação de aminas bioativas a partir dos aminoácidos precursores



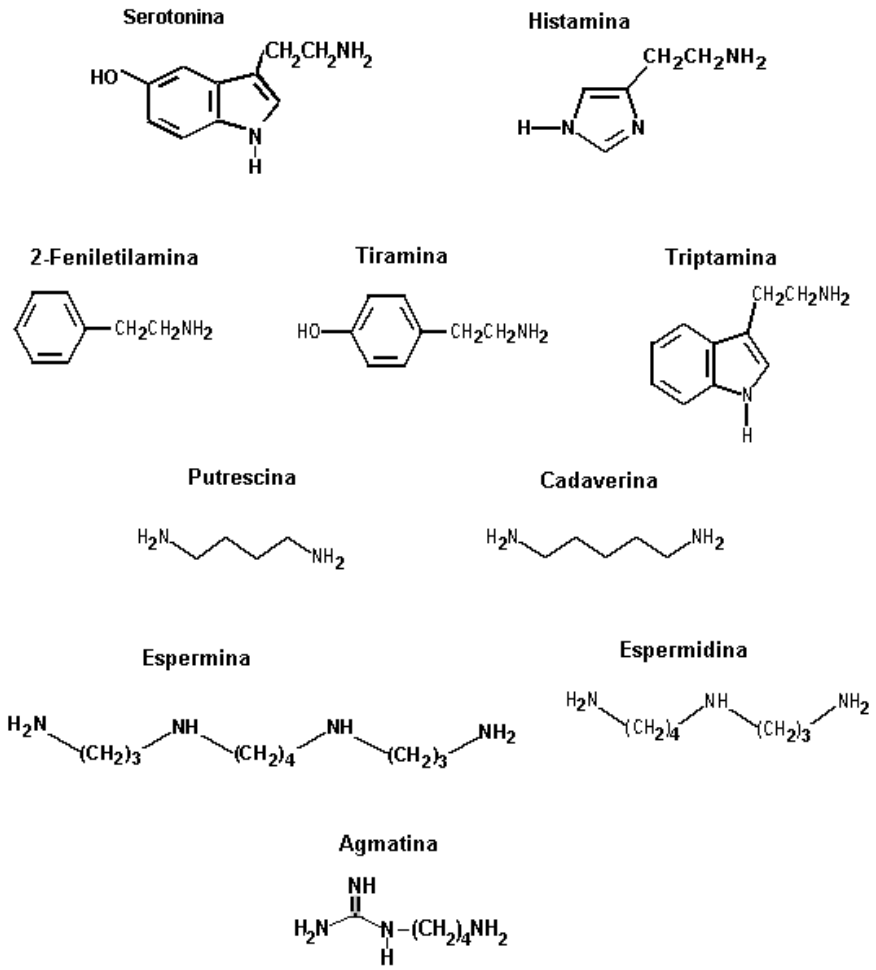
Fonte: SÁNCHEZ-CASCADO, 2005.

Quanto à estrutura química as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Ainda, podem ser

designadas em função do grupo químico em catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina); indolaminas (triptamina e serotonina) e imidazolaminas (histamina) (SMITH, 1980-81; BARDÓCZ, 1995, SILLA-SANTOS, 1996).

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

Figura 2 – Estrutura química de algumas aminas.



Dependendo da função que exercem as aminas bioativas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento (espermidina e espermina) por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular, e em

vasoativas e neuroativas (tiramina, histamina e serotonina) devido ao seu efeito nos sistemas vascular e nervoso (BARDÓCZ et al., 1993).

3.2.2 Formação das aminas bioativas

As aminas biogênicas podem ser formadas por transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos, sendo a última a principal via de formação (MAIJALA et al., 1993; BARDÓCZ, 1995). A formação de aminas biogênicas requer aminoácidos disponíveis e ocorre pela ação de enzimas de microrganismos com atividade aminoácido descarboxilase (EFSA, 2011). A histamina é formada em peixes por certos microrganismos capazes de produzir a enzima histidina descarboxilase (HDC). A enzima histidina descarboxilase produzida por bactérias catalisam a conversão de histidina livre, naturalmente presente, na musculatura de alguns peixes em histamina. As bactérias gram-positivas e gram-negativas podem produzir histidina descarboxilase, mas os tipos de enzimas diferem (EFSA, 2011, BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER et al, 2010). Da mesma forma, outras aminas biogênicas (putrescina, cadaverina e tiramina) são sintetizadas por decarboxilases produzidas pelas bactérias gram-positivas e negativas com atividade aminoácido descarboxilase.

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

Dentre os gêneros bacterianos capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos estão incluídos os *Bacillus, Citrobacter, Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Lactobacillus, Pediococcus, Photobacterium, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Shigella e Streptococcus* (ÖNAL, 2007). A formação de aminas biogênicas em produtos lácteos, por *Enterococcusfaecalis e Enterococcusfaecium* foi relatada por Giraffa et al. (1997). *Enterococcus* e alguns lactobacilos (*Lb. curvatus, Lb. brevis e Lb. buchneri*) apresentaram grande capacidade de formação de tiramina (BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999). Espécies de *Enterobacteriaceae* produzem histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (MARINO et al., 2000). Em peixes,

Morganella morgani, Klebsiela pneumoniae, Photobacteriumm phosphoreum e *Hafnia alvei* são consideradas profícuas formadoras de histamina (GLÓRIA, 2005; KEETON JR et al., 2008; ZAMAN et al., 2009; EFSA, 2011, ABABOUCH; EMBORG; DALGAARD, 2014). De acordo com pesquisas de Emborg et al. (2006) e Emborg e Dalgaard (2008), a *Morganella psychrotolerans* é uma outra fonte formadora de histamina. Parâmetros como temperatura, o pH do meio, a tensão de oxigênio, a presença de vitaminas e coenzimas, as concentrações de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis podem influenciar na produção de aminas pelos microrganismos. A produção de aminas é estimulada em meio ácido (pH 2,5 a 6,5) como mecanismo de proteção da bactéria (GLÓRIA, 2005), devido ao fato de que altas concentrações do íon H^+ tornam-se prejudiciais ao microrganismo fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases (SILLA-SANTOS, 1996). Com relação à temperatura, as descarboxilases são mais ativas em temperaturas inferiores a 30ºC, acima de 40ºC são inativadas e na faixa de 0 a 10ºC, a atividade dependerá da microbiota presente (HALÁSZ et al., 1994).

As aminas podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitárias durante a fabricação de certos produtos (HALÁSZ et al., 1994; KALAČ et al., 2002; GLÓRIA, 2005). Quando ocorre a deterioração, as aminas podem originar odores pútridos e sabores estranhos, além de causarem efeitos tóxicos ao homem (BULUSHI et al., 2009; HUNGERFORD, 2010).

3.2.3 Funções das aminas bioativas

A importância das aminas biogênicas no metabolismo e crescimento de microrganismos, animais e plantas tem sido demonstrada em diversos estudos. As poliaminas atuam como reservas de nitrogênio, são substâncias naturais de crescimento de microrganismos e de vegetais, agem como hormônios/fatores de crescimento, aceleram o processo metabólico, participam na regulação da secreção gástrica, na contração e relaxamento do músculo liso, são biomoduladores e estimulam os neurônios sensoriais, motores e cardiovasculares (STRATTON et al., 1991; SILLA-SANTOS, 1996; BAUZA et al., 1995; CONCA et al., 2001; HUNGERGORD, 2010).

As poliaminas são essenciais às células vivas, desempenhando papel importante em diversas funções fisiológicas de humanos e animais (KALAČ e

KRAUSOVÁ, 2005). Estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e proteínas, na estabilização das membranas, e são essenciais ao crescimento e duplicação das células (BARDÓCZ et al., 1993; JEEVANANDAM et al., 1997; MOINARD et al., 2005; ÖNAL, 2007). Têm implicações na renovação e funcionalidade do trato digestivo e na maturação da mucosa intestinal (BARDÓCZ, 1993; MOINARD et al., 2005).

A histamina, serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina são psicoativas ou vasoativas e atuam como neurotransmissoras no sistema nervoso central. As vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras (pressoras) ou vasodilatadoras. Aminas como a tiramina, feniletilamina, isoamilamina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e triptamina causam um aumento na pressão sangüínea por constrição do sistema vascular e aumento da velocidade e da força da contração cardíaca. A serotonina é vasoconstritora, broncoconstritora, reduz o volume e a acidez do suco gástrico, tem efeito antidiurético, estimula o músculo liso e afeta o metabolismo de carboidratos. A histamina causa a vasodilatação, reduz a pressão sangüínea, aumenta a contração e a velocidade do batimento cardíaco, atua na contração e relaxamento do músculo liso, na regulação da secreção gástrica e como estimulante dos neurônios dos sistemas motor e sensorial (TAYLOR, 1986; STRATTON et al., 1991; GLÓRIA, 2005; ÖNAL, 2007; HUNGERFORD, 2010; EFSA, 2011).

3.2.4 Implicações toxicológicas das aminas bioativas

As aminas são substâncias que desempenham funções fisiológicas essenciais no organismo humano. Consequentemente, em baixas concentrações, geralmente não apresentam risco à saúde humana e são rapidamente metabolizadas no trato gastrointestinal por um sistema de desintoxicação (ÖNAL, 2007). Entretanto, quando ingeridas em concentrações elevadas ou quando as enzimas são bloqueadas por outros compostos este sistema enzimático de desintoxicação falha e podem ocorrer efeitos tóxicos (HALÁSZ et al., 1994; LANGE et al., 2002; ÖNAL, 2007; FAO HEADQUARTERS, 2012).

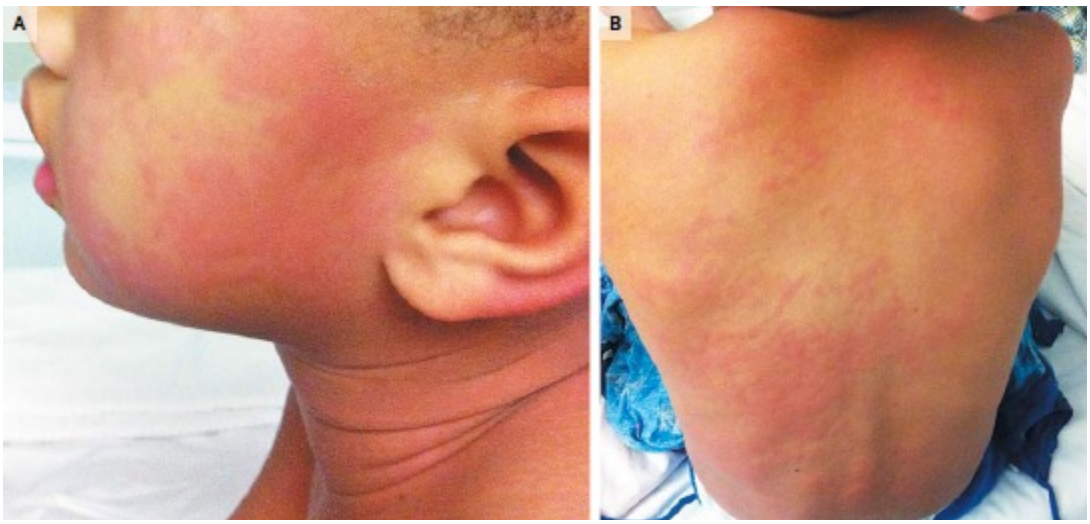
No organismo humano, as aminas presentes nos alimentos são rapidamente metabolizadas por conjugação ou mediante reações de oxidação por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO) (SMITH, 1980-1981; FAO HEADQUARTERS, 2012).

Os fatores que interferem no catabolismo das aminas são a deficiência genética e a inibição por agentes farmacológicos os quais inibem a MAO. Além disso, algumas aminas potencializam os efeitos tóxicos da histamina, dentre elas, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermidina e espermina (HALÁSZ et al., 1994). As aminas putrescina e cadaverina são consideradas potencializadoras do efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO histamina-N-metiltransferase (HMT) (PRESTER, 2011; FAO HEADQUARTERS, 2012), aumentando o seu transporte através da parede gastrintestinal (TAYLOR, 1986). A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados e queijos maturados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida sozinha (SOARES; GLÓRIA, 1994; GLÓRIA, 2005). O etanol também pode atuar como inibidor da MAO, intervindo no metabolismo das catecolaminas, tiramina e feniletilamina (BAUZA et al., 1995). O nível mínimo de cadaverina ou putrescina potencializadores da toxicidade da histamina é desconhecido (FAO HEADQUARTERS, 2012).

A intoxicação mais frequentemente causada por aminas biogênicas em alimentos envolve a histamina (CINQUINA et al., 2004; KIM et al., 2004; FAO HEADQUARTERS, 2012). A intoxicação histamínica resulta da ingestão de alimentos que contêm altos teores de histamina. Os principais sintomas são erupções na pele (Figura 3), náuseas, dor de cabeça, palpitações, vômitos, dores abdominais, distúrbios respiratórios e taquicardia (GLÓRIA, 2005). Em casos mais severos pode ocorrer o edema de glote. Os principais alimentos envolvidos nesta intoxicação são os peixes e os queijos (STRATTON et al., 1991; CINQUINA, et al., 2004; LAVON et al., 2008; EVANGELISTA, 2010; FAO HEADQUARTERS, 2012).

Os níveis tóxicos das aminas bioativas para humanos são ainda incertos, porém limites têm sido sugeridos. Shalaby (1996) propôs teor de 50 mg kg^{-1} de histamina em peixes como seguro para consumo. O EFSA (2011) sugere um NOAEL (nível de efeito adverso não observado) de 50 mg de histamina após estudos de relação dose-resposta em voluntários saudáveis que não apresentaram sintomas após o consumo de 25-50 mg de alimentos como peixes ou bebidas não-alcoólicas. A dose tóxica parece ser de 90 mg, no entanto, a dose tóxica para a histamina em intoxicação histamínica após o consumo de peixes da família *Scombridae* é desconhecida (FAO HEADQUARTEARS, 2012).

Figura 3 – Erupções na pele causadas por intoxicação histamínica por peixe da família *Scombridae*



Fonte: VICKERS & SAFAI, 2013.

A tiramina é outra amina envolvida em intoxicações alimentares. Em peixes in natura seus teores são baixos, no entanto; pode ser encontrada em grande quantidade em peixe fermentado (FAO HEADQUARTERS, 2012). A tiramina em concentrações elevadas pode causar cefaléia, febre, vômito, transpiração, inflamação cutânea, dores de cabeça e aumento da pressão sanguínea. Em pacientes em tratamento com inibidores da MAO, a tiramina pode causar enxaqueca e induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (SMITH, 1980-1981; MAIJALA et al., 1993; KEETON JR et al., 2008). Da mesma forma que a tiramina, a triptamina e a 2-feniletilamina podem provocar dor de cabeça, enxaqueca, aumentar a pressão sanguínea, devido à constrição do sistema vascular, e a taxa da contração cardíaca (SMITH, 1980-1981).

3.2.5 Aminas biogênicas como critério de qualidade

As aminas biogênicas podem ser formadas durante as condições de estocagem e ou processamento de alimentos por enzimas de bactérias contaminantes devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Portanto, alimentos com altos conteúdos de proteínas e aminoácidos quando submetidos a condições favoráveis ao crescimento microbiano poderão conter aminas biogênicas. Os teores e tipos de aminas dependerão do alimento e da microbiota presente.

Assim sendo, as aminas biogênicas podem ser utilizadas como critério de qualidade (DONHAUSER et al., 1993), indicando a qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitarias deficientes durante a fabricação de certos produtos (TAYLOR, 1986; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997; SÁNCHEZ-CASCADO, 2005). Servem também como um indicador do alimento deteriorado, uma vez que a deterioração microbiana pode ser acompanhada pelo aumento da produção de descarboxilases (HALÁSZ et al., 1994). O fato das aminas serem termo-resistentes permanecendo no alimento mesmo após o tratamento térmico faz com que sejam utilizadas como critério de qualidade também para produtos industrializados (LIMA & GLÓRIA, 1999).

3.2.6 Produção de histamina em pescado

Os teores de aminas biogênicas em peixes dependem da época do ano, da genética, do ambiente, do estágio fisiológico, e do tecido (DAWOOD et al., 1988; ABABOUCH et al., 1991; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997). Alguns peixes são susceptíveis a formação de histamina por conterem teores elevados de histidina livre no tecido muscular, tais como os peixes da família *Escombridae* (atum, bonito, cavala, atuns azul e yellowfin) (ARNOLD; BROWN, 1978; TAYLOR, 1986; FAO HEADQUARTERS, 2012). Peixes das famílias *Scomberesocidae*, *Pomatomidae*, *Coryhaenidae*, *Carangidae*, *Clupeidae* and *Engraulidae* também são susceptíveis a formação desta amina.

Estudos realizados por Mietz e Karmas (1978) e Glória et al. (1999) indicaram que os teores de espermina e espermidina decrescem e os de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e triptamina aumentam durante o armazenamento e deterioração do atum, truta arco-íris, sardinha, salmão, dentre outros. Baixos teores de putrescina, cadaverina e histamina e relativamente altos teores de espermidina e espermina foram encontrados em amostras de atum de boa qualidade, o qual não se detectou decomposição (MIETZ E KARMAS,1978).

Segundo Mietz e Karmas (1978) em amostras de qualidade intermediária, o qual se observou decomposição, houve um aumento significativo nos teores de putrescina, cadaverina e histamina e a diminuição nos de espermidina e espermina. Já no peixe em decomposição, os teores de putrescina, cadaverina e principalmente histamina tiveram um acréscimo significativo, enquanto os de espermidina e espermina decréscimo.

A microbiota do peixe também exerce um fator relevante na formação de aminas. Esta microbiota pode ser transiente, variando em função do ambiente, dieta e condições higiênicas sanitárias durante a captura, manuseio, processamento e armazenamento (TAYLOR, 1986). Várias espécies, naturais ou contaminantes são capazes de produzir histamina, dentre elas, *Morganella morganii, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, Hafnia alvei, Clostridium perfringens, Lactobacillus delbrueckii, Escherichia coli, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae, E. aerogenes, E. agglomerans, Proteus mirabilis, P. vulgaris, Serratia liquefaciens, Acinetobacter lwoffi, Pseudomonas putrefaciens, P. putida, P. fluorescens, Vibrio alginolyticus, Aeromonas hydrophyla* (VECIANA-NOGUÉS et al., 1997; LANDETE et al., 2007). Porém, as principais bactérias produtoras de histamina são: *Morganella morganii, Hafnia alvei* e *Klebsiella pneumoniae* e aquelas bactérias frequentemente isoladas de peixes incriminados em intoxicação histamínica (TAYLOR, 1985).

Outros fatores que podem influenciar os teores de aminas no peixe incluem o local de captura, temperatura do ar e da água, práticas de manuseio pós captura, sistemas e velocidades de resfriamento e congelamento e condições de armazenamento (ARNOLD; BROWN, 1978; FDA, 2011). A manutenção de condições de refrigeração e higiênico-sanitárias adequadas do peixe, por ocasião da captura, transporte e comercialização são essenciais para prevenir a formação de aminas. Falhas eventuais nesta cadeia podem propiciar o crescimento de microrganismos e elevação nos teores de aminas (GLÓRIA et al., 1999; FAO HEADQUARTERS, 2012).

Diferentes técnicas durante a evisceração têm sido utilizadas na pesca comercial. Segundo Dawood et al. (1988) e Hardy & Smith (1976), peixes eviscerados contém menores concentrações de aminas comparados aos peixes não eviscerados. No entanto, não foram observados por Price; Melvin e Bell (1991) diferenças significativas na qualidade e nos teores de histamina de atum albacora inteiro, sangrado e eviscerado. Inúmeros estudos têm demonstrado que a temperatura de armazenamento do peixe é um fator crítico na formação de histamina e outras aminas no tecido muscular do peixe (GLÓRIA et al., 1999; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997; CHOTIMARKORN, 2011).

Um estudo das alterações na qualidade do músculo da anchova (*Stolephorus heterolobus*) mantidas durante 7 dias a temperatura de refrigeração (4ºC) foi realizado por Chotimarkorn (2011). No primeiro lote, peixes foram envolvidos com uma camada de gelo e armazenados em caixas de isopor com furos para drenagem,

sendo o gelo substituído diariamente e a água removida. No segundo lote os peixes foram colocados em caixas de poliestireno sem gelo e armazenados na mesma temperatura de 4ºC. Foram utilizados os seguintes indicadores de degradação: ATP, valor de K, N-BVT, N-TMA, ácido láctico, aminas biogênicas, avaliação sensorial e microbiológica. Nos 7 dias de armazenamento com gelo e sem gelo, os valores de K, N-BVT, N-TMA e ácidos lácticos L e D aumentaram com o tempo de armazenamento que são produtos finais da glicólise do peixe durante estocagem a temperaturas baixas. As principais aminas biogênicas encontradas no músculo da anchova durante o armazenamento foram cadaverina, agmatina e tiramina, seguido de putrescina e histamina. O armazenamento da anchova em temperatura de refrigeração com as amostras cobertas com gelo, resultaram em uma melhor manutenção da qualidade sensorial, melhor controle da atividade microbiana e o abrandamento dos mecanismos de degradação bioquímica.

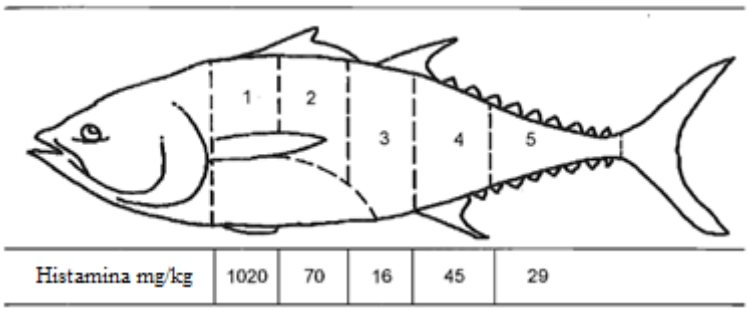
Ababouch et al. (1991) observaram que sardinhas recém capturadas apresentaram contagens elevadas de bactéria na pele e nas guelras, e que as bactérias invadiram e cresceram rapidamente no tecido muscular, atingindo 5×10^8 ufc g^{-1} quando foram armazenadas em temperatura ambiente por 24 h e 6×10^8 ufc g^{-1} quando armazenadas em gelo por 8 dias. Histamina, cadaverina e putrescina atingiram valores de 2350, 1050 e 300 mg kg^{-1}, respectivamente após 24 h de estocagem a temperatura ambiente. Evidenciou-se que após a captura, a refrigeração rápida e ininterrupta do peixe é primordial para se obter um peixe de boa qualidade.

Frank et al. (1981) incubaram o atum *skipjack* por 24 horas a diferentes temperaturas. Na temperatura de 26,7ºC, as concentrações de histamina nas partes do atum foram 1020 mg kg^{-1} (seção 1), 70 mg kg^{-1} (seção 2), 16 mg kg^{-1} (seção 3), 45 mg kg^{-1} (seção 4) e 29 mg kg^{-1} (seção 5), conforme Figura 4. Ou seja, observaram que a concentração de histamina não era uniforme para todas as seções do mesmo peixe. Dalgaard e Emborg (2008) ressalta ainda que a concentração de histamina pode variar consideravelmente de peixes para peixe dentro de um lote e mesmo entre diferentes porções de um único peixe.

