

DESENVOLVIMENTO  
DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
HISTAMINA EM PESCADO PROCESSADO.

10/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADO  
PROCESSADO.

*Paracur*

*Este exemplar corresponde  
à redação final da Tese  
defendida por Caritas de Jesus  
Silva Mendonça e aprovada  
pela Comissão julgadora em  
19.03.92*

Caritas de Jesus Silva, Mendonça

QUÍMICA

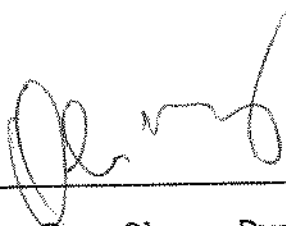
*6.*  
 Prof. Dr. Emilio Segundo Contreras Guzmán  
Orientador

TESE DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Campinas,

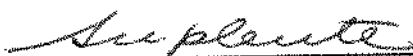
1992

BANCA EXAMINADORA



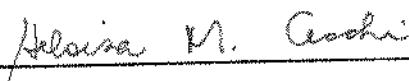
---

Prof. Dr. Olavo Rusig (membro)



---

Prof. Dr. Eidiomar Angelucci (membro)



---

Profa. Dra. Heloisa M. Cecchi (membro)



---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye (membro)

Campinas,

1992

A minha mãe, Conceição de Maria.

A tia, Renilde.

Aos meus irmãos, Jorge, Urubatan,

Rousylene e Fleubert.

A Mara Cristina C. Queiroz e

A Cláudia C. Braga,

pela força e amizade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Emilio Segundo Contreras Guzmán, pela orientação.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas por terem possibilitado a realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e ao Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa (FAEP) pelas bolsas de estudos concedidas.

À Profa. Dra. Maria Célia Pires Costa da Universidade Federal do Maranhão, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos do Instituto de Química, Maria H. Comerlato, Soraya Jericó, Rosa, Telma e Elias.

Aos amigos e Colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Manuel O. Plata, Myriam S. Mellado, Carlos Prentice, Liliana C. Puerta, Doralice F. Campagnolli, Judite Lapa, Caroline Steel.

Ao pessoal do Laboratório Geral de Tecnologia, Ana Maria, Ana Lourdes, Kimie Alice, Maria José e a Cláudia Breviário do Laboratório de Leite e Derivados, pela convivência agradável e pela colaboração na realização do trabalho.

À Silvia e Sofia M. Maciel pela amizade e incentivo.

À Tânia Franzoni F. da Silva pela valiosa colaboração na impressão final do texto.

À Aracilda Vitoriano e Aparecido D Moreira.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA) pelas cópias da tese.