Segundo Dalgaard e Emborg (2008) uma alta concentração de bactéria fortemente produtora de histamina no conteúdo intestinal do peixe corresponde à observação de que a formação de histamina frequentemente é mais pronunciada na porção do peixe próximo da cavidade abdominal (Figura 4). Frank et al. (1981)

recomenda a evisceração, limpeza e remoção de brânquias eficientemente, mas relata que nem sempre essa prática é possível para os peixes menores.

Figura 4 – Variação na formação de histamina em diferentes regiões do atum.



Fonte: Figura original de Frank et al., 1981 e Figura modificada de Dalgaard e Emborg, 2008.

O Food and Drug Administration (FDA, 2011) declarou que um resfriamento rápido do peixe imediatamente após a morte é a melhor estratégia para o controle da formação de histamina em peixes. Algumas bactérias produtoras de histamina poderão crescer a temperaturas de refrigeração, no entanto, as taxas de crescimento dessas bactérias serão reduzidas a temperaturas que se aproximam de 0ºC.

Foi estabelecido pelo FDA (2011) um plano de amostragem em que n = 18, c = 1, m = 50 mg kg^{-1}, onde "n" representa o número de unidades testadas por lote e avaliadas no critério "m", "*c*" é o número de unidades testadas que podem ter o valor "*m*". Ou seja, um total de 18 peixes por lote deve ser analisado individualmente ou podem ser compostos em, por exemplo, 6 unidades. Entretanto, o limite crítico é reduzido, de 50 mg kg^{-1} a 17 mg kg^{-1}. Esse valor foi estabelecido para assegurar a proteção à saúde do consumidor.

A União Européia (2005) estabeleceu um plano de amostragem de duas classes onde devem ser coletadas nove (09) amostras por lote, se mais de duas (02) amostras desse lote tiverem valores de histamina entre 100 e 200 mg kg^{-1}, todo lote será rejeitado e nenhuma amostra poderá ter um teor acima de 200 mg kg^{-1} para histamina em atum e outros peixes pertencentes às famílias *Scombridae* e *Scombreresocidae*. Mesmo com estas medidas, segundo o relatório do *Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products* (2012), vários surtos de intoxicação ainda têm ocorrido em diversos países.

Um teor médio máximo de histamina de 100 mg kg^{-1} foi estabelecido como limite por vários países e comunidades para aceitação do atum e de outros peixes (FAO HEADQUARTERS, 2012). Devido ao efeito potencializador de outras aminas no efeito tóxico da histamina, a União Européia recomenda o uso de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de aminas de acordo com o regulamento CE nº 2073/2005 (EU, 2005) e com o *Manual for Reporting on Zoonoses*, 2009 (EFSA, 2010).

Espécies de peixes das famílias *Carangidae*, *Engraulidae*, *Pomatomidae*, *Scombridae*; *Ammodytidae*, *Gempulidae*, *Belonidae*, *Clupeidae*, *Arripidae*, *Coryphaenidae*, *Istiophoridae Salmonidae* têm sido associadas com intoxicações alimentares por histamina ou são espécies que causam preocupação devido aos elevados teores de histidina livre. Os teores estimados de histidina livre podem variar de 2600 a 25070 mg kg^{-1} em algumas delas (FAO HEADQUARTERS, 2012).

Mundialmente têm-se tomado medidas ou procedimentos para evitar a formação de histamina em pescado a fim de assegurar a proteção à saúde do consumidor e a qualidade do alimento (EFSA, 2010). Entretanto, ainda se observa a ocorrência de histamina em alimentos, visto que em 15 de outubro de 2013, a principal empresa de processamento de atum do Japão anunciou o recolhimento de 6,72 milhões de latas de atum do mercado, uma vez que a análise revelou que os níveis de histamina excederam o teor da legislação e, eventualmente, poderiam causar alergia ao consumidor (ATUNA, 2013).

3.2.7 Efeito do processamento de pescado sobre a produção de histamina

É importante que durante o tempo do processamento os produtos não sejam mantidos na zona de temperatura em que as bactérias produtoras de histamina podem crescer e produzir a histamina (FAO HEADQUARTERS, 2012). De acordo com Emborg e Dalgaard (2008), a modelagem microbiológica pode ser utilizada para determinar o efeito de diferentes tempos e temperaturas sobre o crescimento de bactérias e produção de histamina.

O processo de aquecimento pode ser utilizado para eliminar as bactérias produtoras de histamina e suas enzimas histidina descarboxilase (HDC) no produto. No entanto, se a histamina for produzida nos peixes. O cozimento irá matar as bactérias e não irá eliminar a histamina que é estável ao calor. Portanto, é importante suprimir ou retardar o crescimento de bactérias produtoras de aminas

bioativas. Como as bactérias produtoras de histamina são mais sensíveis ao calor do que as bactérias formadoras de esporos, que são alvo do processamento térmico, produtos enlatados esterilizados comercialmente não conterão quaisquer bactérias produtoras de histamina. Além disso, todas as enzimas HDC serão desnaturadas no processo de esterilização, significando que a histamina não será formada nos produtos e que estes poderão ser armazenados à temperatura ambiente. Nos produtos como peixe defumado, o calor pode ser aplicado no processo para eliminar as bactérias produtoras de histamina e inativar as enzimas. *Morganella morganii* é provavelmente a mais resistente ao calor, entre as bactérias produtoras de histamina. Nas temperaturas entre 58 e 62°C, os valores de D para eliminar essa bactéria e suas enzimas HDC necessitaram entre 15 e 1,5 s no salmão australiano/*kahawai* (OSBORNE; BREMER, 2000). O processo de defumação pode ser indicado para eliminar as bactérias vegetativas mais resistentes, tal como a *Listeria monocytogenes* (FLETCHER *et al*., 1998). No entanto, embora o aquecimento possa destruir as bactérias nos alimentos, se a recontaminação e a temperatura de abuso ocorrer após o tratamento térmico, a formação de histamina poderá acontecer no produto processado termicamente. Portanto, uma vez formada a histamina, a mesma estará presente no produto já que não é destruída por congelamento, aquecimento ou esterilização (LEHANE; OLLEY, 2000).

3.3 INTOXICAÇÃO HISTAMÍNICA

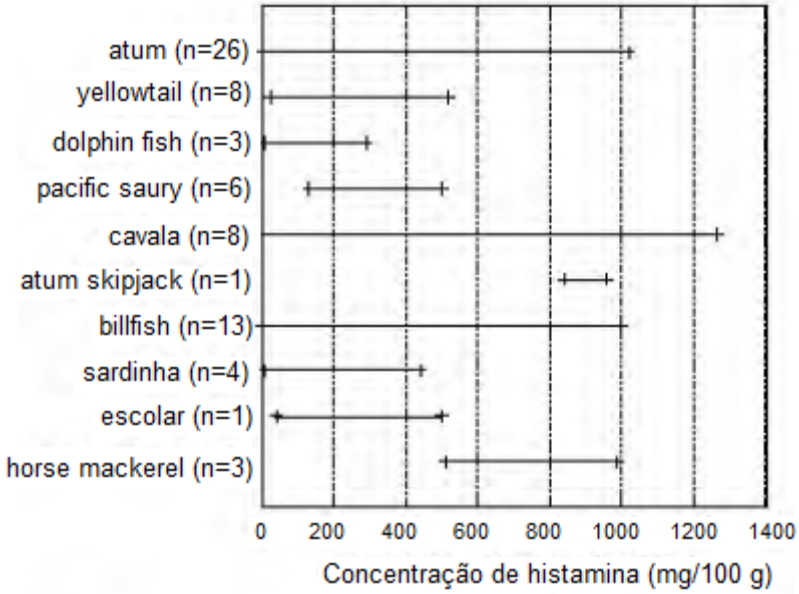
3.3.1 Ocorrência de surtos envolvendo o consumo de pescado

Historicamente, as intoxicações causadas por ingestão de histamina eram referidas como “envenenamento por *escombrídeos*” por estarem associadas à intoxicação após o consumo de peixes da família *Scombridae*. Atualmente, tem-se utilizado o termo *escombrotoxina* para intoxicação alimentar causada pela ingestão de histamina. De acordo com o relatório do *Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products* (2012), vários surtos de intoxicação foram registrados em diversos países: Estados Unidos, Japão, Inglaterra, Itália, França, Dinamarca, Canadá, Nova Zelândia.

No período de 1998-2008, 89 surtos de intoxicação histamínica foram

relatados no Japão, acometendo 1577 pessoas, em média 8 surtos com 150 pacientes por ano. Destes 89 casos, 72 tinham amostras que foram analisadas. Os teores de histamina nessas amostras variaram desde o limite de detecção a 12670 mg kg^{-1}, sendo que 8% continham teores abaixo de 100 mg kg^{-1} e 12% com teores acima de 200 mg kg^{-1}. Com relação às espécies implicadas na intoxicação alimentar, dos 89 surtos, 29 (33%) foram com atum, 16 (8%) foram por *billfish* e (13%) cavala, 9 (10%) de *yellowtail* , 8 (9%) de *pacific saury*, 7 (8%) de sardinha, 3 (3%) de *horse mackerel* e *dolphin fish*. Na Figura 5, estão apresentados os teores de histamina nas diferentes espécies de peixes analisados. Observou-se quanto ao método de preparo/cozimento do peixe que 62% eram grelhados, 21% eram fritos e somente 7% eram peixe cru.

Figura 5 – Concentração de histamina em diferentes espécies de peixes nas 72 amostras de alimentos implicados nos surtos ocorridos no Japão (1998-2008)



Fonte: FAO HEADQUARTERS, 2012.

Em um caso de intoxicação histamínica ocorrido no Senegal, em 2010, nas Forças Armadas da França em Dakar, foi encontrado o teor de histamina no atum de 4900 mg kg^{-1} (FAO HEADQUARTERS, 2012).

Três surtos de intoxicação por escombrídeos foram relatados na região nordeste por Evangelista (2010) no Brasil, entre janeiro de 2007 e dezembro de 2009. Nos três casos os peixes envolvidos eram atuns e acometeram 25 pessoas. Outro surto ocorrido em abril de 2013 numa escola do Município de São Paulo, onde

78 alunos foram alimentados com a merenda (salada contendo atum), 18 apresentaram edema de face e vermelhidão pelo corpo. Foram analisadas uma embalagem original fechada de atum ralado com óleo comestível, o atum preparado (atum ralado com óleo comestível e caldo vegetal temperado) e os fragmentos de atum ralado com óleo comestível e caldo vegetal distribuídos na merenda escolar. Na embalagem fechada não foi detectada histamina, já no atum preparado e nos fragmentos de atum os teores foram de 1076,5 e 1534,7 mg kg^{-1}, respectivamente.

Em 21/11/2015, registrou-se outro surto na cidade de Campinas envolvendo uma família (casal com dois filhos). Após 30 minutos da ingestão de pescado assado (bonito) num almoço familiar às quatro pessoas adoeceram. Sendo que uma permaneceu internada. A mãe relatou que percebeu sabor amargo no peixe. Os sintomas relatados foram moleza no corpo, queda de pressão, manchas vermelhas pelo corpo, muita coceira e falta de ar. A mãe foi levada ao hospital e necessitando internação devido à pressão arterial de 50 x 30 mmHg, inchaço, vermelhidão e mãos arroxeadas; após ser medicada recebeu alta em dois dias. O marido foi medicado e liberado após 3 horas. Tanto o marido como os dois filhos relataram dor de cabeça e náuseas. Uma porção de pescado assado foi analisada quanto ao teor de histamina, sendo que o teor encontrado foi de 6407,9 mg kg^{-1}. O elevado teor de histamina na amostra esta muito acima do limite máximo estabelecido de 100 mg kg^{-1} tendo por base os Regulamentos técnicos para peixe fresco inteiro e eviscerado, para conservas de peixes, conservas de sardinhas, conservas de atuns e de bonitos. Este resultado sugere riscos à saúde como conseqüência do seu consumo (artigo em fase de publicação).

No Brasil, os casos de intoxicação histamínica são pouco relatados devido à dificuldade de associar sintomas à intoxicação histamínica por peixes ou os sintomas são relativamente leves, onde as pessoas acometidas não procuram atendimento médico. Os casos, somente são relatados quando um grande número de pessoas é acometido. Na Tabela 1, estão descritos alguns surtos de intoxicação histamínica por peixes.

Tabela 1 – Nível de histamina relatada em surtos de intoxicação histamínica.

País	Ano	Nº afetados	Alimento Causador	Nível de histamina ou outra amina (mg/100 g)	Nota	Referência
Austrália	1990	3	Salmão do Oeste Australiano	80		(Smart, 1992)
	1991	4		254		
		6	Atum Yellow-fin	470-490		(Hall, 2003)
EUA	1973	232	Atum enlatado	68-280		(Merson et al., 1974)
	1977	15	Atum cru (sashimi)	160-919 (mg/l)		(Lerkeet al., 1978)
	1998	11	Hambúrguer de atum	274-325		(Becker et al., 2001)
		1	Salmão defumado	0,19	Alta toxicidade em ratos foi detectada por bioensaio, apesar do baixo nível de histamina	(Gessner et al., 1996)
	2003	42	Peixe (merenda)	200-380		(Feldman et al., 2005)
Canadá	1991	12	Marlin	360 (cozido) 331 (cru)		(Todd et al., 1992)
		1	Atum enlatado	35 (em salada)	Nível de histamina foi < 1 mg/100 g em atum enlatado	(Predy et al., 2003)
Reino Unido		4	Cavala defumada	250		(Cruickshank e Williams, 1978)
Espanha	1995	7	Atum	2000		(Sánchez-Guerrero et al.,1996)
Taiwan, China	1986	41	Cavala frita	10	O alimento implicado foi exposto a temperatura ambiente por mais de 2 h em amostra teste	(Chen et al., 1987)
	2004	59	Billfishfrito	257		(Tsaiet al., 2007)
		43		157-270		
	2007	347	Peixe frito em cubos	40 e 52	Foi testado somente 2 amostras	(Chen et al., 2010)
	2006	7	Atum dumpling	161		(Chen et al., 2008)
Tailândia	2007	91	Atum fermentado frito	446		(Hongchumpon et al., 2009)
Brasil*	2013	78	Atum ralado na salada	107,65 153,47		Takemoto et al., 2014
França*	2014	1	Peixe	-		Pralong et alL., 2014

* Com exceção do caso de surto do Brasil, o restante foi compilado do FAO HEADQUARTERS, 2012.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

Uma diversidade de métodos tem sido desenvolvida para determinar o teor de aminas bioativas em pescado (HUNGERFORD, 2010; ÖNAL et al., 2013). Entretanto, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é a mais aplicada para a determinação das aminas bioativas. O potencial das aminas biogênicas em causar intoxicação alimentar e a possibilidade de se utilizar o seu teor como critério de qualidade tem impulsionado o desenvolvimento de vários métodos analíticos com alta sensibilidade. Esses métodos permitem separações e quantificações em poucos minutos sem comprometer a resolução, precisão e a sensibilidade.

Atualmente, tem se utilizado a combinação de dois ou mais tipos de analisadores que atuam de maneira complementar a fim de otimizar uma análise química, tal como: cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção de arranjo de diodo e acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção de fluorescência e acoplada a espectrometria de massas, eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas, entre outras.

A determinação das aminas bioativas envolve etapas de extração, derivação e separação e quantificação (TAYLOR, 1985; ETIENNE, 2006; CHIACCHIERINI et al., 2006).

3.4.1 Extração

A extração pode ser considerada a etapa mais crítica da análise, pois depende do tipo e da natureza das aminas presentes e do alimento a ser analisado. Dois parâmetros são importantes: o solvente utilizado, diretamente relacionado com a matriz a ser analisada e o preparo da amostra (SIMON-SARKADI, 1994; MORET; CONTE, 1996).

A extração de aminas de uma matriz sólida pode ser realizada à temperatura ambiente ou a temperaturas altas, utilizando solventes orgânicos ou reagentes ácidos. Geralmente, na extração das aminas ligadas a outros componentes da matriz, utilizam-se ácidos, tais como clorídrico, perclórico e o tricloroacético (TCA) (ZEE et al., 1983; VALE; GLÓRIA, 1997; CHIACCHIERINI et al., 2006; ÖNAL, 2007), bem como misturas de ácidos e solventes orgânicos.

O ácido perclórico requer cuidados especiais uma vez que é explosivo (MERCKMILLIPORE, 2009). O TCA tem sido o mais indicado para extração de aminas biogênicas em peixes, por ser rápido, simples, não ser explosivo, e fornecer uma boa média de recuperação (ZEE et al., 1983).

3.4.2 Separação cromatográfica por CLAE

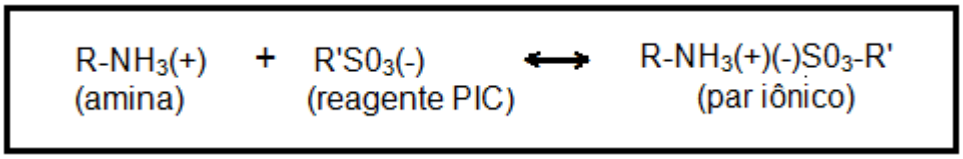
Vários métodos cromatográficos podem ser utilizados para a separação de aminas bioativas em alimentos. A CLAE é a mais recomendada (ÖNAL et al., 2013), sendo esta técnica adotada pela União Européia. Esta técnica permite a detecção de pequenas quantidades de aminas por ser mais seletiva e sensível (SHALABY, 1996; LAPA-GUIMARÃES, 2005). A separação e quantificação das aminas biogênicas por

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

Hui e Taylor (1983), Izquierdo-Pulido; Vidal-Carou e Mariné-Font (1993) e Glória e Daeschel (1995) utilizaram as colunas Ultrasphere ODS, Novapack C18 e µBondapack C18, respectivamente, para separar aminas biogênicas por cromatografia líquida. Önal et al., (2013), descreveram recentes técnicas por cromatografia líquida para a análise de aminas bioativas em alimentos no período de 2007 a 2011, evidenciando que a maioria dos autores citados, utilizou colunas de C18 em suas metodologias.

Para melhorar a separação das aminas, alguns autores introduziram contra-íons (Cromatografia de Par Iónico-PIC) na fase móvel. A PIC segundo Chust (1990) não é mais que uma modificação da Cromatografia de Fase Reversa, utiliza-se no eluente uma solução de molaridade próxima a 0,005 M de ácidos alquilssulfónicos de cadeias lineares de 5, 6, 7 ou 8 átomos de carbono para a separação de bases orgânicas. Chust (1990) ressaltou ainda que, as bases não interagem facilmente com a superfície hidrofóbica das colunas de fase reversa, especialmente C18, devido à carga associada a estas espécies; com a adição à fase móvel dos sais referidos, de carga contrária (contra-íon) a das moléculas da amostra, permite-se que as mesmas e o sal reagente formem um par eletronicamente neutro, podendo então interagir com a fase estacionária por um mecanismo de partilha. O modelo químico da reação de par iônico — bases (meio ácido) apresenta-se na Figura 6:

Figura 6 – Modelo químico da reação de par iônico



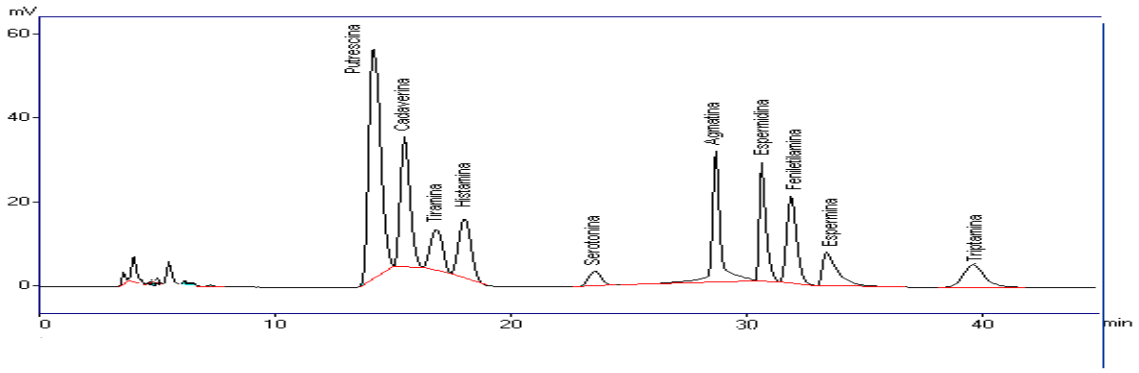
Fonte: CHUST, 1990.

Outro fator a considerar, segundo Chust (1990) é o comprimento da cadeia dos ácidos alquilssulfônicos. Quanto maior a cadeia, maior a retenção, ou seja, se utilizar como reagente PIC o ácido octassulfónico ($C_8H_{17}SOOH$), este originará uma maior retenção dos compostos básicos da amostra do que quando se utilizar o ácido

pentanossulfônico (C_5H_9SOOH), sendo assim, um fator de controle da separação. Os ácidos alquilssulfônicos podem ainda influenciar na separação a concentração do sal reagente, o pH da fase móvel e o tipo e a concentração do tampão.

Como exemplo tem-se o octanosulfonato de sódio utilizado na CLAE de fase reversa. Segundo Lima (1999) a melhoria na separação ocorre devido à neutralização das aminas, aumentando o seu tempo e retenção na coluna. Glória e Daeschel (1995) introduziram octanosulfonato de sódio à fase móvel e obtiveram os resultados indicados na Figura 7. Observa-se uma boa resolução para a histamina, no qual foi possível separar e quantificar mais nove aminas as quais poderiam interferir na determinação dos teores de histamina e que podem potencializar o seu efeito tóxico. Embora o método seja eficaz na separação de dez aminas, o tempo de análise é ainda muito longo, havendo necessidade de estudos para reduzi-lo sem prejuízo da eficiência do mesmo.

Figura 7 – Perfil cromatográfico das dez aminas bioativas mais comumente encontradas nos alimentos (CLAE-par iônico, coluna C18 e gradiente de eluição de tampão acetato:acetonitrila)



Fonte: SILVA, 2008.

3.4.3 Separação cromatográfica por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) é uma nova técnica de cromatografia líquida com os mesmos princípios da CLAE. Ela permite o uso de colunas com partículas de diâmetro menor que 2 µm e instrumentação que permite

operar com altas pressões da fase móvel (15.000 psi), consequentemente, reduzindo drasticamente o tempo de separação e quantificação em comparação com a CLAE sem a perda de eficiência, superior resolução e sensibilidade e menor consumo de reagentes e solventes (MALDANER; JARDIM, 2009; DADÁKOVÁ; KRÍZEK; PELIKÁNOVÁ, 2009; LATORRE-MORATALLA et al., 2009; MAYER et al., 2010)

Em 2009, foi publicado por Dadáková; Krízek; Pelikánová, o primeiro trabalho utilizando a CLUE para quantificar aminas biogênicas em alimentos. Estes autores derivaram as aminas com cloreto de dansila antes da separação e utilizaram um detector de arranjo de diodo. Mayer et al. (2010) estabeleceram outro método confiável e rápido de CLUE, empregando como reagente de derivação pré-coluna, o AQC (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato) para a determinação simultânea de vinte aminas biogênicas em queijos. A técnica mostrou-se superior ao método convencional, devido ao menor tempo de execução, maior resolução e sensibilidade. Fiechter et al. (2013), aplicaram a CLUE para a determinação simultanea de 23 aminoácidos e 15 aminas biogênicas em queijos curados, derivadas com AQC, em uma corrida cromatográfica de 9 minutos. O método apresentou boa precisão e exatidão, limite de quantificação e sensibilidade adequadas para os teores encontrados normalmente nas amostras de queijos.

Latorre-Moratalla et al. (2009), usando a técnica de CLUE, validaram um método rápido, preciso e versátil acoplado com derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA) e detector de fluorescência que permitiram a determinação de doze aminas biogênicas e poliaminas em diferentes tipos de alimentos, vinho, peixe, queijo e salsicha. Este trabalho foi o primeiro a utilizar derivação pós-coluna com OPA, o que evita a manipulação excessiva da amostra reduzindo a imprecisão dos procedimentos e o tempo de análise, e proporcionando economia de reagentes e assim menor impacto ambiental. Segundo estes autores foram necessários a adaptação do fluxo da fase móvel e volume de injeção, e também o pH e a temperatura da fase estacionária foram ligeiramente modificadas para aumentar a resolução dos picos de algumas aminas.

O método desenvolvido por Latorre-Moratalla et al. (2009), se aplicado para a determinação de histamina em pescado, pode apresentar muitas vantagens em relação a CLAE, permitindo a realização da análise de histamina com uma rapidez de até dez vezes maior que a técnica convencional, proporcionando um aumento de produtividade, rapidez na obtenção de resultados, e principalmente, menor consumo

de reagentes e solvente.

3.4.4 Método de Detecção

3.4.4.1 Detecção por Fluorescência

Geralmente, as aminas estão presentes em baixas concentrações em matrizes complexas. Além disso, a maioria das aminas absorve na faixa de comprimento de onda de 190-200 nm, região em que a maioria dos grupos funcionais absorve (PEÑA-GALLEGO et al., 2012). Não apresentam absorção no ultravioleta (UV) e nem fluorescência, devido à falta de grupos cromóforos, tornando-se necessário um processo de derivação para aumentar a absorbância e, conseqüentemente, diminuir o limite de detecção (BUSTO et al., 1994; KIRSCHABAUM et al., 1994; ÖNAL et al., 2013).

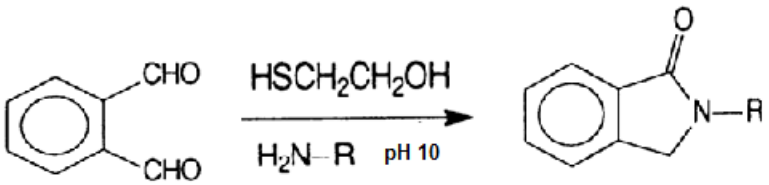
Os reagentes de derivação empregados na análise de aminas são 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) (LOZAVOU et al., 2004), naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (KIRSCHABAUM et al., 1994), cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno sulfonila (cloreto de dansila) (MALLE et al., 1996; DUFLOS et al., 1999; LAPA-GUIMARÃES, 2005), fluorescamina (JAYARAJAH et al., 2007), e *o*-ftalaldeído (OPA) (VALE; GLÓRIA, 1997; ÖNAL, 2007; PEREIRA et al., 2008; SIMAT; DALGAARD, 2011; PEÑA-GALLEGO et al., 2012; ÖNAL et al., 2013; IIJIMA et al., 2013), o 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) (PEÑA-GALLEGO et al., 2012; MAYER et al., 2010; FIECHTER et al., 2013).

A detecção por ultravioleta com pós derivação com cloreto de dansila para a quantificação de várias aminas foi utizada por Mietz e Karmas (1978), Hui e Taylor (1983); Park et al. (2010); Soufleros et al. (2007); Tahmouzi et al. (2011). Ibe et al. (1991) analisaram aminas usando cloreto de dansila com detecção de fluorescência para a quantificação. O cloreto de dansila reage com aminas primárias, secundárias e terciárias em condições extremas. Entretanto, reage também com alcalóides, aminoácidos, fenóis, alcoóis alifáticos, bases purínicas e açúcares (MIETZ; KARMAS, 1978; BUSTO et al., 1994).

A vantagem do uso de *o*-ftalaldeído (OPA) em relação ao cloreto de dansila é a grande seletividade para as aminas (Figura 8) e o aumento da sensibilidade no método de fluorescência, enquanto o cloreto de dansila requerer tempo e temperatura relativamente altos para a formação dos derivados (PEÑA-GALLEGO et

al., 2012). O uso de derivação pós-coluna é recomendado por ser o tempo entre a formação do complexo e a detecção muito pequeno e padronizado (IZQUIERDO-PULIDO; VIDAL-CAROU; MARINÉ-FONT (1993). Glória e Daeschel (1995) utilizaram derivação pós-coluna com OPA para determinar tiramina, agmatina, 2-feniletilamina, espermidina, triptamina, espermina, putrescina, serotonina, cadaverina e histamina em vinho utilizando detector de fluorescência.

Figura 8 – Reação de amina com o-ftaladeído - OPA



Fonte: CONCA et al., 2001.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 MATERIAL

As amostras de peixes (atuns e sardinhas) *in natura* e em conservas foram adquiridas em feiras livres e em estabelecimentos comerciais da cidade de São Paulo, respectivamente. O atum *in natura* foi adquirido em uma porção de cerca de 500 g e as sardinhas inteiras sem escamas e vísceras, aproximadamente de 6 a 7 sardinhas. As amostras *in natura* foram adquiridas de feiras livres da cidade de São Paulo, acondicionadas em gelo e transportadas em caixas isotérmicas para posterior armazenamento em freezer (-18ºC) no Núcleo de Química, Física e Sensorial de Alimentos – Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP, Brasil. As conservas adquiridas de estabelecimentos comerciais da cidade de São Paulo, sendo três das amostras de conserva de atum eram ao natural e o restante em óleo comestível e todas as amostras de sardinha em conserva eram em óleo comestível.

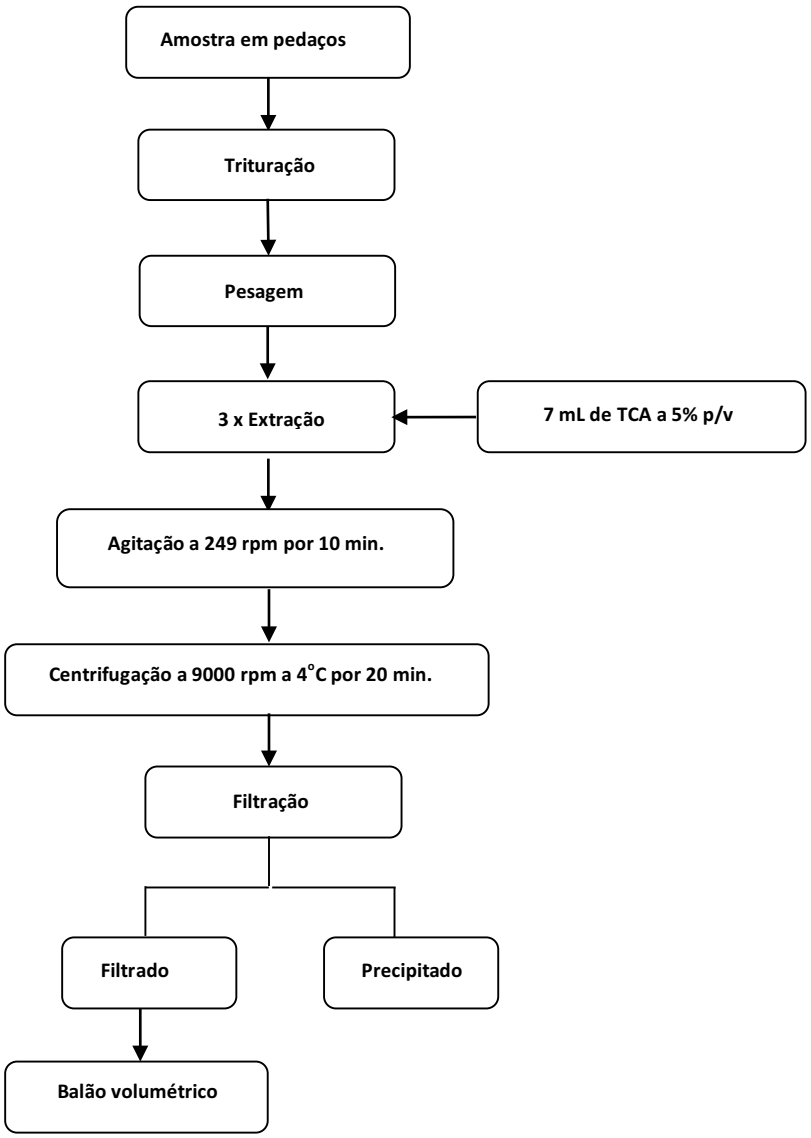
Para a análise do teor de histamina das amostras *in natura*, a porção foi cortado em pedaços e triturado em multiprocessador caseiro. Nas conservas ao natural e ao óleo retirou-se o líquido de cobertura, no caso das sardinhas raspou-se a pele e removeu-se a espinha. As conservas foram homogeneizadas em multiprocessador e posteriormente pesadas para análise.

Pesou-se cerca de 5 g de cada amostra triturada em duplicata para um tubo de centrífuga de 50 mL utilizando-se balança analítica, em seguida adicionou-se 7 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (m/v) e agitou-se o tubo em um shaker por 10 minutos a 249 rpm. Posteriormente, levou-se o tubo para uma centrífuga refrigerada a 4°C a 9000 rpm por 20 minutos, após a centrifugação o extrato foi filtrado com papel de filtro comum para um balão volumétrico de 25 mL. Repetiu-se por mais duas vezes o procedimento descrito, sendo os extratos combinados e o balão volumétrico completado com a solução de ácido tricloroacético a 5% (m/v), conforme fluxograma apresentado na Figura 9. Os extratos foram filtrados e transferidos para frascos de polietileno, acondicionados em freezer (temperatura de -18°C) até o momento da análise.

Foram utilizados os seguintes reagentes para análise (acetato de sódio anidro, ácido acético glacial, ácido bórico, ácido clorídrico, ácido tricloroacético, hidróxido de potássio) foram de grau analítico, BRIJ 35 e o 2-mercaptoetanol (2-MCE) para bioquimica, os solventes (acetonitrila e metanol) e os reagentes de

derivatização *o*-ftalaldeído (OPA) e o octanossulfonato de sódio, de grau cromatográfico. Toda a água utilizada era ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Figura 9 – Fluxograma da extração das aminas biogênicas do pescado.



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

Para a “calibração” do pHmetro Homis portátil – modelo 164 H004579 foram utilizados Materiais de Referência Certificados de pH 4 e 7 da empresa Inorganic

Ventures de Christiansburg, USA.

Foi adquirido da Material de Referência, histamine in canned fish nº 27101 do FAPAS de Sand Hutton, York, UK.

Foram utilizadas para as filtrações das soluções, fases móveis e solventes, membranas de diâmetro de 47 mm e porosidade de 0,22 µm de acetato de celulose e acetato de celulose regenerada da Sartorius. Empregaram-se para a filtração das amostras e padrões unidades filtrantes Millex GV com membrana durapore em PVDF de porosidade 0,22 µm e diâmetro de 13 mm da Millipore e filtros de seringa com membrana de celulose regenerada de porosidade 0,22 µm e diametro 33 mm da Sartorius.

4.2 MÉTODO DE ANÁLISE

4.2.1 Determinação de histamina por CLUE-Fluorescência

Para a determinação de histamina utilizou-se a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detecção por fluorescência e reação de pós derivatização com OPA.

4.2.2 Instrumentação

Nas extrações das amostras foram utilizadas agitador de bancada digital com refrigeração da Jeio Tech - modelo SI-300R e centrífuga de bancada com refrigeração Hettich - modelo 460R.

Na quantificação foi empregado o cromatógrafo líquido, marca Shimadzu, modelo Nexera com duas bombas LC-30AD, degaseificador DGU-20As, amostrador SIL-30Ac, forno de coluna CTO-20AC e detector de fluorescência RF-20A e para a reação de derivatização utilizou-se uma bomba LC-20AD, reator CRB-6A e para aquisição de dados CBM-20A e software *LabSolutions*.

No planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foi utilizado saída do Software StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

4.2.3 Soluções padrões

As soluções estoque das aminas foram preparadas pela dissolução do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1 mol L^{-1}. Preparou-se 50 mL de uma solução estoque em ácido clorídrico 0,1 mol L^{-1} de concentração de 1000 µg mL^{-1}. A partir desta solução foram realizadas diluições para obtenção das soluções analíticas nas concentrações de 0,75, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 µg mL^{-1}. Todas as soluções foram acondicionadas em tubos de 10 mL com tampa, identificadas e armazenadas em freezer (-18ºC) para a realização das análises.

4.2.4 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram as definidas no estudo da robustez: coluna C18 (comprimento de 50 mm, diametro interno 2 mm, partículas de tamanho de 2,2 µm). Utilizou-se eluição por gradiente nas seguintes condições: tempo = 0 min, A:B (80:20); tempo = 2 min, A:B (80:20); tempo = 3 min, A:B (60:40); tempo = 4 min, A:B (50:50); tempo = 5 min, A:B (40:60); tempo = 6 min, A:B(20:80); tempo = 6.40 min, A:B (80:20); tempo = 7 min, A:B (80:20). O fluxo da fase móvel foi de 0,68 mL/min, temperatura do forno da coluna 25ºC, volume de injeção de 1 µL, temperatura do amostrador de 20°C. Condições do reator: fluxo do reagente de derivatização de 0,35 mL mL^{-1} e temperatura do coil de reação de 25°C. Os comprimentos de onda de excitação de 340 nm e emissão de 445 nm. As fases móveis A e B foram os utilizados por Latorre-Moratalla et al. (2009) e o reagente de derivatização de acordo com Vale & Glória (1997), conforme especificado no item 4.2.4.2.

4.2.4.1 Fases móveis

A fase móvel A de acordo com Latorre-Moratalla et al. (2009) foi constituída de soluções de acetato de sódio 0,1 M e octanossulfonato de sódio 10 mM. O pH foi ajustado para 4,8 com ácido acético glacial.

A fase móvel B de acordo com Latorre-Moratalla et al. (2009) foi formada pela mistura do solvente B e acetonitrila na proporção de 6,6:3,4 v/v, onde o solvente B é constituído de soluções de acetato de sódio 0,2 M e octanossulfonato de sódio 10 mM. O pH foi ajustado para 4,5 com ácido acético glacial.

A fase móvel A de acordo com Vale e Glória (1997) foi constituída de soluções de acetato de sódio 0,2 M e octanossulfonato de sódio 15 mM. O pH foi ajustado para 4,9 com ácido acético glacial.

4.2.4.2 Reagente de derivatização

O reagente derivatizante foi preparado segundo Latorre-Moratalla et al. (2009) da seguinte forma: 15,5 g de ácido bórico e 13,0 g de hidróxido de potássio foram dissolvidos em um balão volumétrico de 500 mL. Adicionou-se a esta solução 1,5 mL de BRIJ a 30% v/v, 1,5 mL de 2-mercaptoetanol, 0,1 g de OPA dissolvida previamente em 2,5 mL de metanol. Este reagente foi preparado diariamente, filtrado com membrana de 0,22 µm e protegido de luz.

O reagente derivatizante foi preparado segundo Vale & Glória (1997) da seguinte forma: 25,0 g de ácido bórico e 22,0 g de hidróxido de potássio foram dissolvidos em um balão volumétrico de 500 mL. Adicionou-se a está solução 1,5 mL de BRIJ a 30% v/v, 1,5 mL de 2-mercaptoetanol, 0,2 g de OPA dissolvida previamente em 3,0 mL de metanol. Este reagente foi preparado diariamente, filtrado com membrana de 0,22 µm e protegido de luz.

Todas as soluções (fases móveis e reagente derivatizante) foram degaseificadas no ultrassom antes do uso.

Cuidados que foram tomados no preparo do reagente derivatizante: Soluções de 2-MCE são instáveis a pH > 5 e progressivamente menos estáveis a valores de pH mais elevados. A maioria dos tampões contêm sais de metal suficiente para levar a uma perda substancial de -SH dentro de 1-2 dias. (Fonte: www.sigmaaldrich.com)

4.2.5 Otimização das condições cromatográficas para a separação de histamina e outras aminas por cromatografia líquida de ultra eficiência por fluorescência

Foram estabelecidas condições cromatográficas tais como: gradiente, vazão da fase móvel, tempo de corrida cromatográfica, tempo de retenção, resolução, seletividade, precisão e exatidão, reação de derivatização utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção fluorimétrica com colunas de partículas inferiores a 2 µm, derivação pós-coluna com OPA (LATORRE-MORATALLA et al., 2009; DADÁKOVÁ et al., 2009; MAYER et al., 2010).

4.2.6 Estudo da robustez do método

Segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA uma das mais eficientes estratégias para realizar o estudo de robustez é utilizar os chamados planejamentos fatoriais completos ou fracionários. O planejamento fatorial reduz o número de experimentos (ou ensaios ou amostras) ao mínimo necessário para detectar os efeitos principais e/ou os efeitos de interação dos fatores (BRASIL, 2011).

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Este trabalho teve como objetivo estudar a robustez do método para a quantificação de histamina por cromatografia líquida de ultra eficiência com reação de derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorimétrica utilizando o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} de forma a obter a melhor resposta analítica (área).

O método de análise encontra-se descrito no item 4.2, as soluções padrões foram preparadas de acordo com o item 4.2.4, as condições cromatográficas no item 4.2.5, as fases móveis A e B de Latorre-Moratalla et al.(2009) (Tabelas 4 e 5) , fase móvel A de Vale e Glória (1997) no item 4.2.5.1 e os reagentes de derivatização segundo Latorre-Moratalla et al.(2009) e Vale e Glória (1997) no item 4.2.5.2 e Tabela 6).

Tabela 2: Composição da Fase móvel A

	Concentração	
Autor	Acetato de sódio	Octanossulfonato de sódio
Latorre-Moratalla et al.(2009)	0,1 M	10 mM
Vale e Glória (1997)	0,2 M	15 mM

As soluções foram ajustadas com ácido acético glacial a pHs de 4,85 e 5,20.

Tabela 3: Composição da Fase móvel B (Latorre, 2009)

Proporção	
Solvente B	Acetonitrila
6,6	3,4

Tabela 4: Composição do reagente de derivatização pós-coluna, o preparo destas soluções estão descritas no item 4.2.5.2:

Autor	**Quantidade de reagentes**					
	ácido bórico	hidróxido de potássio	BRIJ a 30%	2-MCE	OPA	metanol
Latorre-Moratalla et al.(2009)	15,5 g	13,0 g	1,5 mL	1,5 mL	0,10 g	2,5 mL
Vale e Glória (1997)	22,0 g	25,0 g	1,5 mL	1,5 mL	0,20 g	3,0 mL
Volume final	500 mL					

Preparo da amostra de pescado enlatado fortificado com padrão de histamina

Amostra de pescado enlatado foi filtrada para retirar o óleo vegetal, triturada, pesada em tubo de 50 mL e fortificada com 10,0 µg mL^{-1} padrão de histamina e seguiu-se o procedimento de extração do item 4.2.1.

Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Para estudar a robustez do método para a determinação de histamina em pescado por CLUE, derivatização pós-coluna com OPA e detecção por fluorescência realizou-se um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}. Este estudo foi planejado após testes prévios e observações realizadas durante a otimização (univariada) das condições cromatográficas e de reação de derivatização pós-coluna.

No planejamento estudou-se comportamento simultâneo de quatro variáveis:

- pH da solução da fase móvel A - Fator (1)
- Concentração da fase móvel A - Fator (2)
- Temperatura do forno da coluna - Fator (3)
- Concentração do reagente derivatizante - Fator (4)

4.2.7 Validação da metodologia para análise de histamina em pescado por cromatografia líquida de ultra eficiência

A validação da metodologia foi feita de acordo com as diretrizes a serem adotadas nos parâmetros (seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e incerteza de medição) estabelecidos nas literaturas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC *International*, 2002), *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2012); EURACHEM/CITAC

(2012); BRASIL (2003); TAVERNIERS et al. (2004); THOMPSON et al. (2002); INMETRO (2010) e *National Association of Testing Authorities* (NATA, 2012); FDA (1997, 2014); STEPHEN et al. (2009).

4.2.7.1 Parâmetros de desempenho analítico de validação

Foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e incerteza de medição.

4.2.7.1.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método em dar resposta satisfatória a um determinado analito na presença de outros analitos ou interferentes. A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito depende das suas concentrações.

A avaliação da seletividade foi realizada pela comparação dos resultados entre dois grupos de ensaios: branco do ensaio (todos os reagentes utilizados no ensaio sem a amostra) e na matriz com o analito. Nos dois grupos foi adicionada concentrações idênticas do padrão, na faixa de interesse.

Foram realizadas determinações das áreas do branco do ensaio em quintuplicata, para a matriz no mínimo cinco níveis de concentrações com o analito em triplicata independente por nível, preparados com e sem presença da matriz, em várias concentrações, seguindo-se o método analítico. Foram construídas curvas analíticas de ambos os grupos para obter a equação de reta por regressão linear. O teste de comparação de inclinação de retas analíticas foi utilizado para verificar o efeito da matriz, segundo a análise estatística de *Student*. Também, foi verificada nas replicatas dos resultados a existência de valores aberrantes, ponto a ponto, por meio do teste de Grubbs.

4.2.7.1.2 Linearidade e/ou faixa de trabalho

Para o estudo da linearidade foram necessários no mínimo cinco níveis de concentração incluindo o zero (branco sem adição de padrão) e para cada nível de

concentração foram analisadas em três replicatas independentes. Foram obtidas equações de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (MMQ). As seguintes etapas foram efetuadas para avaliação da linearidade:

a) Detectou-se a presença de valores aberrantes com 99% de confiança pelo teste de Grubbs em cada nível de concentração e homocedasticidade dos dados.

b) Construí-se o gráfico das concentrações do analito versus respostas medidas.

c) Testou-se a significância da regressão e o desvio da linearidade pelo teste F e pela análise de variância (ANOVA) univariada.

d) Avaliou-se a homogeneidade das variâncias nos níveis de concentração da curva de calibração pelo teste de Cochran.

e) Construíu-se o gráfico de resíduos (concentração teórica da curva versus diferença entre a concentração obtida e o valor de concentração estimado pela equação da reta de regressão) para verificar desvios dos pressupostos para uso da regressão pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

f) Estimou-se a equação da reta de regressão.

g) Avaliou-se os parâmetros da calibração (coeficiente de inclinação "*b*" e coeficiente linear "*a*" com os valores teoricamente esperados pelo teste.

4.2.7.1.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade, mínimo de 6 determinações da amostra fortificada, em um mesmo nível de concentração. Foram calculadas a média, o desvio padrão de repetibilidade (s_r) e o coeficiente de variação (CV%) dos resultados obtidos no ensaio para cada nível de concentração estudado. Verificou-se se o resultado do CV% encontrava-se dentro dos limites aceitáveis, para o nível de concentração, de acordo com o critério de aceitação da recuperação e dos valores de CV em relação à concentração de analito (Quadro 1).

4.2.7.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio do critério de recuperação do analito realizados, fortificando-se a amostra com 2 níveis de concentração de padrão do analito. Analisou-se, no mínimo, 6 replicatas independentes por nível. Para cada nível de concentração adicionada, a recuperação foi calculada pela eq. (1), onde (C1) é igual a concentração determinada na amostra adicionada, (C2)

concentração determinada na amostra não adicionada e (C3) concentração adicionada, como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. Calculou-se a média, desvio padrão, desvio padrão de reprodutivilidade (RSD_R) para cada nível de concentração, se o resultado encontrava-se dentro dos limites aceitáveis, para o nível de concentração, de acordo com o critério de aceitação da recuperação e dos valores de CV em relação à concentração de analito (Quadro 1).

Equação 1:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \qquad (1)$$

Quadro 1 – Critério de aceitação da recuperação e dos valores de CV em relação à concentração de analito.

Concentração do analito	RSDr ou CV (%)	RSD_R (%)	Recuperação (%)
100%	1	2	98-101
10%	1,5	3	95-102
1%	2	4	92-105
0,1%	3	6	90-108
0,01%	4	8	85-110
10 ppm	6	11	80-115
1 ppm	8	16	85-110
10 ppb	10	32	70-125
1 ppb	---	---	75-120

RSD_r: desvio padrão relativo da repetibilidade

RSD_R: desvio padrão relativo da reprodutibilidade

Fonte: Modificado de AOAC, 2002 – Guidelines for single laboratory.

4.2.7.1.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram preparadas 6 replicatas independentes dos brancos de amostras com adição de padrão em uma concentração e quantificado conforme método analítico estabelecido. Foram calculados os desvios padrões (s) de 6 replicatas independentes para amostra branco em uma concentração mínima detectável que gerasse sinal de resposta do equipamento diferente de zero e o LD foi estabelecido conforme a eq. (2).

Equação 2: $$LD = 3s \qquad (2)$$

Foram preparadas 6 replicatas independentes dos brancos de amostras com adição de padrão em uma concentração e quantificado conforme método analítico estabelecido. Foram calculados os desvios padrões (s) de 6 replicatas independentes para amostra branco em uma concentração mínima detectável que gerasse sinal de resposta do equipamento diferente de zero, e o LQ foi estabelecido conforme a eq (3).

Equação 3: $$LQ = 10s \qquad (3)$$

4.2.8 Cálculo de incerteza da medição

Foi estimada a incerteza do método na determinação de histamina na amostra de pescado por cromatografia líquida de ultra eficiência segundo os procedimentos adotados pelo ISO GUM (JCGM, 2008), EURACHEM/CITAC (2012) e Oliveira et al. (2015).

4.2.9 Aplicação da metodologia na quantificação de histamina em pescados

As amostras foram trituradas e 5 g de amostra foi pesada em duplicata, em seguida extraídas por três vezes com 7 ml de ácido tricloroacético a 5 % (ZEE et al., 1983), seguindo-se o item 4.1. Os extratos combinados em um balão volumétrico de 25 mL. Os extratos foram filtrados e transferidos para frascos de polietileno, acondicionados em freezer (temperatura de -18°C) até o momento da análise. Foram analisadas conforme metodologia por CLUE otimizada e validade – modificado (LATORRE-MORATALLA et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A SEPARAÇÃO DE HISTAMINA E OUTRAS AMINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA PAR IÔNICO, DERIVAÇÃO PÓS COLUNA COM *O*-FTALALDEÍDO E DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA

Inicialmente, foram testadas condições isocráticas para a separação das aminas. Porém, as corridas necessitavam de um tempo excessivo, inviabilizando a separação.

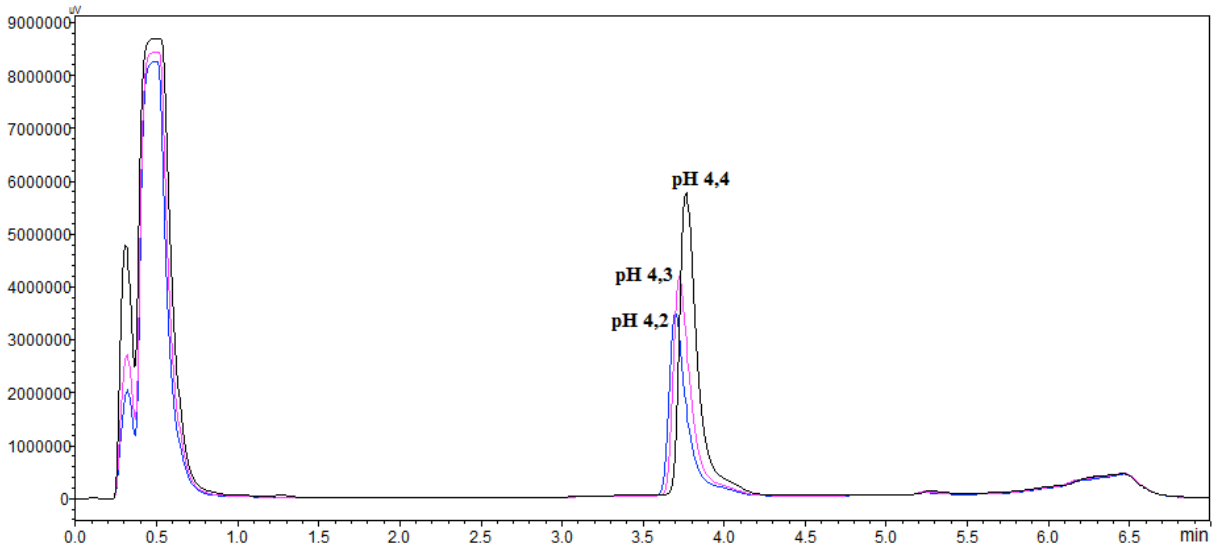
Como as aminas não interagem facilmente com a superfície hidrofóbica da coluna de fase reversa, utilizamos o ácido octassulfônico como nos métodos de Silva (2008) e Latorre-Moratalla et al. (2009), este reagente tem a função de auxiliar na retenção destas moléculas presentes na amostra. Assim, partimos para os testes com eluição por sistema de gradiente usando as fases móveis A (acetato de sódio e octanossulfonato de sódio) e B (acetonitrila). Foram realizadas inúmeras corridas cromatográficas variando-se a concentração dessas fases móveis, resultando em separações inadequadas.

Foram realizados experimentos com sistema de gradiente baseando-se na FM A de proposto por Latorre-Moratalla et al. (2009) e para a FM B utilizamos a seguinte composição solvente B/acetonitrila/metanol, no entanto, não foi obtida uma boa separação das aminas.

Prosseguiu-se a otimização baseando-se no método de Latorre-Moratalla et al. (2009), utilizando as mesmas fases móveis A e B desses pesquisadores. Variamos a proporção das fases móveis A e B para a realização do gradiente, diferentemente do proposto pelos autores. Além da composição das fases móveis, variamos o fluxo nas corridas cromatográficas e a concentração do reagente (acetado de sódio e do octanossulfonato de sódio) que compõe as fases móveis A e B. Entretanto, não se obteve boas separações das aminas.

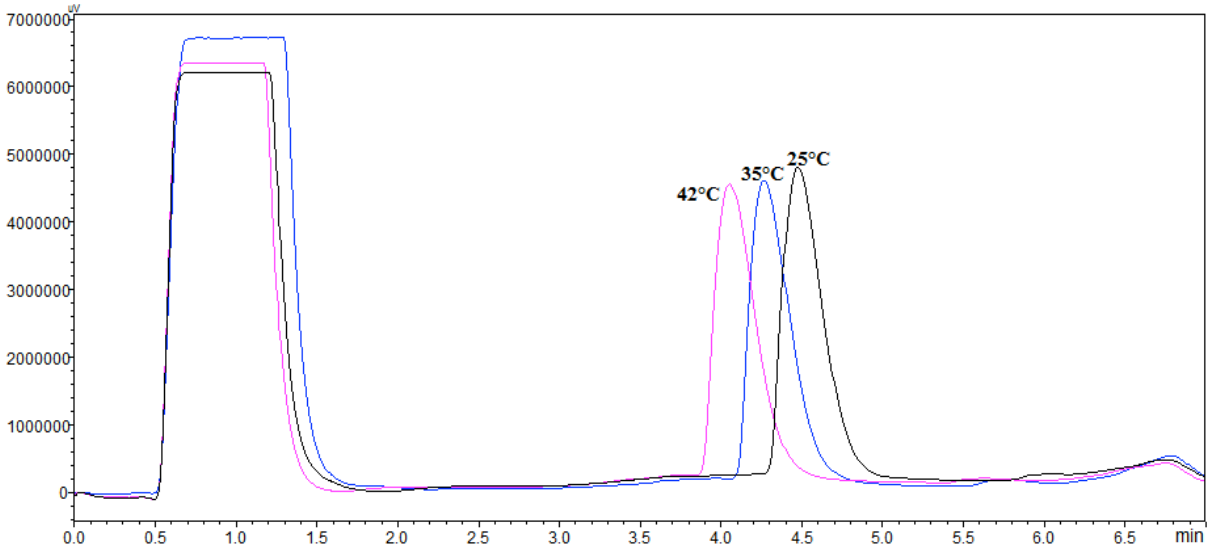
Durante a otimização observou-se que a alteração no pH da fase móvel A não influênciou a separação das aminas. Variou-se o pH de 4,1 a 4,4, notou-se que a medida que o pH da fase móvel era corrigido para pH mais ácidos, obtínhamos uma melhor separação, no entanto, resultavam na diminuição da altura do pico (Figura 10). Portanto, corrigindo-se o pH da fase móvel A 4,8, obtínhamos razoáveis separações e respostas analíticas (áreas).

Figura 10 – Cromatograma de histamina extraído do MR FAPAS utilizando FM A com diferentes valores de pHs



Outro parâmetro que foi variado foi a temperatura do forno da coluna. Os resultados mostraram que à medida que se aumentou a temperatura do forno, os picos eluiram mais rapidamente (Figura 11).

Figura 11 – Cromatograma de histamina (MR FAPAS) utilizando diferentes temperaturas de forno

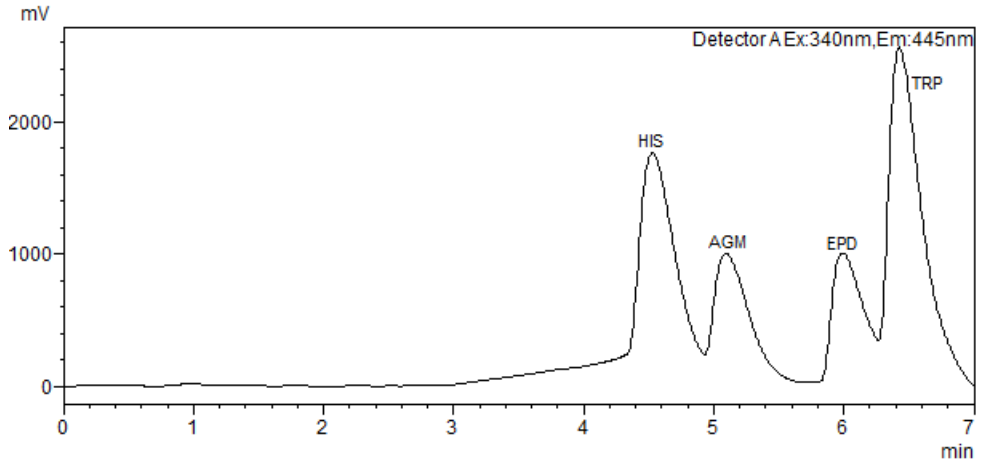


Os melhores resultados da separação das aminas biogênicas foram obtidos utilizando-se gradiente e concentração das fases móveis A e B proposto por Latorre-

Moratalla et al. (2009). Deste modo, para a otimização do método tivemos uma boa separação da histamina, agmatina, espermidina e da triptamina (resolução > 1). Ao passo que os picos da putrescina, tiramina e a cadaverina sobrepuseram-se ligeiramente (resolução < 1). A resolução (Rs) é um parâmetro que indica se separação de uma dada mistura de substância em cromatografia líquida foi adequada. Ela mede quantitativamente a separação de dois picos adjacentes. Segundo Snyder e Kirkland (1979) duas bandas são bem separadas quando a resolução é igual a um.

Na separação cromatográfica das aminas os formatos dos picos obtidos mostram alargamento da banda (Figura 12). Entretanto, segundo Quattrocchi, Andrizzi e Laba (1992) com as bases podem ocorrer mecanismos de interação de fase reversa e de troca iônica na coluna C18, resultando picos largos, com *tailing* pronunciado. Outra causa de os picos apresentarem assimetria frontal é o uso de cromatografia com formação de par de íons (NETO, 2010). De acordo com Quattrocchi, Andrizzi e Laba (1992), pode-se aceitar um pico apresentando assimetria frontal quando o valor do *tailing* for ≤ 1,5 para amostras controle e ≤ 2,0 para amostras de rotina. Portanto, os quatro picos obtidos na separação cromatográfica das aminas resultaram em valores de *tailing* menor que 1,5, apresentando assim uma boa separação.

Figura 12 – Cromatograma de padrões de aminas biogênicas



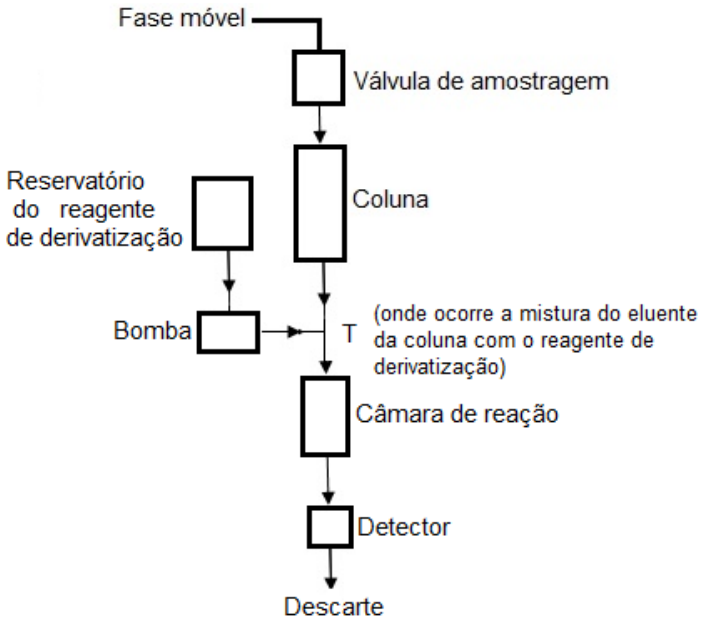
5.2 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

A derivatização pós coluna não só obriga a seleção de reagentes mais

apropriados para reagir com o soluto para o torná-lo detectável, mas também envolve a modificação do sistema cromatográfico para permitir que a reação ocorra, implicando na inserção de um reator de pós-coluna entre a coluna e o detector (Scott, 1986). Além disso, de acordo com Scott (1986), o reator é forçado a proporcionar uma fonte de reagente e um meio de misturá-lo de forma eficiente com o eluente da coluna, afim de assegurar que a reação seja completa antes do produto derivatizado percolar para o detector. Também, deve-se minimizar a dispersão que ocorre no reator, de modo que a integridade da separação que ocorre na coluna seja mantida (Figura 13).

Segundo a Figura 13, no T ocorre a mistura do eluente da coluna com o reagente de derivatização. Essa mistura passa pela câmara de reação na qual há um fio (tubo) na forma de espiral (*coil*) que possibilita o maior contato do eluente da coluna com a solução derivatizante. O tempo que essa mistura percola pelo coil assegura que a reação de derivatização ocorra por completo. Portanto, o comprimento do coil na reação de pós-derivatização é muito importante.

Figura 13 – Sistema cromatográfico com o reator de pós-derivatização



Fonte: Scott, 1986 – modificado.

Izquierdo-Pulido; Vidal-Carou e Mariné-Font (1993) utilizaram uma bobina de tubo de aço inoxidável, de comprimento de 200 cm e diâmetro interno de 0,01 para conectar o T e o detector para determinação de aminas biogênicas em cervejas e suas matérias-primas por Cromatografia Líquida Par Iônico com derivatização pós-

coluna. Veciana-Nogues et al. (1997) também utilizaram um coil com as mesmas características do trabalho de Izquierdo-Pulido; Vidal-Carou e Mariné-Font (1993) para determinação de aminas biogênicas em peixe e seus derivados. Vale e Glória (1997) empregaram um tubo de 200 cm de extensão e diâmetro interno de 0,3 mm de teflon protegido de luz para a reação de pós-derivatização para a determinação de aminas biogênicas em queijos. Oguri et al. (2008) utilizou a eletrocromatografia capilar e derivatização pós-coluna para a detecção de aminas biogênicas em atum conectando um tubo de polietileno de 5 cm entre coluna capilar e o detector. Triki et al. (2012) otimizou um procedimento cromatográfico para a determinação da concentração de amina biogênica em carne e em produtos de carne utilizando uma coluna de troca catiónica com um sistema de pós-derivatização da empresa Pickering PCX 3100.

Neste trabalho, inicialmente, utilizou-se um fio reto de 9 cm (coil) localizado na saída do T e detector. Observamos que a reação ocorria entre o analito e o reagente de pós derivatização, entretanto, o comprimento deste fio não era suficientemente longo não dando tempo para que a reação ocorresse por completo.

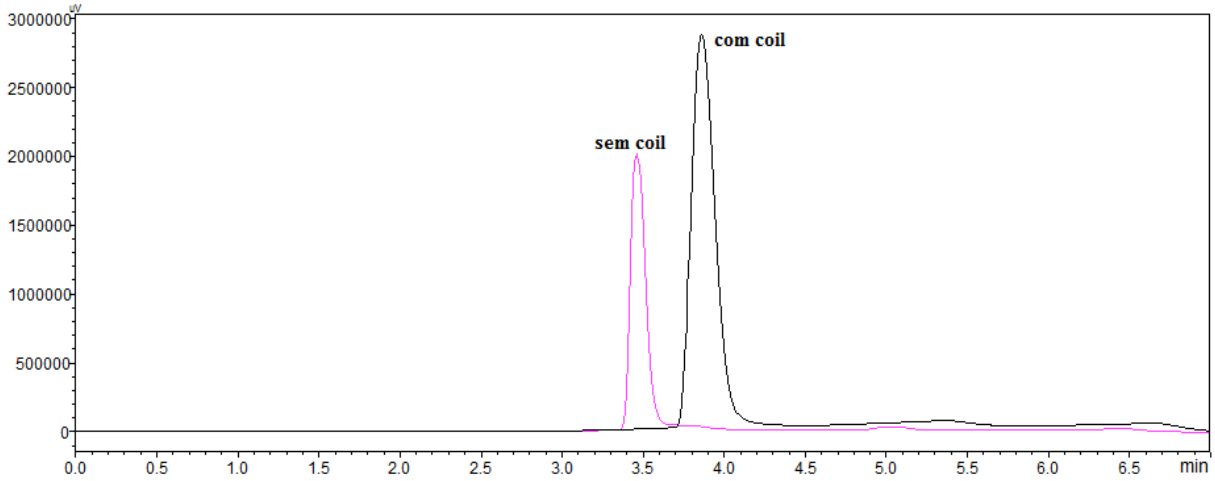
Em seguida, testou-se fios retos de 27 cm, 34 cm e 60 cm para verificar qual o comprimento ideal para que a reação de derivatização ocorre-se por completo no coil. Os resultados utilizando-se os fios de 27 cm e 34 cm foram semelhantes aos do fio de 9 cm. Já para o fio de 60 cm, observamos que a reação era completa (Figura 14).

Testamos coils nas formas em espiral. Utilizamos um coil na forma de espiral, comprimento de 100 cm e também dois coils em série na forma de espiral de 100 cm de cada. Os resultados foram satisfatórios empregando-se um coil e os dois coils em série, a histamina e o OPA reagiram por completo formando o derivado.

Ijima et al. (2013) otimizaram um sistema CLUE online de derivatização pós-coluna com OPA, utilizando fases móveis: eluente A – soluções de fosfato dihidrogênio de sódio 10 mM e perclorato de sódio 150 mM (pH ajustado a 2,0 com ácido fosfórico contendo sal ácido 1-pentanosulfônico de sódio 20 mM. Eluente B - mistura de soluções de fosfato dihidrogênio de sódio 10 mM e perclorato de sódio 150 mM (pH ajustado a 2,0 com ácido fosfórico)-metanol (50:50) contendo contendo sal acido 1-pentanosulfônico de sódio 20 mM. Nesse estudo, empregaram-se coils nas formas de U e em espiral, e concluiram que o melhor coil tinha comprimento de 100 cm e a forma de espiral, sendo aplicado para a análise simultânea de aminas com eluição por gradiente. Em seu trabalho Latorre et al. (2009) não descreveu o

uso de coil.

Figura 14 – Resultados do derivado de histamina utilizando vários formatos de coils.



Apesar dos resultados terem sido satisfatórios utilizando-se coils de fio reto de 60 cm, com uma espiral e com duas espirais em série para a reação de derivatização, optou-se utilizar somente um coil na forma de espiral e de comprimento de 100 cm. Além dos resultados de otimização confirmarem que é o comprimento ideal para a reação de derivatização, esse formato permite que o coil seja mantido totalmente dentro do reator e permaneça exposto ao aquecimento que favorece a derivatização efetiva.

5.3 ESTUDO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA PAR IÔNICO, DERIVAÇÃO PÓS COLUNA COM O-FTALALDEÍDO E DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA

A matriz do planejamento para as amostras de pescado fortificado com padrão de histamina a 10 µg mL^{-1} encontra-se descrita na Tabela 5, cada um dos fatores foi avaliado em dois níveis, nível máximo (+1) e nível mínimo (-1). Visto que o planejamento fatorial fracionário foi de quatro fatores (2^{4-1}), totalizando 8 ensaios com duas repetições.

Os níveis das variáveis de pH e fase móvel foram baseados em trabalhos relevantes na literatura para análise de histamina em pescados. E os níveis das

variáveis temperaturas do forno da coluna e as concentrações do reagente derivatizante foram determinados após alguns estudos prévios que mostraram uma tendência a uma melhor separação e quantificação do pico de histamina em relação às demais aminas, que possivelmente podem ser encontrados nos pescados (Latorre-Moratalla et al., 2009, Veciana-Nogues et al., 1995, Vale e Glória, 1997).

Na Tabela 6 e no gráfico de Pareto (Figura 18) podem ser visualizados os resultados obtidos da significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações. Pode-se observar que todas as variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} de cada fator com nível de significância de 95%.

Tabela 5: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para as amostras de pescado fortificadas com histamina (10,0 µg mL^{-1})

Ensaios	Fatores codificados				Fatores originais			
	Fator (1)	Fator (2)	Fator (3)	Fator (4)	pH (1)	Concentração da Fase Móvel A (2)	Temperatura do Forno da Coluna (3)	Concentração do Reagente Derivatizante (4)
1	-1	-1	-1	-1	4,85	acetado de sódio 0,1 M + octanossulfonato de sódio10 mM	25	15,5 g H_3BO_3+13,0g KOH 0,10 g OPA
2	1	-1	-1	1	5,20	acetado de sódio 0,1 M + octanossulfonato de sódio10 mM	25	22,0 g H_3BO_3+25,0g KOH 0,20 g OPA
3	-1	1	-1	1	4,85	acetado de sódio 0,2 M + octanossulfonato de sódio15 mM	25	22,0 g H_3BO_3+25,0g KOH 0,20 g OPA
4	1	1	-1	-1	5,20	acetado de sódio 0,2 M + octanossulfonato de sódio15 mM	25	15,5 g H_3BO_3+13,0g KOH 0,10 g OPA
5	-1	-1	1	1	4,85	acetado de sódio 0,1 M + octanossulfonato de sódio10 mM	35	22,0 g H_3BO_3+25,0g KOH 0,20 g OPA
6	1	-1	1	-1	5,20	acetado de sódio 0,1 M + octanossulfonato de sódio10 mM	35	15,5 g H_3BO_3+13,0g KOH 0,10 g OPA
7	-1	1	1	-1	4,85	acetado de sódio 0,2 M + octanossulfonato de sódio15 mM	35	15,5 g H_3BO_3+13,0g KOH 0,10 g OPA
8	1	1	1	1	5,20	acetado de sódio 0,2 M + octanossulfonato de sódio15 mM	35	22,0 g H_3BO_3+25,0g KOH 0,20 g OPA

Concentrações de Latorre-Moratalla et al. (2009): acetado de sódio 0,1 M + octanossulfonato de sódio10 mM e 15,5 g H_3BO_3+13,0g KOH 0,10 g OPA
Concentrações de Vale & Glória (1997): acetado de sódio 0,2 M + octanossulfonato de sódio15 mM e 22,0 g H_3BO_3+25,0g KOH 0,20 g OPA

Tabela 6: Análise estatística dos Efeitos do Planejamento fatorial fracionário (2^{4-1})

*Estimativa do Efeito, Va: Área da Histamina; R^2 = 0,99573
Design 2^{4-1}; MS Residual = 729943E5
DV: Área Histamina

Fatores	Efeito ± erro padrão		t(8)	p
Media/Interc.	53904785	67543,6	790,0734	0,000000
(1)pH	1651056	135087,3	12,2221	0,000002
(2)Fase móvel A	-3233391	135087,3	-23,9356	0,000000
(3)Temperatura do forno	-2423651	135087,3	-17,9414	0,000000
(4) Conc.deriv.	3375985	135087,3	24,9911	0,000000
1 x 2	871631	135087,3	6,4524	0,000198
1 x 3	650161	135087,3	4,8129	0,001333
1 x 4	-1559661	135087,3	-11,5456	0,000003

$t_{calculado} > t_{(\alpha/2,\ 8)}$ = 1,86 e valor *p* < α (0,05),*saída do Software StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

Tabela 7: Resultados da ANOVA do Planejamento fatorial fracionário (2^{4-1})

*ANOVA; Var: Área da Histamina; R^2 = 0,99573
Design 2^{4-1}; MQ Residual = 729943E5
DV: Área Histamina

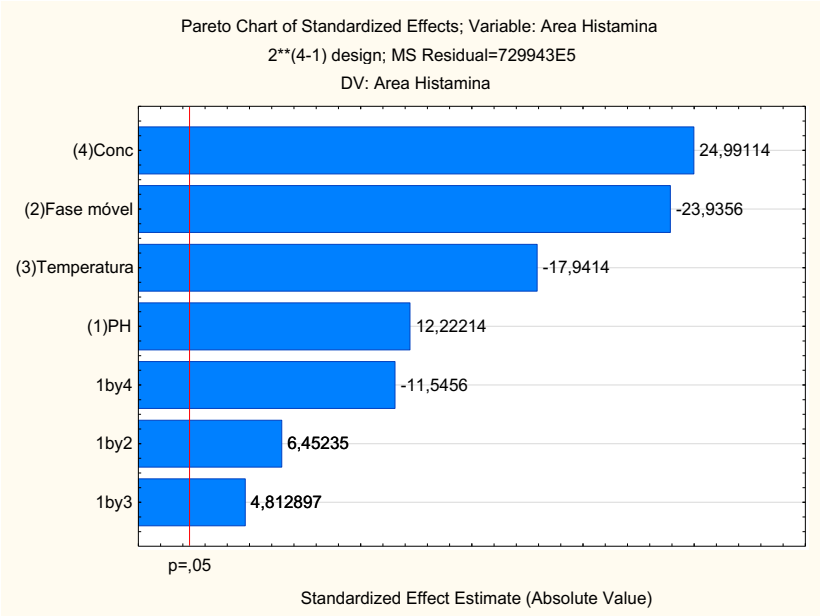
Fator	SQ	g.l	MQ	F	p
(1)pH	1,090394E+13	1	1,090394E+13	149,3807	0,000002
(2)Fase móvel A	4,181927E+13	1	4,181927E+13	572,9114	0,000000
(3)Temperatura do forno	2,349633E+13	1	2,349633E+13	321,8927	0,000000
(4) Conc.deriv.	4,558911E+13	1	4,558911E+13	624,5570	0,000000
1 x 2	3,038959E+13	1	3,038959E+12	41,6328	0,000198
1 x 3	1,690839E+13	1	1,690839E+12	23,1640	0,001333
1 x 4	9,730167E+13	1	9,730167E+12	133,3004	0,000003
Erro	5,839544E+11	8			
Total SS	1,368526E+14	15			

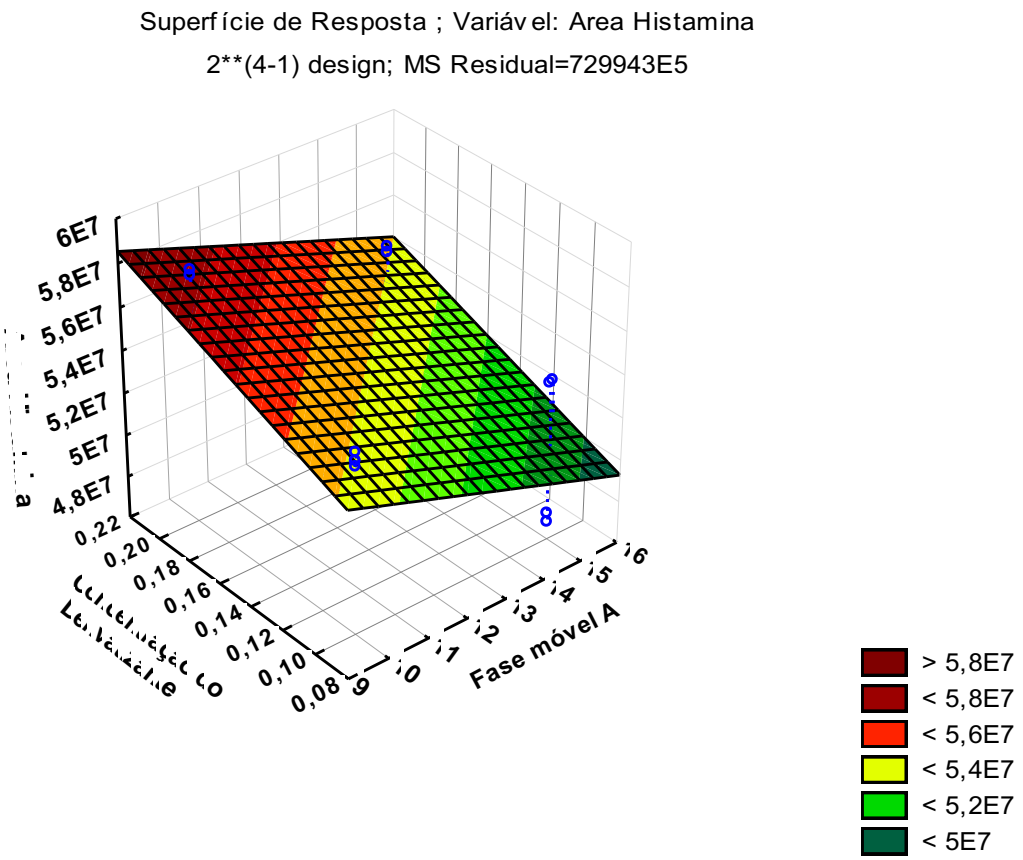
$F_{calculado} > F_{(0,05,\ 1,\ 15)}$ = 8,68 e valor *p* < α (0,05); *saída do Software StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

No Gráfico de Pareto (Figura 15) observa-se que o maior efeito está na variável concentração do derivatizante (p > 0,05), seguido da concentração da fase móvel A, temperatura da coluna no forno e pH, respectivamente, além de suas interações significativas.

Os resultados indicaram que a variável concentração do derivatizante é muito importante para a realização da reação de pós-coluna quando se utiliza uma solução do reagente derivantizante de maior concentração, esta variável foi significativa para determinação de histamina, resultando em áreas maiores do derivado OPA-histamina, no nível (+1) correspondente a concentração de 22,0 g H_3BO_3 + 25,0 g KOH e 0,20 g OPA, confirmando assim que a reação de derivatização foi completa nessa concentração.

Figura 15. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} obtido para determinação de histamina (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança) e Superfície de Resposta





Com a confirmação que a reação de derivatização foi completa, pode se sugerir que este trabalho trouxe uma inovação, a possibilidade de unir um sistema de CLUE com a reação de pós-derivatização. Alguns trabalhos na literatura relatavam a dificuldade de unir este sistema devido a sua rapidez, assim não haveria a possibilidade de se completar a reação de derivatização pós-coluna para a determinação do teor de histamina.

Com relação aos níveis da concentração da fase móvel A, pode-se observar que a menor concentração de acetato de sódio 0,10 M e octanosssulfonato de sódio 10 mM, nível (-1) apresentou a maior intensidade da área do pico de histamina. Sugerindo que a composição da fase móvel pode ser um diferencial para aumentar o rendimento da área do pico de histamina.

A temperatura foi a terceira variável significativa que no nível (-1) temperatura de 25ºC no forno da coluna obteve-se valores de maior intensidade da área do pico de histamina em relação ao nível (+1) de temperatura.

Quanto aos fatores de interações de segunda ordem 1x2, variável pH *versus* FM A nos níveis (-1) e (+1) sugeriram que o intervalo escolhido de pH não influenciou significativamente a intensidade da área de histamina nas condições cromatográficas e nem a interação 1x3, temperatura do forno da coluna e concentração de fase móvel A. Entretanto, observou-se que na interação 1x3, a variável concentração de fase móvel A e temperatura teve efeito sinérgico entre as variáveis sendo que a menor concentração com a menor temperatura mostrou a melhor condição cromatográfica para determinação do pico de histamina. A concentração do octanossulfonato de sódio foi relacionada com a retenção. Este reagente foi importante na separação de várias aminas.

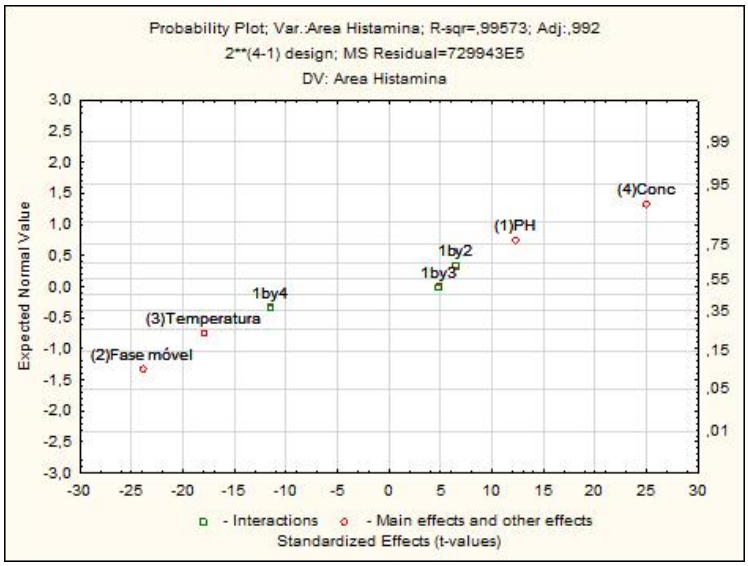
Outro fator que poderia ainda influenciar na separação seria o pH da fase móvel por controlar o grau de ionização dos solutos, entretanto, este parâmetro mostrou-se pouco significativo.

Outra forma de se avaliar os fatores significativos foi utilizando o gráfico normal dos contrastes.

O resultado obtido no Gráfico normal (Figura 16) dos efeitos é semelhante ao de Pareto. Observa-se que os fatores principais 1, 2, 3 e 4 são significativos, assim como os fatores de interação de segunda ordem 1x4, 1x2, 1x3. Como o fator 4 possui valor positivo no gráfico, o aumento deste nível, indicam melhores respostas. De forma análoga, os fatores 2 e 3 estão localizados na região negativa do gráfico e

portanto, a diminuição dos valores destes fatores tende aos valores ótimos nos resultados deste experimento.

Figura 16. Gráfico normal dos contrastes



Assim, a partir das variáveis codificadas foi possível construir o modelo, com os parâmetros estatisticamente significativos, que permitiram estabelecer condições cromatográficas que poderiam ser aplicadas nos seus intervalos de superfície para análise de histamina em pescado.

Conforme modelo gerado na superfície de resposta (eq. 4), pode-se estabelecer condições cromatográficas para análise de histamina em pescado: composição da fase móvel A formada de acetato de sódio 0,1 M e octanossulfonato de sódio 10 mM, temperatura do forno da coluna a 25ºC e o valor de pH escolhido pode estar dentro do intervalo de 4,85-5,20 empregando-se uma coluna cromatográfica C18, comprimento de 50 mm, diâmetro de 2 mm e tamanho de partícula de 0,22 µm e uma reação de pós-derivatização que empregue uma concentração de 22,0 g H_3BO_3 + 25,0g KOH e 0,20 g OPA.

O modelo estatístico do planejamento fatorial pode ser apresentado pela equação 4 abaixo:

Equação 4: $\boldsymbol{Y = 53904784,75 + 825528,0x_1 - 1616695,5x_2 - 1211825,375x_3 + 1687992,625x_4 + 435815x_1x_2 + 325081x_1x_3 - 779830x_1x_4 + 67543,6452}$

Com esse modelo pode-se obter valores estimados para as respostas para valores da variável independente internos ao intervalo estudado, isto é, pode-se

estimar o valor da variável resposta Y para algum valor da variável independente X pertencente ao intervalo já utilizado no experimento, via modelo ajustado (GALDÁNEZ, 2002).

Além disso, pela Análise de Variância (ANOVA), verificou-se que os valores obtidos no Teste F (calculado) foram superiores ao teste F tabelado (Tabela 9). Portanto, quanto maior o F, melhor, pois significa que os quadrados médios do modelo são maiores que os quadrados médios residuais. Assim, quanto maior o F, mais significativo o valor de *p* para ANOVA como mostrado na Tabela 9 e o modelo está bem ajustado e pode-se dizer que é robusto (GALDÁNEZ, 2002)..

5.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE HISTAMINA EM PESCADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

Os parâmetros de desempenho analítico de validação foram obtidos utilizando-se as condições cromatográficas definidas na otimização e na robustez.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada na faixa linear (2,5; 5,0; 10,0; 15;0; 25,0 e 30 µg mL^{-1}) comparando-se os resultados entre dois grupos de ensaios: branco do ensaio (padrão de histamina em solução de ácido clorídrico 0,1 M) - Grupo 1 e na amostra-branco (matriz da amostra “conserva de atum em óleo” sem analito histamina) - Grupo 2. Nos dois grupos foram adicionadas concentrações idênticas do padrão de histamina e assim construídas curvas de calibração de ambos os grupos com 7 pontos (2,5; 5,0; 10,0; 15;0; 25,0 e 30 µg mL^{-1}) e 3 replicatas independentes por nível. Além disso, foi realizada avaliação das triplicatas em cada nível de concentração pelo teste de Grubbs para detectar valores aberrantes com 99% de confiança (Tabela 8). Os resultados mostraram que não houve valores aberrantes, todos os valores de G_{calc} foram menores que o G_{tab} (1,155), não havendo valores aberrantes (*outliers*) nos dois grupos.

Outro teste realizado para avaliação estatística dos resultados da seletividade foi o teste *F*. Este teste mostrou que com 5% de significância as variâncias eram heterogêneas, *F*calc (5,687) foi maior que o *F*crit (2,526). Assim, com base neste resultado foi necessário aplicar o teste t para avaliar a equivalência das médias dos dois grupos com 95% de confiança. O tcalc (0,369) foi menor que o tcrítico (2,060),

ou seja, as médias dos resultados dos grupos foram estatisticamente iguais. Pode-se verificar pelo teste de comparação de inclinação de retas analíticas que as inclinações foram estatisticamente iguais, b1(2390851,1907) = b2(2400056,8488), Figura 17.

Conclui-se que as inclinações são equivalentes nos dois grupos e que não há efeito de matriz (a matriz não afeta o ensaio). Portanto, a adição de padrão na matriz não é necessária para se construir a curva de calibração nas análises de rotina (Figura 17).

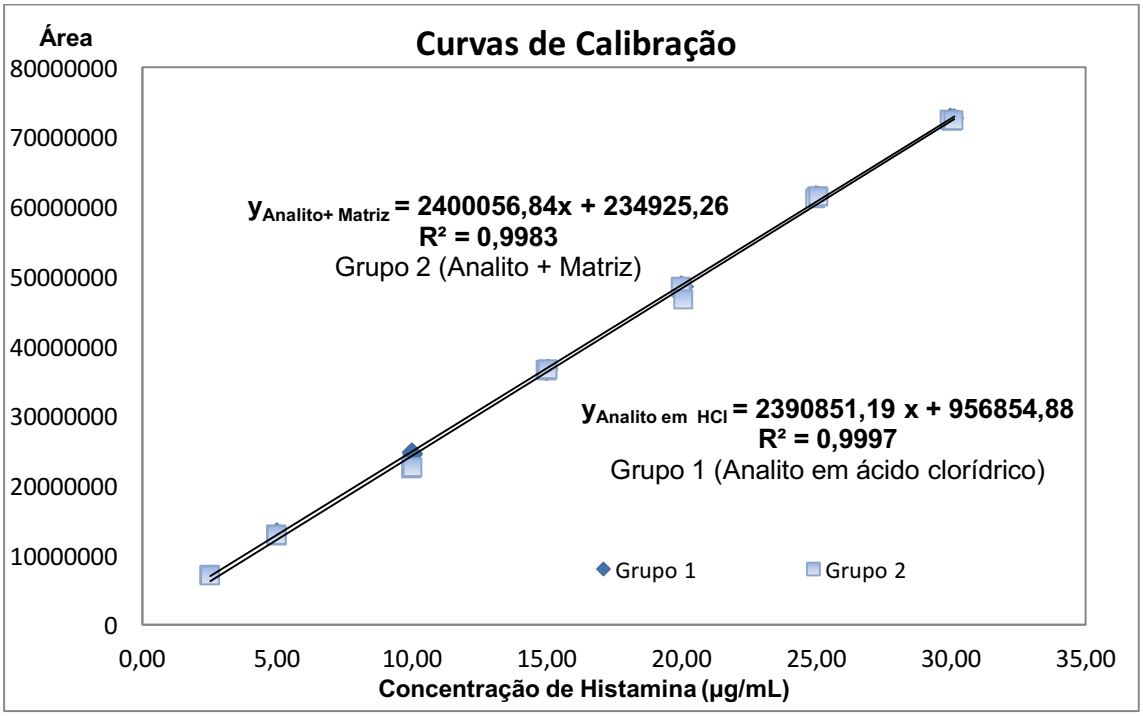
Tabela 8: Valores obtidos do teste de Grubbs para os Grupo 1 e Grupo 2.

Concentração do analito (µg mL^{-1})	Replicata	Áreas do analito branco-ensaio	Áreas do analito na matriz	Grupo 1		Grupo 2	
				$G_{calc} \leq 1,155$			
				G_{calc}		G_{calc}	
				máximo calculado	mínimo calculado	máximo calculado	mínimo calculado
		Grupo 1	Grupo 2				
2,5	1	7230764	7061723	1,082	0,890	1,086	0,884
	2	7178645	7048292				
	3	7150106	7052940				
5,0	1	13169715	12738339	1,148	0,679	0,940	1,051
	2	13243722	12853421				
	3	13160089	12805455				
10,0	1	24365849	22430408	0,959	1,037	1,123	0,794
	2	24739871	22393687				
	3	24574878	22545187				
15,0	1	36535160	36415685	1,039	0,955	0,715	1,143
	2	36373334	36537090				
	3	36743915	36559316				
20,0	1	48427358	48294680	1,089	0,877	0,629	1,153
	2	48699457	48400541				
	3	48519260	46586815				
25,0	1	61366574	61388742	0,815	1,116	0,583	1,155
	2	61681361	61144681				
	3	61597498	61390378				
30,0	1	72533834	72200969	0,886	1,085	0,900	1,077
	2	72787767	72410668				
	3	72699279	72334017				

Grupo 1: branco do ensaio (padrão de histamina em solução de ácido clorídrico 0,1 M)

Grupo 2: amostra-branco (matriz da amostra “conserva de atum em óleo” sem analito histamina)

Figura 17 – Comparação da inclinação das curvas de histamina em ácido clorídrico e na matriz.



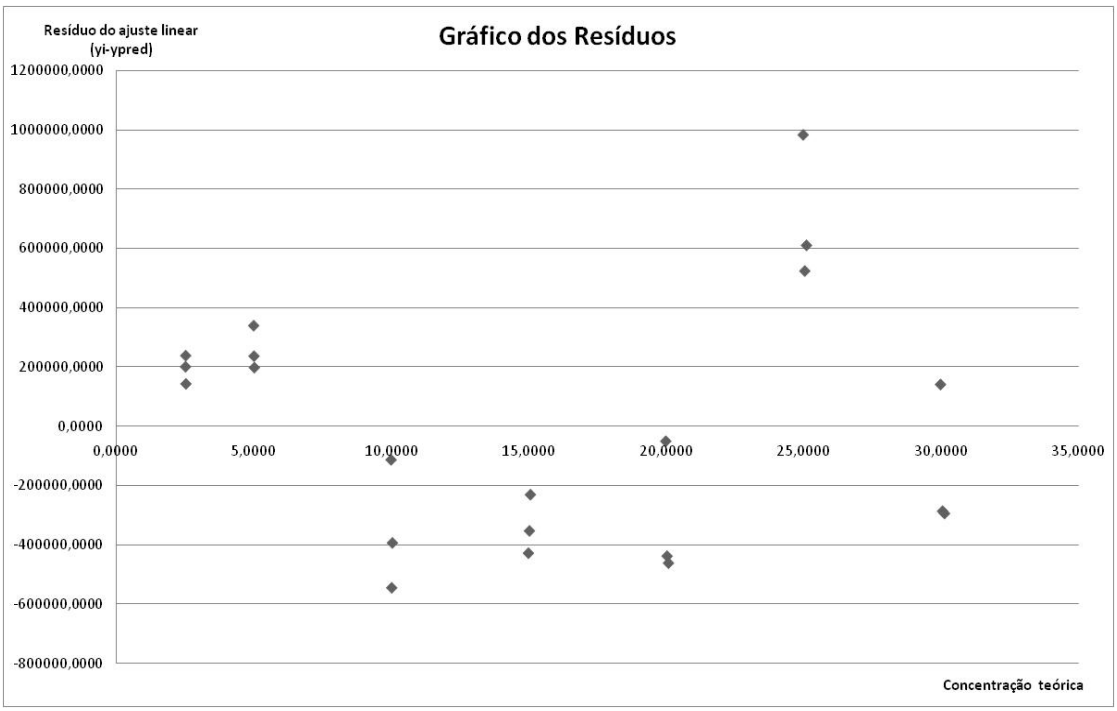
5.4.2 Linearidade e/ou faixa de trabalho

A faixa de valores de concentração de histamina em que foi construída a curva de calibração contempla a faixa de trabalho no qual o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho foi preparada utilizando-se solução padrão estoque de histamina, de forma a obter soluções diluídas nas seguintes concentrações 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 µg mL^{-1}. Ou seja, 7 níveis de concentração e para cada nível de concentração foram efetuadas três replicatas independentes, utilizando-se assim o branco do ensaio (Grupo 1).

Foi aplicado o teste de Grubbs para detectar a presença de valores aberrantes com 99% de confiança em cada nível de concentração. Neste teste, verificou-se que não houve valores aberrantes. Em seguida, construiu-se um gráfico das concentrações de histamina versus respostas medidas (áreas), aplicou-se a regressão linear. Observou-se que o valor-*p* (8,40216 $x10^{-35}$) do teste *F* foi menor que 0,05 e que o *F*calc (61278,1228) foi maior que o *F*crítico. A regressão linear foi significativa, isto é, a resposta analítica está diretamente correlacionada de forma linear com as concentrações analisadas. Logo após, aplicou-se o teste de Cochran para avaliar a homogeneidade das variâncias nos níveis de concentração da curva e

comparar a maior variância individual com a soma das variâncias de todos os resultados. Obteve-se que o *Ccalc* (0,2588) foi menor *Ccrítico* (0,6644) com 99% de confiança e as variâncias foram homogêneas e homocedásticas. Pode-se assim prosseguir com o estudo, calculando-se os parâmetros da curva de calibração de acordo com o método dos Mínimos Quadrados (MMQ). Construiu-se o gráfico de resíduos e verificou-se que os resíduos seguem uma distribuição normal, homocedástica e sem tendências (Figura 18). Após a constatação que o uso do MMQ foi adequado, os coeficientes da reta de regressão foram obtidos pela equação ($y = a + bx$). Calcularam-se os coeficientes de determinação (r^2 = 0,9997) e de correlação (r = 0,9998), *desvio padrão residual* (s_{res} = 420648,0204*), desvio padrão da inclinação* ($s(b)$ = 9658,2806*), desvio padrão do intercepto* ($s(a)$ = 174697,5334*)*, obtendo-se assim a equação da reta y = 2390851,19x + 956854,88.

Figura 18 – Gráfico de resíduos



A significância do coeficiente de inclinação b e do coeficiente de intercepto foi estimada, a 95% de confiança, pelo teste *t* e valor-*p*, o valor do *t*calc da inclinação = 247,5442 e *t*critico = 2,0930, *t*calc do intercepto = 5,4772 e *t*critico = 2,0930, e valores-*p* para inclinação = 8,40216 x 10^{-35} e intercepto = 2,76946 x 10^{-5}, confirmando assim a significância dos referidos coeficientes. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos relatados pela literatura. Pode-se comprovar que a faixa de trabalho cobre a faixa de concentração para a qual o

método poderá ser aplicado, na qual o sinal analítico é linearmente proporcional à sua concentração.

Latorre-Moratalla et al., (2009), obtiveram por Análise de Variância e pelo MMQ um coeficiente de correlação ($r \geq 0.9990$) para todas as aminas biogénicas e poliaminas ($p < 0,001$) e o coeficiente de determinação (R^2) foi superior a 99,8% para todas as curvas padrões. Já Dadáková; Krízek; Pelikánová (2009), propôs um método para determinação de aminas biogênicas em alimentos usando Cromatografia Líquida de Ultra Pressão (UPLC), pré-derivatização com cloreto de dansila, em seu método as curvas de calibração mostraram boa linearidade ($r = 0,9994$-$1,0000$).

5.4.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para o LD foi efetuado análise de solução de amostra-branco fortificada com a menor concentração do padrão do analito (0,75 $\mu g\ mL^{-1}$). O ensaio foi efetuado em 6 replicatas independentes para esta concentração, calculou-se o desvio padrão para determinar o LD que foi multiplicado pelo fator $k = 3$, resultando em 0,03 $\mu g\ mL^{-1}$ e para determinar o limite de quantificação utilizou-se $k = 10$, resultando em 0,10 $\mu g\ mL^{-1}$ para o LQ. Latorre-Moratalla et al. (2009) obtiveram o ruído de linha de base utilizando uma solução de ácido perclórico 0,6 M como um branco. O LD obtidos foram menores ou iguais a 0,05 mg L^{-1} para octopamina, tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, agmatina, feniletilamina e espermidina. Já o LQ determinados foram de 0,1 mg L^{-1} para octopamina, tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, agmatina e feniletilamina. Para a determinação dos LD e LQ para cada amina, a análise foi realizada numa solução padrão a esses níveis de concentração.

Dadáková; Krízek; Pelikánová (2009) calcularam os limites de detecção e quantificação por meio de adição padrão na amostra, a fim de verificar a interferência da matriz. Os LD obtidos para triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina, espermina foram 0,078, 0,056, 0,056, 0,052, 0,050, 0,087, 0,032 e 0,098 $\mu g\ mL^{-1}$, respectivamente. E os LQ foram 0,26, 0,19, 0,17, 0,17, 0,29, 0,11, 0,32 $\mu g\ mL^{-1}$, respectivamente.

5.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade na amostra-branco fortificada em dois níveis de concentração (0,75 μg mL^{-1} e 15 μg mL^{-1}). O ensaio foi efetuado em 6 replicatas independentes para cada nível. Calculou-se a média, desvio padrão e desvio padrão de repetibilidade (RSDr) dos resultados obtidos no ensaio para cada nível de concentração estudada.

Os valores encontrados dos RSDr foram 1,215% para a concentração 0,75 μg mL^{-1} e 0,157% para a concentração de 15 μg mL^{-1} (Tabela 9), menores do que o critério de aceitação de 6% e 8% para a concentração do analito de 10 ppm e 1 ppm, respectivamente, conforme preconizado no Guidelines for single laboratory - Modificado de AOAC (2002), Quadro 1 do item 4.2.6.1.4.

Os limites de repetibilidade (*r*) foram 0,037 e 0,085 para as concentrações de 0,75 μg mL^{-1} e 15 μg mL^{-1}, respectivamente. Este valor capacita o analista a decidir se a diferença entre os resultados de análises de rotina, em duplicata, de uma amostra determinada sob condições de repetibilidade, é significante. Isto é, se a diferença entre as duplicatas em amostras de rotina for maior que *r*, os resultados apresentam diferença significativa e esses resultados devem ser descartados e a análise deverá ser refeita.

Latorre-Moratalla (2009) testou a precisão do método em dois níveis diferentes de concentração, 25 e 50 mg kg^{-1} no peixe. Para todas as aminas biogênicas, o desvio-padrão relativo (RSD) foi sempre inferior a 5%, indicando que o método pode ser realizado com um nível satisfatório de precisão. O desvio-padrão relativo da repetibilidade do método de Dadáková; Krízek; Pelikánová (2009) variou entre 1,02% e 2,14%.

5.4.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio do critério de recuperação do analito conforme a Quadro 1 do item 4.2.6.1.4.

A recuperação foi verificada na amostra-branco fortificada em dois níveis de concentração (0,75 μg mL^{-1} e 15 μg mL^{-1}). Foram escolhidas estas concentrações por serem o primeiro ponto da curva (limite de quantificação) e o ponto central, região da curva onde as concentrações das amostras serão avaliadas. Os ensaios

foram efetuados em 6 replicatas independentes para cada nível. Calculou-se a média, desvio padrão, desvio padrão de reprodutibilidade (RSD_R) para cada nível de concentração, Tabela 9.

Conclui-se que o desvio padrão relativo obtida para as concentrações estudadas estão de acordo com a faixa de aceitação para o nível 0,75 μg mL^{-1} (recuperação de 107%) e para 15 μg mL^{-1} (recuperação de 99%), conforme critérios de aceitação estabelecidos no Guidelines for single laboratory - Modificado de AOAC (2002) (Quadro 1), para a faixa de concentração estudada de 0,75 μg mL^{-1} e 15 μg mL^{-1}.

Latorre-Moratalla et al. (2009) obtiveram recuperações superiores a 93% para aminas em peixe. Eles aplicaram o teste de Cochran para verificar se a variância dos valores de recuperação não era dependente do teor de amina na amostra.

Tabela 9: Dados obtidos das recuperações e da precisão nas concentrações 0,75 μg mL^{-1} e 15 μg mL^{-1}.

Parâmetro	**Concentração do analito (μg mL^{-1})**	
	0,75	15,0
Média (μg mL^{-1})	0,8371	14,8839
Desvio-padrão (DP) (μg mL^{-1})	0,010	0,023
Desvio-padrão relativo (DPR%)	1,215	0,157
Variância	0,000	0,001
Recuperação (%)	107,00	98,99
Limite da repetibilidade (r)	0,0370	0,0850
n	6	6

5.5 CÁLCULO DE INCERTEZA DA MEDIÇÃO

Segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, a incerteza de medição é um dos requisitos exigidos para a acreditação de laboratórios de calibração e ensaios. Esse requisito demonstra a importância da incerteza de medição como critério para avaliar a qualidade do resultado de medição e garantir sua confiabilidade, rastreabilidade, aceitabilidade e compatibilidade a outros resultados de medição da mesma grandeza (MAGALHÃES, 2014).

A incerteza de medição é definida no Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012) como um “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando (grandeza que se pretende medir)”. A norma

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 preconiza que a incerteza de medição seja avaliada ou que pelo menos seus principais componentes sejam estimados (ABNT, 2005).

Para calcular a estimativa de incerteza da medida do método para a determinação de histamina em uma amostra de pescado *in natura* (sardinha) por CLUE-FL seguiu-se os procedimentos do EURACHEM/CITAC (2012), do ISO GUM - *International Standardization Organization-Guide to the expression of Uncertainly in Measurement* (JCGM, 2008) e Oliveira et al (2015), conforme as etapas abaixo:

5.5.1 Especificação do mensurando

A determinação da concentração da histamina em pescado foi realizada por meio da equação abaixo proveniente da eq. (5) da curva analítica.

Equação 5: $C_{his} = \frac{C_o \,.\mathrm{V_f}}{m_{am.}} \,.\,\mathrm{precisão}$

Onde: C_o = concentração obtida a partir da curva analítica (µg mL^{-1})

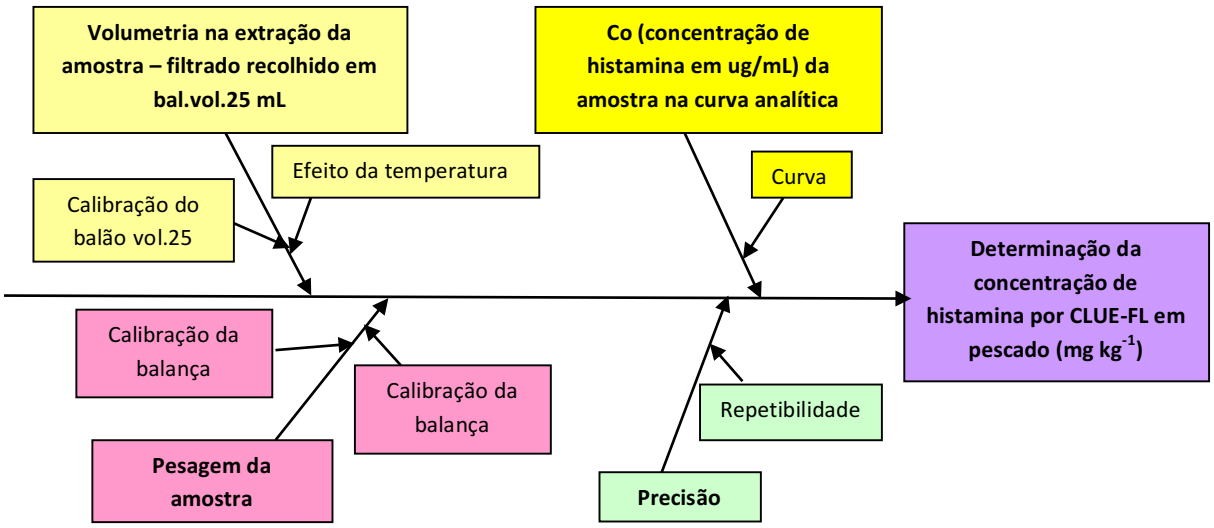
Vf = Volume final do filtrado recolhido no balão volumétrico na extração da histamina (mL)

$m_{am.}$ = massa da amostra de pescado (g)

5.5.2 Identificação das fontes de incerteza pelo diagrama de causa-e-efeito

O diagrama de causa e efeito (Figura 19) é uma forma de enumerar as fontes de incerteza, mostrando como elas se relacionam entre si e indicando sua influência na incerteza do resultado (EURACHEM, 2012).

Figura 19 – Diagrama de causa-e-efeito para determinação da concentração de histamina por CLUE-FL em pescado



5.5.3 Quantificação dos componentes de incerteza

Determinação das incertezas padrão associadas a cada componente (Figura 19):

Incerteza padrão associada à Massa da amostra ($m_{am.}$):

A massa da amostra foi obtida pesando-se por duas vezes consecutivas, a primeira do tubo da centrifuga vazio (tara) e a segunda do recipiente com a amostra de pescado, eq. (6).

Equação 6: $m_{am} = m_{am+tubo} - tara_{tubo} = 5\ g$

Cada uma das pesagens está sujeita à incerteza da calibração. Assim, a incerteza padrão associada à massa da amostra de pescado é obtida combinando-se duplamente a incerteza padrão associada à calibração da balança.

Incerteza padrão associada à calibração da balança:

O certificado de calibração da balança fornece a incerteza expandida ($U_{cal.balança}$) igual a 0,0002 g e fator de abrangência (k) de valor igual a 2, com nível de confiança de 95%. Assim, a incerteza padrão associada à calibração da balança pode ser calculada pela eq. (7):

Equação 7: $U_{cal.balança} = \frac{U_{cal.bal.}}{k}$

$$U_{cal.balança} = \frac{0{,}0002}{2{,}0} = 0{,}0001 \text{ g}$$

Incerteza padrão associada à massa do pescado (Incerteza padrão para a massa do pescado é obtida combinando as incertezas associadas à calibração da balança duplamente) pode ser calculada pela eq. (8):

Equação 8: $\mathrm{u}_{\mathrm{m_{am}}} = \sqrt{\mathrm{u}_{cal.bal.}{}^2 + \mathrm{u}_{cal.bal.}{}^2}$

$$\mathrm{u}_{\mathrm{m_{am}}} = \sqrt{\mathrm{u}_{cal.bal.}{}^2 + \mathrm{u}_{cal.bal.}{}^2} = \sqrt{(0{,}0001)^2 + (0{,}0001)^2} = 0{,}000141421\ g$$

Incerteza padrão associada ao volume final (balão volumétrico no qual foi recolhido o filtrado resultante da extração da histamina, de acordo com o procedimento do item 4.2.1).

Incerteza padrão associada à calibração do balão volumétrico pode ser calculado pela eq. (9), o certificado de calibração do balão indica incerteza expandida igual a 0,012 mL com fator k igual a 2 e nível de confiança de 95%.

Equação 9: $U_{cal.balão} = \frac{U_{cal.balão}}{k}$

$$U_{cal.balão} = \frac{0{,}012}{2} = 0{,}006\ mL$$

Incerteza associada à influência da temperatura no volume do balão.

A incerteza devido à influência da temperatura pode ser calculada a partir da estimativa da variação da temperatura e do coeficiente de expansão do volume. A expansão do volume do líquido é muito maior que a do vidro, assim para fins de cálculo considera-se apenas a expansão do volume do líquido no cálculo de incerteza.

O balão foi calibrado a uma temperatura de 20°C, segundo o certificado de calibração. Considerando que a temperatura em que o ensaio foi realizado igual a 25°C, coeficiente de expansão da água (γ) = 2,1 x 10^{-4} °C^{-1} e volume do balão volumétrico (V_o) utilizado para recolher o filtrado na extração igual a 25 mL. Sendo ΔT = temperatura em que o ensaio foi realizado – temperatura em que o balão foi calibrado.

Pela eq. (10) pode se calcular a variação do volume:

Equação 10: $\Delta V = V_o.\gamma.\ \Delta T$

Substituindo na equação 10, temos que $\Delta V = 25 \times 2{,}1 \times 10^{-4} \times 5$ é igual a 0,02625 mL. Assim, pode-se calcular a incerteza devido à influência da temperatura pela eq. (11):

Equação 11: $$\mathfrak{u}_{temperatura\ balão} = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}} = \frac{V_{o.}.\gamma.\Delta T}{\sqrt{3}}$$

$$\mathfrak{u}_{temperatura\ balão} = \frac{0{,}02625}{\sqrt{3}} = 0{,}015155445\ mL$$

Incerteza padrão associada ao volume (balão volumétrico no qual foi recolhido o filtrado) pode ser determinado pela eq. (12):

Equação 12: $$\mathfrak{u}_{volumetria\ balão} = \sqrt{\mathfrak{u}^2_{cal.balão} + \mathfrak{u}^2_{temp.balão}}$$

$$\mathfrak{u}_{volumetria\ balão} = \sqrt{(0{,}006)^2 + (0{,}015155445)^2} = 0{,}01629992\ mL$$

Incerteza associada à regressão da curva analítica com ajuste linear para a concentração de histamina em pescado por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção de fluorescência (*Co*).

O procedimento do método está descrito conforme o fluxograma apresentado no item 4.2.1. As soluções padrões foram obtidas a partir da diluição da solução estoque.

Todos os dados utilizados para o cálculo da incerteza associada à regressão da curva analítica foram os obtidos da linearidade (Tabela 10).

Tabela 10: Intensidade das soluções padrão

Concentração (µg mL^{-1})	Área		
2,5249	7230764	7178645	7150106
5,0097	13169715	13243722	13160089
10,0193	24365849	24739871	24574878
15,0290	36535160	36373334	36743915
20,0387	48427358	48699457	48519260
25,0484	61366574	61681361	61597498
30,0580	72533834	72787767	72699279

A curva analítica é representada pela equação: **y = 2390851,19x + 956854,88** conforme Figura 17.

Pelos dados da Tabela 14 pode-se calcular a incerteza associada à regressão da curva analítica segundo a eq. (13)

Equação 13: $u(C_o) = \frac{S}{B_1}\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_o - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$

Tabela 11: Dados para substituição na equação 13

Bo	Coeficiente linear (intercepto da curva de calibração)	956854,8800
B_1 = b	Coeficiente angular (inclinação da curva de calibração)	2390851,1900
resíduos $[A - (B_1 . c + B_o)]^2$	Soma dos resíduos (88079048028+....285218730,1)	3,37E+12
S = Sy	Desvio padrão residual	420873,777803
C médio ($\bar{c}$)	Valor médio dos diferentes padrões de calibração. Média das concentrações dos padrões (ug/mL) (para um número n de medições)	15,38971
Sxx	Soma quadrática (-7,900182+...19,413549)	1897,4603
<y>	Média das áreas da amostra	5894411,0000
n	número de medições para a calibração	21
p = N	número de medições para determinar Co	2
C_0	Conc.de histamina determinada na amostra (ug/mL)	2,065188

Para calcular $u(C_o)$, foi necessário calcular os valores de S e S_{xx} para aplicarmos na equação acima. Assim, na Tabela 13 são apresentados os resultados parciais para determinação de S (desvio padrão residual da reta).

Tabela 12: Resultados parciais para determinação de S

Concentração (c)	Área (A)	(B_1 . c + B_o)	[A -(B_1 . c + B_o)]	[A -(B_1 . c + B_o)]^2
2,5	7230764	6933982,855	296781,145	88079048028
2,5	7178645	6933982,855	244662,145	59859565196
2,5	7150106	6933982,855	216123,145	46709213805
5,0	13169715	12911110,83	258604,17	66876116741
5,0	13243722	12911110,83	332611,17	1,1063E+11
5,0	13160089	12911110,83	248978,17	61990129137
10,0	24365849	24865366,78	-499517,78	2,49518E+11
10,0	24739871	24865366,78	-125495,78	15749190798
10,0	24574878	24865366,78	-290488,78	84383731306
15,0	36535160	36819622,73	-284462,73	80919044759
15,0	36373334	36819622,73	-446288,73	1,99174E+11
15,0	36743915	36819622,73	-75707,73	5731660382
20,0	48427358	48773878,68	-346520,68	1,20077E+11
20,0	48699457	48773878,68	-74421,68	5538586454
20,0	48519260	48773878,68	-254618,68	64830672205
25,0	61366574	60728134,63	638439,37	4,07605E+11
25,0	61681361	60728134,63	953226,37	9,08641E+11
25,0	61597498	60728134,63	869363,37	7,55793E+11
30,0	72533834	72682390,58	-148556,58	22069057461
30,0	72787767	72682390,58	105376,42	11104189892
30,0	72699279	72682390,58	16888,42	285218730,1
			Soma	3,36556E+12

O *S* pode ser calculado de acordo com a eq. (14):

Equação 14: $$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n}[A_j-(B_1.c_j+B_o)]^2}{n-2}}$$

Onde:

A_j = j-ésima medida de resposta do i-ésimo padrão

Bo = coeficiente linear da reta

B_1 = Coeficiente angular da reta

p = número total de medições realizadas das soluções padrão de histamina para determinar a curva analítica

c_o = concentração do analito na amostra de pescado

$\overline{c}$ = concentração média das soluções padrão de histamina

c_j = concentração j-ésimo padrão de histamina

$$S = \sqrt{\frac{3{,}36556.10^{+12}}{21-2}} = 420873{,}778$$

Na Tabela 13 são apresentados os resultados para determinação de S_{xx}.

Tabela 13: Cálculos para a determinação de S_{xx}.

Concentração (c)	(c - $\bar{c}$)	(c - $\bar{c}$)^2
2,5	-12,9	166,4
2,5	-12,9	166,4
2,5	-12,9	166,4
5,0	-10,4	108,2
5,0	-10,4	108,2
5,0	-10,4	108,2
10,0	-5,4	29,2
10,0	-5,4	29,2
10,0	-5,4	29,2
15,0	-0,4	0,2
15,0	-0,4	0,2
15,0	-0,4	0,2
20,0	4,6	21,2
20,0	4,6	21,2
20,0	4,6	21,2
25,0	9,6	92,2
25,0	9,6	92,2
25,0	9,6	92,2
30,0	14,6	213,2
30,0	14,6	213,2
30,0	14,6	213,2
	Soma (S_{xx})	1891,1

De acordo com a Eq. (15), temos o valor de S_{xx}:

Equação 15: $S_{xx} = \sum_{j=1}^{n}(c_j - \bar{c})^2$

$$S_{xx} = 1891{,}1$$

Determinação da incerteza padrão associada à regressão da curva analítica com ajuste linear para a concentração de histamina em pescado por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção de fluorescência.

Substituindo os valores de S, B_1, p, n, c_o, c, S_{xx} na eq. (16), obtemos o valor de $u(c_o)$:

Equação 16: $u(C_o) = \frac{S}{B_1}\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_o - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$

$$u(C_o) = \frac{420873{,}7778}{2390851{,}19}\sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{21} + \frac{(2{,}065188 - 15{,}4)^2}{1891{,}11}} = 0{,}141009\ \mu g\ mL^{-1}$$

Precisão

Na validação do método, a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade. Foi obtida uma média de 14,8839 µg mL^{-1} de histamina em pescado, um desvio padrão de 0,023 µg mL^{-1} e um coeficiente de variação de 0,157% em 6 determinações independentes. Assim, a incerteza associada a precisão intermediária é dada por:

$$u(repe) = 0{,}00157$$

5.5.4 Contribuições percentuais das fontes de incertezas

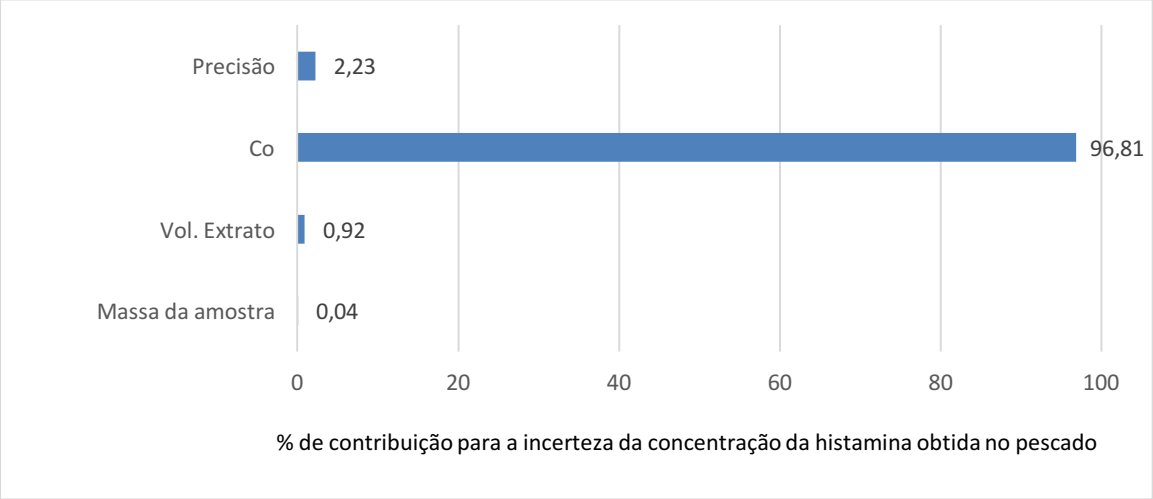
Os valores das fontes com suas respectivas unidades, incertezas padrão, incertezas padrão relativas e porcentagem de contribuição para a incerteza total são representados na Tabela 14.

As contribuições dos diferentes parâmetros são apresentadas na Figura 22. Observa-se que a maior contribuição para a incerteza total da concentração de histamina está associada à concentração obtida pela curva analítica, seguida da incerteza associada à precisão.

Tabela 14: Fontes de incerteza e respectivas porcentagens de contribuição para a incerteza total

Fontes de incerteza	Unidade	Valor (x)	Incerteza padrão (u_x)	Incerteza padrão relativa (u_{xi}/x_{xi})	% da Contribuição
Massa da amostra ($m_{am.}$)	g	5,1772	0,000141421	2,7316116E-05	$\frac{2{,}7316116E05}{0{,}070528326} x100 = 0{,}0387$
Volume do extrato ($V_{extr.}$)	mL	25	0,01629992	0,000651997	$\frac{0{,}000651997}{0{,}070528326} x100 = 0{,}9244$
Concentração obtida (Co)	ug mL^{-1}	2,065188	0,141009	0,068279013	$\frac{0{,}068279013}{0{,}070528326} x100 = 96{,}81$
Precisão (repetibilidade)	-	1	0,00157	0,00157	$\frac{0{,}00157}{0{,}070528326} x100 = 2{,}226$
			Soma	0,070528326	100,00

Figura 20 – Contribuição para incerteza da concentração de histamina obtida no pescado



5.5.5 Determinação da incerteza padrão combinada da concentração de histamina em pescado

Ao utilizar os valores apresentados na Tabela 18 (Fontes de incerteza e respectivas porcentagens de contribuição para a incerteza total), a concentração de histamina em pescado pode ser calculada pela eq. (4):

$$C_{his} = \frac{C_o \,.\, \mathrm{V_f}}{m_{am.}} \,.\, \text{precisão}$$

$$Chis = \frac{2{,}065188 \,.\, 25}{5{,}1772} \,.1 = 9{,}972514 \ \mu\mathrm{g\ g^{-1}}$$

A equação da incerteza padrão combinada para grandezas não correlacionadas foi simplicada utilizando a regra B do EURACHEM/CITAC, uma vez que o modelo matemático inclui apenas multiplicação ou divisão de grandezas. De acordo com essa regra, a incerteza padrão combinada da concentração de histamina em pescado pode ser dada pela eq. (17):

Equação 17: $$u_{C\,C_{his}} = C_{his}\sqrt{\left(\frac{u_{m_{am.}}}{m_{am.}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{extr.}}}{V_{extr.}}\right)^2 + \left(\frac{u_{c_o}}{c_o}\right)^2 + \left(\frac{u_{Prepe}}{Prepe}\right)^2}$$

$$u_{C\,C_{his}} = 9{,}972514.\sqrt{\left(\frac{0{,}000141421}{5{,}1772}\right)^2 + \left(\frac{0{,}01629992}{25}\right)^2 + \left(\frac{0{,}141009}{2{,}065188}\right)^2 + \left(\frac{0{,}00157}{1}\right)^2}$$

$$u_{C\,C_{his}} = 0{,}681124493\ \mu g\ g^{-1}$$

Para o cálculo dos graus de liberdade efetivos utilizou-se as diretrizes do ISO GUM adotando-se o valor de k que depende de número de graus de liberdade efetivos (ν_{eff}) para um dado nível de confiança, a fim de se evitar que a incerteza expandida seja subestimada.

Tem-se que:

Graus de liberdade para precisão: (n - 1) = (6 – 1) = 5

Graus de liberdade para a regressão (C_o) = (n – 2) = (21 – 2) = 19

Graus de liberdade para todas as outras fontes: infinito = ∞

O número de graus de liberdade efetivos é dado pela Eq. (18) de Welch-Satterthwaite:

Equação 18: $$\nu_{eff} = \frac{u_{C_{C_{his}}}{}^4}{\frac{(\mathrm{C}_{\mathrm{repe}}.u_{repe})^4}{n-1} + \frac{(c_o.u_{c_o})^4}{n-2} + \frac{(u_{m_{am.}}.u_{m_{am.}})^4}{\infty} + \frac{(u_{V_{extr.}}.u_{V_{extr.}})^4}{\infty}}$$

Foi necessário calcular o coeficiente de sensibilidade para a precisão e c_o, para as outras fontes não há necessidade, dado que as outras parcelas serão divididas por infinito, resultando em um número que tende a zero.

Calculou-se a derivada parcial da concentração de histamina em função da precisão para obter o coeficiente de sensibilidade para a precisão. O resultado da derivada parcial da precisão é o próprio valor do mensurando, que é a concentração de histamina no pescado.

A derivada parcial da concentração de histamina em função de c_o é:

$$C_{Co} = \frac{\partial C_{Co}}{\partial_{Co}} = \frac{1\,.Vf}{m_{am.}}\,.\mathrm{precisão}$$

$$C_{Co} = \frac{1\,.25}{5{,}1772}\,.1 = 4{,}828865024$$

Logo, substituindo os valores na eq. (18), obtemos o número de graus de liberdade efetivos:

$$\nu_{eff} = \frac{u_{C_{C_{his}}}{}^4}{\frac{(C_{his}.u_{repe})^4}{n-1} + \frac{(C_{Co}.u_{c_o})^4}{n-2} + \frac{(u_{m_{am.}}.u_{m_{am.}})^4}{\infty} + \frac{(u_{m_{am.}}.u_{m_{am.}})^4}{\infty}}$$

$$\nu_{eff} = \frac{0{,}681124493^4}{\frac{(9{,}972514\ .0{,}00157)^4}{5} + \frac{(4{,}828865024.0{,}141009\ )^4}{19} + \frac{(5{,}1772\ .0{,}000141421.)^4}{\infty} + \frac{(25\ .0{,}01629924)^4}{\infty}}$$

$$\nu_{eff} = 19{,}02354903 = 19$$

Para os graus de liberdade efetivos calculados iguais a 19, o valor tabelado do fator de abrangência (k) é igual a 2,14, com um nível de confiança de 95,45%.

5.5.6 Determinação da incerteza expandida

A incerteza expandida associada à concentração de histamina no pescado é obtida multiplicando-se a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência (k) igual a 2,14, a um nível de confiança de 95,45%.

Equação 19: $U_{C_{his}} = u_{c_{his}} \,.\, k$

$$U_{C_{his}} = u_{c_{his}} \,.\, k = \; 0{,}681124493 . 2{,}14 = 1{,}457606415 \text{ µg g}^{-1}$$

Assim, a expressão do resultado pode ser dada pela concentração de histamina no pescado que é de 9,97 mg kg^{-1}, a incerteza expandida de 1,46 mg kg^{-1}, com um fator de abrangência (k) igual a 2,14, e nível de confiança de 95,45%.

A expressão do resultado pode ser apresentada como:

$$Chis = 9{,}97 \; \pm 1{,}46 \text{ mg kg}^{-1}, \text{k} = 2{,}14; \text{p} = 95\%$$

A incerteza de medição neste ensaio garante uma maior confiabilidade dos resultados analíticos para tomadas de decisões importantes em Vigilância Sanitária e Saúde Pública.

5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NA QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADOS

Para a quantificação de histamina nos pescados *in natura* e em conservas foi aplicada a metodologia validada.

As amostras foram extraídas seguindo-se o item 4.2.1 e quantificadas segundo as condições cromatográficas descritas no item 4.2.5.

Das doze amostras de atum em conserva adquiridas de mercados da cidade de São Paulo e analisadas em duplicata (Tabela 15), somente duas apresentaram teor de histamina de 1,30 e 0,13 mg kg^{-1}, marcas A e B, respectivamente, sendo uma amostra de atum em conserva produzida no Brasil e a outra importada do Equador. Já das 7 amostras de sardinhas em conserva e analisadas em duplicata (Tabela 16), quatro (A, D, F e G) tiveram teores de 2,49, 68,96, 11,66 e 1710,92 mg

kg^{-1}, respectivamente. Apesar do teor de histamina na amostra D estar dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira, deve-se ter cuidado com essa concentração de histamina encontrada, porque o FDA (FDA, 2011) considera o teor de 50 ppm de histamina como um nível de critico, entretanto, ressalta que a variabilidade de teores de histamina entre peixes e num único peixe pode ser grande, se 50 mg kg^{-1} é encontrado em uma seção de um peixe ou do lote, existe a possibilidade de que outras seções possam ter valores superiores a 500 mg kg^{-1}.

Tabela 15: Resultado do teor de histamina no atum em conserva

Marca	**Atum em conserva**	
	Concentração de Histamina (mg kg^{-1})	Desvio-padrão
A	1,30	0,03
B	0,13	0,03
C	nd	-
D	nd	-
E	nd	-
F	nd	-
G	nd	-
H	nd	-
I	nd	-
J	nd	-
K	nd	-
L	nd	-

nd – não detectado (LD = 0,03 μg mL^{-1})

Tabela 16: Teor de histamina nas sardinha em conserva

Marca	**Sardinha em conserva**	
	Concentração de Histamina (mg kg^{-1})	Desvio-padrão
A	2,49	0,11
B	nd	-
C	nd	-
D	68,96	0,77
E	nd	-
F	11,66	0,03
G	1.710,92	5,88

nd – não detectado (LD = 0,03 μg mL^{-1})

A Figura 21B mostra o cromatograma da amostra de sardinha (G) em conserva contendo histamina. O teor de histamina encontrado na amostra G (Figura 21B) está muito acima, cerca de 17 vezes do limite máximo estabelecido pelo

MAPA, de 100 mg kg^{-1}, para sardinha em conserva (BRASIL, 2011). Nessa amostra, além da histamina (HIS) verificou-se a presença de triptamina (TRP) e espermidina (EPD) (Figura 22). Essa quantidade de histamina encontrada pode sugerir a ocorrência de uma intoxicação, representando risco à saúde humana. Oliveira et al. (2004) analisou histamina em amostras de atum e sardinha enlatados em diferentes líquidos de cobertura de marcas de fabricação nacional, adquiridos no comércio varejista de Fortaleza, Ceará, Brasil. A presença de histamina foi verificada pelos autores em todas as amostras de atum enlatado e seus teores variaram de 1,57 a 1023,16 mg kg^{-1}. Somente no atum ralado em óleo comestível de uma das marcas apresentou baixa concentração de histamina (1,57 mg kg^{-1}). Em todas as amostras de sardinha enlatada analisadas foram detectadas histamina com teores variando de 3,35 a 346,44 mg kg^{-1}.

Figura 21 – Cromatogramas do padrão de histamina (A) e da amostra de sardinha em conserva contendo histamina (B).

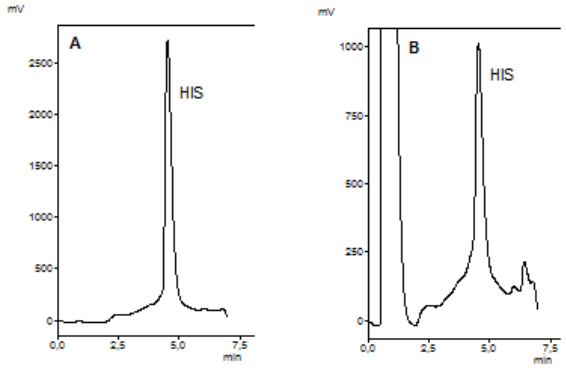
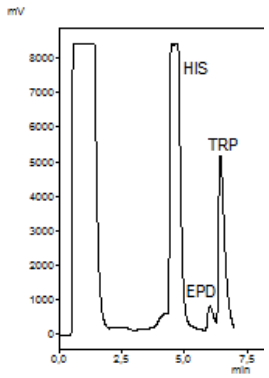


Figura 22 – Presença de triptamina e espermidina na amostra de sardinha em conserva.



No que diz respeito às sete amostras de atum *in natura* adquiridas em feiras livres de alguns bairros de São Paulo (Tabela 17), verificou-se que das sete amostras analisadas em duplicata somente uma apresentou teor de 1,07 mg kg^{-1} (amostra G), demonstrando a manutenção de condições de refrigeração e higiênico-sanitárias adequadas do atum, por ocasião, transporte e comercialização em feiras livres. Enquanto que, das 12 amostras de sardinha *in natura* analisadas em duplicata (Tabela 18), igualmente adquiridas em feiras livres de alguns bairros de São Paulo. 05 amostras apresentavam teores de histamina de 26,81, 0,35, 37,25, 9,97 e 0,94 mg kg^{-1}, amostras A, D, E, I e L, respectivamente. Todas as amostras estavam de acordo com o nível de tolerância para histamina em pescado *in natura*, 100 mg kg^{-1} (BRASIL, 1997). Olivo (2013) analisou amostras de atum conservadas em salmoura e em gelo de embarcações, essas amostras de atum fresco foram recém-capturadas e adquiridas de empresas pesqueiras de Itajaí-SC. Nas três amostras analisadas que foram conservadas em salmoura não foram encontrados teores de histamina, somente a triptamina. Nas amostras conservadas em gelo foram detectados níveis de triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina, sendo que o teor de histamina nas três amostras variou de não detectado (amostra 1), 38,42 mg kg^{-1} (amostra 2) e 13,99 mg kg^{-1} (amostra 3). Nenhuma amostra apresentou teor de histamina superior ao estabelecido pela legislação brasileira. Moreno, Torres e Moita (2003) avaliaram os níveis de histamina de 40 amostras de pescado fresco (sardinha verdadeira) comercializada no CEAGESP (Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo). A média das concentrações de histamina encontrada nas amostras foi de 4,14 ± 1,92 mg kg^{-1} de histamina. Os autores concluíram que, possivelmente os valores encontrados nesse trabalho, estavam dentro do limite estabelecido por lei, em parte, às boas práticas de manipulação (transporte, conservação e comercialização) naquele entreposto.

Tabela 17: Teor de histamina em atum *in natura*

Marca	**Atum in natura**	
	Concentração de Histamina (mg kg^{-1})	Desvio-padrão
A	nd	-
B	nd	-
C	nd	-
D	nd	-
E	nd	-
F	nd	-
G	1,07	0,03

nd – não detectado (LD = 0,03 μg mL^{-1})

Tabela 18: Teor de histamina em sardinha *in natura*

Marca	**Sardinha in natura**	
	Concentração de Histamina (mg kg^{-1})	Desvio-padrão
A	26,81	0,04
B	nd	-
C	nd	-
D	0,35	0,01
E	37,25	0,06
F	nd	-
G	nd	-
H	nd	-
I	9,97	0,06
J	nd	-
K	nd	-
L	0,94	0,03

nd – não detectado (LD = 0,03 μg mL^{-1})

6 CONCLUSÕES

Os parâmetros de desempenho do método avaliados na validação demonstraram que o método desenvolvido é bastante eficiente com taxa de recuperação superior a 98%, boa linearidade, exatidão, precisão, seletividade, robustez e com limites de detecção e quantificação semelhantes aos relatados na literatura, indicando assim que o método proposto é adequado para as análises de controle de qualidade de pescado. Além disso, o acoplamento do sistema CLUE com a reação de pós-derivatização realizado neste trabalho trará grandes avanços na determinação das aminas biogênicas por possibilitar corridas cromatográficas mais rápidas, economia de reagentes e solventes, em comparação com o método tradicional. Aplicando-se o método para a quantificação de histamina em pescado, verificou-se que os teores de histamina em conservas de atum encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira e sugere-se a continuidade do monitoramento nas sardinhas *in natura* e em conservas.

REFERÊNCIAS

ABABOUCH, L. et al. Quantitative changes in bacteria amino-acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28 ºC) and in ice. **Int. J. Food Sci. Technol.**, London, v. 3, n. 26, p. 297-306, 1991.

ABABOUCH, L.; EMBORG, J.; & DALGAARD, P. Histamine and other biogenic amines. In: RYDER, J.; IDDYA, K.; ABABOUCH, L. (Eds.). **Assessment and management of seafood safety and quality - Current practices and emerging issues**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper; No. 574), 2014. p. 78-86.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**, 2005.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. **AOAC Int.**, Appendix D, 12 p, 2002.

ARNOLD, H.S.; BROWN, D.W. Histamine toxicity from fish products. **Adv. Food Res.**, v. 24, p. 113-154, 1978.

ASHIE, I.N.A.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, Boca Raton, v. 36, n. 182, p. 87-121, 1996.

ATUNA. Hagoromo Recalls 6.72 Million Tuna Cans On Histamine. Disponível em: <http://www.atuna.com/NewsArchive/ViewArticle.asp?ID=13533>. Acesso em: 05 dez. 2013.

BALDINI, V.L.S. Aminas biogênicas e a deterioração do pescado. **Bol. Inst.Tecnol. Alimentos**, Campinas, v. 19, p. 389-402, 1982.

BARDÓCZ, S. et al. Polyamines in food: implications for growth and health. **J. Nut. Biochem.**, v. 4, p. 66-71, 1993.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 341-346, 1995.

BAUZA, T. et al. Les amines biogènes du vin, Métabolisme et toxicité. **Bull. L'O.I.V.**, v. 767-768, p. 43-67, 1995.

BECKER, K. et al. Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. **JAMA**, v. 285, n. 10, p. 1327-1330, 2001.

BERAQUET, N.J.; LINDO, M.M.K. Transformações bioquímicas "post mortem" em pescado. **Bol. ITAL**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 169-192, 1985.

BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER, K. et al. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. **Int. J. Food**

Microbiology, v. 13, n. 3, p. 161-167, 2010.

BOMKE, S. et al. Determination of biogenic amines in food samples using derivatization followed by liquid chromatography/mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**., v. 393, n. 1, p. 247-256, 2009.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 53, p. 33-41, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun 2003, Seção 1, p.56.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Portaria n. 185, de 13 de maio de 1997. **Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado)**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 20 mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa nº 22, de 11 de julho de 2011. **Aprova o Regulamento Técnico que fixa a identidade e as características mínimas de qualidade que deve apresentar o produto conservas de sardinhas**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000022&seqAto=000&valorAno=2011&orgao=SDA/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: 14 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa nº 22, de 11 de julho de 2011. **Aprova o Regulamento Técnico de identidade e qualidade para conservas de atuns e de bonitos**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000046&seqAto=000&valorAno=2011&orgao=SDA/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: 14 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasilia: MAPA/ACS, 2011.227 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual_Garantia_Analitica.pdf>. Acesso em: 10 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Pesca e Agricultura. MPA. **Boletim estatístico da pesca e aqüicultura 2011**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2016.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC. Disponível em: <http;//www.mdic.gov.br>. Acesso em: 11 jun. 2013.

BRILLANTES, S.; SAMOSORN, W. Determination of histamine in fish sauce from Thailand using a solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Fisheries Science**, v. 67, n. 6, p. 1163–1168, 2001.

BRINK, B. et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 11, p. 73-84, 1990.

BULUSHI, I.A. et al. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation – A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**,, v. 49, n. 4, p. 369-377, 2009.

BUSTO, O. et al. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. **Chromatogr.**, v. 38, n. 9/10, p. 571-578, 1994.

CERGOLA, M. C.; NETO, J. D. **Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Sardinha-verdadeira do Brasil**. Brasília: IBAMA, 2011. 180 p.

CHAKRABARTI, R.H. A method to preserve fish muscle pieces and mince from sciaenids. **Fisheries Technology**, Kakinada, v. 1, n. 25, p. 58-60, 1988.

CHEN, K.T.; MALISON, M.D. Outbreak of scombroid fish poisoning, Taiwan. **Am. J. Public. Health.** v. 77, n. 10, p. 1335-1336, 1987.

CHEN, H-C. et al. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. **Food Chem**., v. 106, p. 612-618, 2008.

CHEN, H-C. et al. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (Tetrapturus angustirostris) implicated in a food-borne poisoning. **Food Control**, v. 21, p. 13-18, 2010.

CHIACCHIERINI, E.; RESTUCCIA, D.; VINCI, D. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. **Talanta**, v. 69, n. 3, p. 548-55, 2006.

CHOTIMARKORN, C. Quality changes of anchovy (Stolephorus heterolobus) under refrigerated storage of different practical industrial methods in Thailand. **J. Food Sci. Technol**., doi: 10.1007/s13197-011-0505-y. published online: 27 August 2011.

CHUST, R. B. Introdução Cromatografia de Líquidos (HPLC). **Bol SPQ**, n. 39, p.43-53, 1990.

CINQUINA, A.L. et al. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **J. Chromatogr. A**, v. 1032, p. 73-77, 2004.

CODEX ALIMENTARIUS. **Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Fish and Fishery Products.** Codex Alimentarius Commission, Indonesia, 2012. CX/FFP12/32/2-Add.1.Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccffp/ccffp32/fp32_02_add1e.pdf>. Acesso em: 08 fev. 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. **Code of practice for fish and fishery products**. Roma: FAO/WHO, 2012. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/Practice_code_fish/CCFFP_2012_EN.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2015.

CONCA, R. et al. Ion chromatographic separation of polyamines: putrescine, spermidine and spermine. **Anal. Chim. Acta**, v. 439, p. 107-114, 2001.

CRUICKSHANK, J.; WILLIAMS, H. Scombrotoxic fish poisoning. **British Medical J**., v. 2, p. 739-740, 1978.

DADÁKOVÁ, E.; KRÍZEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in food using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chem**., v. 116, p. 365-370, 2009.

DALLAGNOLO, R.; SCHWINGEL, P. R.; PEREZ, J. A. A. Estimativas de produção anual de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) em Santa Catarina: um modelo de projeção de capturas a partir dos padrões mensais de desembarque no estado. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol**., v. 14, n. 2, p. 95-104, 2010.

DALGAARD, P.; EMBORG, J. Histamine and biogenic amines: formation and importance in seafood. In: BORRENSEN, T. (Ed.). **Improving seafood products for the consumer**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2008. p. 292-324.

DAWOOD, A.A. et al. The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored rainbow trout (*Salmo irideus*). **Food Chem.**, v. 27, p. 33-45, 1988.

DONHAUSER, S.; WAGNER, D.; GEIGER, E. Biogenic amines: significance, occurrence and assessment. **Brawelt. Int.**, v. 11, p. 100-107, 1993.

DUFLOS, G. et al. Relevance of matrix effect in the determination of biogenic amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). **J. AOAC Int.**, v. 82, n. 5, p. 1097-1101, 1999.

EFSA (European Food Safety Authority**).** Manual for reporting on zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the framework of directive 2003/99/EC and of some other pathogenic microbiological agents for information derived from the reporting year 2009. **EFSA J**., v. 8. n. 4, p.1579 [pp. 97], 2010. Disponível em: <www.efsa.europa.eu/em/efsajournal/ doc/1579.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2013.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). **EFSA J**., v. 9. n. 10, p. 2393 [pp. 93], 2011.

EMBORG, J.; DALGAARD, P.; AHRENS, P. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine producing bacterium isolated from various seafoods. **Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiol**., v, 56, p. 2473-2479, 2006.

EMBORG, J.; DALGAARD, P. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii* – development and evaluation of predictive models. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 128, p. 234-243, 2008.

ESTEVES, E., ANÍBAL, J. **Quality Index Method (QIM) utilização da análise sensorial para determinação da qualidade do pescado**. In: 13º CONGRESSO DO ALVARVE, 2007, p. 365-373 **Anais**. Lagos, Portugal. Seafoodplus traceability. project 6.3 – valid.

ETIENNE, M. **Methods for chemical quality assessment-Methodology for histamine and biogenic amines analysis**. Seafoodplus traceability. Ifremer: France, 2006, p. 2-20. Disponível em: http://archimer.ifremer.fr/doc/2006/rapport-6484.pdf. Acesso em: 20/03/2013.

EURACHEM/CITAC Guide CG4. **Quantifying Uncertainly in Analytical Measurement. QUAM**. Teddington: LGC, 3rd ed. S. L. R. Ellison, A. Williams (Editors). 133p. 2012. Disponível em: <http://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2015.

EVANGELISTA, W. P. **Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009**. Belo Horizonte: Faculdade Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2010. 68 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

FAO (Food and Agriculture Organization). **World review of fisheries and aquaculture – Part 1**. **2012**. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e01.pdf>. Acesso em 04 mar. 2015.

FAO (Food and Agriculture Organization). **Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products**. FAO Headquarters, Rome, 2012. Meeting Report. Disponível em: <www.fao.org/fileadmin/.../1_FAO-WHO_Expert_Meeting_Histamine.pdf. Acesso em 15/03/2013>. Acesso em 04 mar. 2013.

FDA (USA Food and Drug Administration). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. 4 ed. cap. 7. abr. 2011. Disponível em: <www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM251970.pdf>. Acesso em 05 mar. 2016.

FDA (USA Food and Drug Administration). **Methods, method verification and validation.** Revised: 29/01/14. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM092147.pdf>. Acesso em 10 jan. 2013.

FDA (USA Food and Drug Administration). Reviewer **Guidance. Validation of Chromatographic Methods.** nov. 1994. Acessível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em 10 jan. 2013.

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

FIECHTER, G.; SIVEC, G.; MAYER, H.K. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenicamines in ripened acid-curd cheeses. **J. Chromatogr. B**, v. 927, p. 191-200, 2013.

FLETCHER, G.C.; SUMMERS, G.; VEGHEL, P.W.C.V. Levels of histamine and histamine-producing bacteria in smoked fish from New Zealand markets. **J. Food Protection**, v. 61, n. 8, p. 1064-1070, 1998.

FRANK, H. A., YOSHINAGA, D. H., NIP, W-K. Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. **Marine Fisheries Review**, v. 43, n. 10, p. 9-14, 1981.

(GALDÁNEZ, E.V.C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133f. Dissertação (Mestrado) – Escolha de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GALLARDO, J.M.; SOTELO, C.G.; PEREZ MARTIN, R.I. Determination of histamine by capillary zone electrophoresis using a low-pH phosphate buffer : application in the analysis of fish and marine products. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A**, v. 204, n. 5, p. 336-340, 1997.

GESSNER, B.D. Scombrotoxicosis-like illness following the ingestion of smoked salmon that demonstrated low histamine levels and high toxicity on mouse biossay. **Clin. Inf. Diseases**, v. 23, p. 1316-1318, 1996.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **J. Food Protect.**, v. 60, p. 732-738, 1997.

GLORIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A. Metodologia para a determinação de aminas biogênicas em bebidas. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 9, 1995, João Pessoa. **Livro de Resumos**. João Pessoa: UFP, 1995, p. 137.

GLORIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A.; CRAVEN, C.; HILDERBRAND Jr., K.S. Histamine and other biogenic amines in albacore tuna. **J. Aquatic Food Prod. Technol.**, v. 8, n. 4, p. 55-69, 1999.

GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H Hui; LL Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v. 4, p. 1-38, 2005.

GOUVEIA, N.N.F. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de aminas biogénicas em tunídeos.** Funchal: Universidade da Madeira, 2009. 80 p. (Dissertação, mestrado em Bioquímica Aplicada).

HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HALL, M. Something fishy: six patients with an unusual cause of food poisoning. **Emerg. Med**., v. 15, n. 3, p. 293-295, 2003.

HARDY, R.; SMITH, J.G.M. The storage of mackerel (Scomber scombrus). Development of histamine and rancidity. **J. Science of Food and Agriculture**, v. 27, n. 7, p. 595-599, 1976.

HONGCHUMPON, N. et al. Scombrotoxin food poisoning outbreak among frozen seafood factory workers Samut Prakan province, Thailand, july 2007. **Outbreak, Surveillance and Investigation Reports**, v. 2, n. 1, p. 5-8, 2009.

HUI, J.Y.; TAYLOR, S.L. Decomposition in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 66, p. 853-857, 1983.

HUNGERFORD, J.M. Scombroid poisoning: A review. **Toxicon.**, v. 56, p. 231-243, 2010.
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 Chem**., v. 82, p. 329–334, 2003.

IBE, A. et al. Quantitative determination of amines by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal Chem**., v. 74, n. 4, p. 695-698, 1991.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). **Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1).** Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em 17/03/2011>. Acesso em: 03 mar. 2013.

IIJIMA,S. et al. Optimization of an online post-column derivatization system for Ultra Highe-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) and its application to analysis of biogenic amines. **Analytical Sciences**, vol. 29, p. 539-545, 2013.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, Rev. 03 – fev/2010, p. 1-20. Disponível em: <htt://www.inmetro.gov.br. Acesso em 17/03/2011>. Acesso em: 03 mar. 2013.

IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization. **J AOAC Int.**, v. 76, p. 1027-1032, 1993.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Editorial: Acríbia, 5a. Edição, Espanha, Zaragoza, 2009.

JAYARAJAH, C.N. et al. Analysis of neuroactive amines in fermented beverages using a portable microchip capillary electrophoresis system. **Anal Chem**., v. 79, n. 21, p. 8162-8169, 2007.

JCGM. Joint Committee for Guides in Metrology, Working Group 1. **Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement**. 1st ed. Sèvres: BIPM. 2008.

JEEVANANDAM, M. et al. Nutrition efficacy of a spermidine supplemented diet. **Nutrition**, v. 13, p. 788-794, 1997.

JIA, S. et al. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatography A**, v. 1218, n. 51, p. 9174– 9182, 2011.

KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chem.**, v. 90, p. 219-230,

2005.

KALAC, P.; ŠVECOVÁ, S.; PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chem**., v. 77, p. 349-351, 2002.

KANG, L. et al. Determination of Trace Biogenic Amines in Foods Samples with Fluorescence Detection and MS Identification. **Chromatographia**, v. 73, p. 43–50, 2011.

KEETON JR.; BALDWIN, J.L.; SINGER, A.M. Pharmacologic Food Reactions. In: **Food Allergy: adverse reactions to foods and food additives**. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2008. p. 431-442.

KIM, S.H. et al. Histamine accumulation in seafoods and its control to prevent outbreaks of Scombroid poisoning. **J. Aquatic Food Prod. Technol.** v. 13, p. 81-100, 2004.

KINSELLA, J.E. Fish and seafoods: nutritional implications and quality issues. **Food Technology**, p. 143-150,1988.

KIRSCHBAUM, J.; LUCKAS, B.; BEINERT, W.D. HPLC analysis of biogenic amines and amino acids in food after automatic pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Am. Lab.**, p. 28C-28H, 1994.

KVASNICKA, F.; VOLDRICH, M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. **J. Chromatogr. A**., v. 1103, p. 145-149, 2006.

LANDETE, J.M.; FERRER, S.; PARDO, I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. **Food Control**, v. 18, n. 12, p. 1569-1574, 2007.

LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMANN, C. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. **J. Chromatogr. B**, v. 779, p. 229-239, 2002.

LAPA-GUIMARÃES, J. **Aminas biogenicas, aminas volateis, triptofano livre e ureia como indices quimicos de qualidade e frescor do pescado**. 2005. 115f**.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

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

LA TORRE, G.L. et al. High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk. **J. Chromatography A**, v. 1217, p. 5215–5224, 2010.

LATORRE-MORATALLA, M.L. et al. Validation of an ultra high pressure liquid

chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 7715-7720, 2009.

LAVIZZARI, T. et al. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. J. **Chromatogr. A**, v. 1129, p. 67-72, 2006.

LAVON, O.; LURIE, Y.; BENTUR, Y. Scombroid fish poisoning in Israel, 2005-2007. **Toxicol.**, v. 10, p. 789-792, 2008.

LEHANE, H.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **Int. J. Food Microbiology**. v. 58 , n. 1-2, p. 1-37, 2000.

LEITÃO, M.F.F. Deterioração microbiana do pescado e sua importância em saúde pública. **Hig. Alim.**, São Paulo, v. 3, n. 3/4, p. 143-152, 1984.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. In: **Controle de Qualidade do Pescado**. Santos: Leopoldianum, 1988. p. 40-58.

LERKE, P.A. et al. Scombroid poisoning. Report of an outbreak**. West J. Med**., v. 129, n. 5, p. 381-386, 1978.
LIEBER, E.R., TAYLOR, S.L. TLC screening methods for histamine in tuna fish. **J. Chromatography**, v. 153, p. 143-152, 1978.

LIMA, A.S. **Metodologia para a determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência – par iônico**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 1999. 77 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 33, p. 70-79, 1999.

LOZANOV, V.; PETROV, S.; MITEV, V. Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide. **J. Chromatogr**. A, v.1025, n. 2, p. 201–208, 2004.

MAGALHÃES, W.F. Comentários sobre o trabalho 'estimativa da incerteza de medição: estudo de caso no ensaio de migração de ε-caprolactama com determinação por CG-DIC'. **Quim. Nova***,* v. 37, n. 10, S1-8, 2014.

MAIJALA, R. et al. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. **J. Food Protect.**, v. 56, p.125-129, 1993.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, 214-222, 2009.

MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. **J. AOAC Int.**, v. 79, n. 1, p. 43-49, 1996.

MARINO, M. et al. The capacity of *enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 31, p. 169-173, 2000.

MAYER, H.K.; FIECHTER, G.; FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 3251-3257, 2010.

MAYR, C.M.; SCHIEBERLE, P. Development of stable isotope dilution assays for the simultaneous quantitation of biogenic amines and polyamines in foods by LC-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 3026−3032, 2012.

MERCKMILLIPORE. Ficha de segurança de produtos químicos (FISPQ) de acordo com a NBR 14725-4: 2009. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/brazil/chemicals/acido-perclorico-7072%25/MDA_CHEM100519/p_A8eb.s1L_mAAAAEWs.EfVhTl;sid=tuKhUp2syKujUsxR087MBTVsMWGzovcLjsy_BC4BlJYfMRMimgLCJuSobks77bVNpGxTp51S9qIVRRlFGYUuTLmlxa4FlF8hXgZcyW15-ywDo2wtTsv3LFM?attachments=MSDS>. Acesso em 25 jul. 2013.

MERSON, M.H. et al. Scombroid Fish Poisoning: Outbreak Traced to Commercially Canned Tuna Fish. **JAMA**, v. 228, n. 10, p. 1268-1269, 1974.

MIETZ, J.L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 42, p. 155-158, 1977.

MIETZ, L.J.; KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. **J. AOAC**, v. 61, n. 1, p. 139-145, 1978.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin. Nut.**, v.24, p.184-197, 2005.

MORENO, R.B.; TORRES, E.F.S.; MOITA, J.M. Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo. REVNET DTA, v. 3, p. 151-159, 2003. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp03_vol3n5.pdf. Acesso em: 16 abr 2016.

MORET, S.; CONTE, L.S. High performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods: an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **J. Chromatogr. A**, v. 729, p. 363-369, 1996.

MOURA FILHO, L.G.M. et al. Enumeração e pesquisa de *Vibrio spp*. e coliformes totais e termotolerantes em sashimis de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco**. Acta Sci. Technol.,** v. 29, n. 1, p. 85-90, 2007.

NAILA, A. et al. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. **J. Food Science**, v. 75, n. 7, p. R139-R150, 2010.

NATA (National Association of Testing Authorities). Guidelines for the validation and verification of quantitative test methods. Technical Note 17, p. 1-32, june 2012.

NETO, A.J.S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 71-81, 2010.

NUNES, A.M.N. Qualidade dos pescados – parte II. **Hig. Alim.**, São Paulo, v. 8, n. 32, p. 5-9, 1994.

NUNES, M.L.; BATISTA, I.; CARDOSO, C. Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. **Publicações avulsas do IPIMAR, n. 15, p. 1-50, 2007.** Disponível em http://www.inrb.pt/gca/?id=482. Acesso em 21/02/2011.

OGURI, S.; OKUYA, Y.; YANASE, Y.; SUZUKI, S. Post-column derivatization capillary electrochromatography for detection of biogenic amines in tuna-meat. **J. Chromatogr. A**, v. 1202, p. 96-101, 2008.

OLIVEIRA, C.C. et al**. Incerteza de medição em ensaios físico-químicos:** uma abordagem prática. São Paulo: SES/SP, 2015.

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

OLIVO, G**. Validação e estimativa de incerteza de medição de um método para determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficência em matriz de atum (*Thunnus* spp)**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

ÖNAL, A. A review: current analytical method for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chem.**, v. 103, p. 1475-1486, 2007.

ÖNAL A.; TEKKELI, S.E.K.; ÖNAL, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chem**., v. 138, n. 1, p. 509–515, 2013.

OSBORNE, C.M.; BREMER, P.J. Application of the bigelow (z-value) model and histamine detection to determine the time and temperature required to eliminate Morganella morganii from seafood. **J. Food Protection**. v. 63, n. p. 277-280, 2000.

ÖZOGUL, F.; ÖZOGUL, Y. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (Sardina pilchardus) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. **Food Chem**., v. 99, n. 3, p. 574-578, 2006.

PARK, J.S. et al. Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1219-1226, 2010.

PEÑA-GALLEGO, A. et al. High-performance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. **Food Reviews Int**., v. 28, p. 71–96, 2012.

PEREIRA, V. et al. Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthaladeyde derivatization procedure. **J. Chromatogr. A**, v. 1189, p. 435-443, 2008.

PRALONG, P. et al. Accident anaphylactique séverè mais non allergique après

consommation de Poisson. Revue française d'allergologie, v. 54,n. 1, p. 27-29, 2014.

PREDY, G.; HONISH, L.; HOHN, W.; JONES, S. Was it something she ate? Case report and discussion of scombroid poisoning. **CMAJ**., v. 168, n. 5, p. 587-588, 2003.

PRESTER, L. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. **Food Additives and Contaminants** v. 28, n. 11, p. 1547–1560, 2011.

PRICE, R.J.; MELVIN, E.F.;BELL, J.W. Postmortem changes in chilled round, bled and dressed albacore. J. Food Sci, v. 56, p. 318-321, 1991.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. I. A.; LABA, R. F. **Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica**. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas Farro, 1992.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espirito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SAGRATINI, G. et al. Simultaneous determination of eight underivatised biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chem**., v. 132, n. 1, p. 537-543, 2012.

SÁNCHEZ-CASCADO, S.P. Estudio de alternativas para La evaluación de La frescura y La calidad Del boquerón (*Engraulis encrasicholus*) y SUS derivados. Barcelona: Universidad de Barcelona. 2005. 247 p. (Tese, Doutorado em Farmácia).

SÁNCHEZ-GUERRERO, I.M.; VIDAL, J.B.; ESCUDERO, A.I. Scombroid fish poisoning: a potentially life-threatening allergic-like reaction**. J. Allergy. Clin. Imm**unol., v . 100, n. 3, p. 433-434, 1997.

SCOTT, R.P.W. Liquid chromatography detectors. 2nd Ed. New York: Elsevier, 1986.

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

SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 29, p. 213-231, 1996.

SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 ºC and in chicken-based meat products. **Food Chem.**, v. 78, p. 214-248, 2002.

SILVA, T.M. **Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2008. 103 p. (Dissertação, mestrado em Ciência de Alimentos).

SIMAT, V.; DALGAARD, P. Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 44, p. 399-406, 2011.

SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W.H.; HALASZ, A. Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetable during storage at 5ºC. **J. Food Biochem**.,

v. 17, p. 407-418, 1994.

SINGH, V.P.; PATHAK, V.; VERMA, A.K. Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines - a review. **American J. Food Technology**, v. 7, p. 278-288, 2012.

SMART, D.R. Scombroid poisoning. A report of seven cases involving the Western Australian salmon, *Arripis truttaceus*. **Med. J. Aust**., v. 157, n. 11-12, p. 748-751, 1992.

SMITH, T.A. Amines in food. **Food Chemistry**, v. 6, p. 169-200, 1980-81.

SNYDER, L.R. ; KIRKLAND, J.J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1979.

SOARES, V.F.M.; GLÓRIA, M.B.A. Histamine levels in canned fish available in the retail market of Belo Horizonte, MG, Brazil. **J. Food Comp. Anal.**, v. 7, p. 102-107, 1994.

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 Chem**., v. 101, 704–716, 2007.

STATSOFT Statistica: (data analysis software system), Version 10. Tulsa, 2011. 1v.

STEPHEN, L.R.E.; VICKI, J.B.; TREVOR, D.F**. Pratical Statistics for the Analytical Scientist A Bench Guide**. RSC Publishing, 2nd ed. 2009.

STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 460-470, 1991.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 41-54, 2003.

TAHMOUZI, S.;, KHAKSAR, R.; GHASEMLOU, M. Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chem**., v. 126, p. 756–761, 2011.

TAKEMOTO, E. et al. Histamine intoxication outbreak associated to canned tuna intake in the state of São Paulo, Brazil. **BEPA**, v. 11, p. 29-32, 2014.

TANG, T. et al. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid. . **J. Chromatogr. B.**, v. 877, p. 507-512, 2009.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in analytical Chemistry**, vol. 23, n. 8, 2004.

TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. Genebra, **World Health Organization**, p. 1-45, 1985.

TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Crit. Rev. Toxicol**., v. 17, n. 2, p. 91-128, 1986.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **J. Pure Appl. Chem.,** v. 74, p. 835-855, 2002.

TODD, E.C. et al. Scombroid poisoning – an outbreak in two Ontario communities. **Can. Commun. Dis. Rep**., v. 18, n. 3, p. 17-19, 1992.

TRIKI, M.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; HERRERO, A.M.; RUIZ-CAPILLAS, C. Optimisation of a chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. **Food Chem**., v. 130, p. 1066–1073, 2012.

TSAI, Y-H. et al. Histamine level nad species identification of billfish meats implicated in two food-borne poisoning. **Food Chem**., v. 104, n. 4, p. 1366-1371, 2007.

UE. (União Européia). Decisão da Comissão de 16 outubro de 2006 **relativa a medidas de emergência aplicáveis aos produtos da pesca importados do Brasil e destinados ao consumo humano**. Disponível em: <http;//www.eur-lex.europa.eu>. Acesso em 13 mar. 2011.

UE. (União Européia). Regulamento (CE) n.o 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, **relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios** (JO L 338 de 22.12.2005). Disponível em: <http;//www.eur-lex.europa.eu>. Acesso em 13 mar. /2011.

VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **J. AOAC Int.**, v. 80, p. 1006-1012, 1997.

VECIANA-NOGUÉS, M.C.; HERNANDEZ-JOVER,T.; MARINÉ-FONT, A.;VIDAL-CAROU, M.C. Liquid chromatographic Method for Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products**. J.AOAC Int**., v. 78, p. 1045-1050, 1995.

VECIANA-NOGUÉS, M.C.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 2036-2041, 1997.

VICKERS, J.; SAFAI, B. Scombroid poisoning. **N. Engl. J. Med**., v. 368, v. 23, p. 31, 2013.

VIM. Vocabulário Internacional de Metrologia. **Conceitos fundamentais, gerais e termos associados**. 1ª. Ed Luso Brasileira. Rio de Janeiro: INMETRO. 2012.

VISCIANO, P.; SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; SUZZI, G. Biogenic amines in raw and processed seafood. **Frontiers of Microbiology**, v. 3, p.56-65, 2012.

YAMANAKA, H. Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. **Food Rev. Int**., v. 6, n. 4, p. 591-602, 1990.

ZAMAN, M.Z. et al. A review: microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. **Am. J. Applied Sci**, v. 6, n. 6, p. 1199-1211, 2009.

ZEE, J.A.; SIMARD, R.E.; L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. **J. Food Protect.**, v. 46, n. 12, p. 1044-1049, 1983.

ZHANG, L-Y.; SUN, M-X. Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. **J. Chromatography A**, v. 1040, n. 1, p. 133-140, 2004.