## INDICE

|                                                          |                |
|----------------------------------------------------------|----------------|
| INDICE DE FIGURAS                                        | v              |
| INDICE DE TABELAS                                        | viii           |
| RESUMO                                                   | x              |
| SUMMARY                                                  | xi             |
|                                                          | <b>PÁGINAS</b> |
| <br>1 - INTRODUÇÃO                                       | <br>1          |
| <br>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                            | <br>4          |
| 2.1. - CARACTERÍSTICAS DA HISTAMINA                      | 4              |
| 2.1.1 - ANEL IMIDAZÓLICO                                 | 4              |
| 2.1.2 - ESTRUTURA QUÍMICA                                | 7              |
| 2.1.3 - PROPRIEDADES QUÍMICAS                            | 9              |
| 2.1.4 - PROPRIEDADES FÍSICAS                             | 11             |
| <br>2.2. - TOXICIDADE                                    | <br>12         |
| 2.2.1 - SINTOMATOLOGIA                                   | 16             |
| <br>2.3 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DA HISTAMINA EM PEIXE    | <br>18         |
| 2.3.1 - FORMAÇÃO DE HISTAMINA ATRAVÉS DA HISTIDINA LIVRE | 18             |
| 2.3.1.1 - EFEITO DA TEMPERATURA DE ESTOCAGEM             | 20             |
| 2.3.1.2 - EFEITO DO pH                                   | 22             |
| 2.3.2 - BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA EM PESCADO DE  | 23             |
| ORIGEM MARINHA                                           |                |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 2.4 - OCORRÊNCIA DE HISTAMINA EM PEIXES E PRODUTOS          | 25 |
| PROCESSADOS                                                 |    |
| 2.5 - MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA      | 31 |
| 2.5.1 - MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS                              | 31 |
| 2.5.2 - MÉTODOS COLORIMÉTRICOS                              | 37 |
| 2.5.3 - MÉTODOS CROMATOGRAFICOS                             | 41 |
| 3 - PARTE EXPERIMENTAL                                      | 50 |
| 3.1 - MATERIAIS                                             | 50 |
| 3.1.1 - AMOSTRAS DE PEIXES ENLATADOS                        | 50 |
| 3.1.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES                                | 51 |
| 3.1.3 - APARELHOS E EQUIPAMENTOS                            | 53 |
| 3.2 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO                             | 54 |
| 3.2.1 - HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PEIXES               | 57 |
| 3.2.2 - EXTRAÇÃO DA HISTAMINA DO TECIDO DO PEIXE            | 57 |
| 3.2.3 - PURIFICAÇÃO DO EXTRATO                              | 58 |
| 3.2.4 - REAÇÃO DA HISTAMINA (PRESENTE NOS EXTRATOS )        | 59 |
| COM O TNBS.                                                 |    |
| 3.2.5 - EXTRAÇÃO DO DERIVADO SULFONADO TNBS-HM              | 59 |
| 3.2.6 - AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO COMPLEXO           | 60 |
| TNBS-HM                                                     |    |
| 3.3 - ESTUDO DA REAÇÃO ENTRE O ÁCIDO 2,4,6-TRINITROBENZENO- | 61 |
| SULFÔNICO E HISTAMINA                                       |    |
| 3.3.1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE HISTAMINA           | 61 |
| 3.3.2 - REAÇÃO ENTRE TNBS E HISTAMINA                       | 61 |
| 3.3.2.1 - OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO DO COMPLEXO              | 63 |
| TNBS-HM                                                     |    |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2.2 - ESTUDO DO pH ÓTIMO E DO TEMPO DE REAÇÃO                                                                      | 63 |
| 3.3.2.3 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DO COMPLEXO<br>TNBS-HM                                                              | 64 |
| 3.3.2.4 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPLEXO<br>TNBS-HM                                                             | 64 |
| 3.3.3 - REAÇÃO ENTRE O TNBS E HISTAMINA, EM PRESENÇA DE<br>SUBSTÂNCIAS NITROGENADAS DE OCORRÊNCIA COMUM<br>EM PESCADOS | 64 |
| 3.4 - ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE PADRÕES DE HISTAMINA<br>ADICIONADOS NAS AMOSTRAS DE PEIXE                              | 65 |
| 3.5 - AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE ANALÍTICA                                                                         | 66 |
| 3.6 - DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM ENLATADOS DE ATUM,<br>BONITO E SARDINHA                                             | 66 |
| 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO                                                                                             | 67 |
| 4.1 - ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE HISTAMINA DO TECIDO DO PEIXE<br>E POSTERIOR PURIFICAÇÃO                                    | 67 |
| 4.1.1 - EXTRAÇÃO DA HISTAMINA                                                                                          | 67 |
| 4.1.2 - PURIFICAÇÃO DA HISTAMINA CONTIDA NO EXTRATO<br>DE NaCl 20% / HCl 2,5%                                          | 69 |
| 4.2 - ESTUDO DA REAÇÃO QUÍMICA ENTRE O ÁCIDO 2,4,6-TRINITRO<br>BENZENOSULFÔNICO E A HISTAMINA.                         | 71 |
| 4.2.1 - ESTUDO DO pH ÓTIMO E DO TEMPO DE REAÇÃO                                                                        | 72 |
| 4.2.2 - OBTENÇÃO DA CURVA-PADRÃO DO COMPLEXO TNBS-HM                                                                   | 85 |

|                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.3 - ESPECTROS DO COMPLEXO TNBS-HM NO ULTRAVIOLETA<br>E NO VISIVEL.                | 87  |
| 4.2.4 - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DO COMPLEXO TNBS-HM                                | 91  |
| 4.3 - ESTUDO DE SUBSTANCIAS INTERFERENTES DE OCORRÊNCIA<br>COMUM EM PESCADOS          | 95  |
| 4.4 - ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE PADRÕES DE HISTAMINA<br>ADICIONADOS NAS AMOSTRAS      | 101 |
| 4.5 - REPRODUTIBILIDADE ANALITICA DO METODO                                           | 105 |
| 4.6 - ESTUDO DO TEOR DE HISTAMINA EM PRODUTOS ENLATADOS<br>DE ATUM, BONITO E SARDINHA | 106 |
| 5 - CONCLUSÕES                                                                        | 109 |
| 6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                                        | 111 |

## ÍNDICE DE FIGURAS.

|                                                                                                         | Páginas |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| FIGURA 1 - Protonação do Anel Imidazólico                                                               | 5       |
| FIGURA 2 - Estruturas Ressonantes do Anel Imidazólico                                                   | 5       |
| FIGURA 3 - Substituição Eletrofílica na Posição 4 do Anel Imidazólico                                   | 6       |
| FIGURA 4 - Anion Imidazol                                                                               | 6       |
| FIGURA 5 - Fórmulas Estruturais da Histamina                                                            | 7       |
| FIGURA 6 - Forma Ionizada da Histamina em Condições de pH Fisiológico                                   | 8       |
| FIGURA 7 - Reação de Acetilação do Grupo Amino da Histamina                                             | 9       |
| FIGURA 8 - Reação da Histamina com Formaldeído em Meio Ácido                                            | 10      |
| FIGURA 9 - Reação da Histamina com Sal de Diazônio                                                      | 10      |
| FIGURA 10 - Formação da Histamina Através da Descarboxilação Biológica da Histidina                     | 19      |
| FIGURA 11 - Fluxograma de Extração e Purificação da Histamina                                           | 56      |
| FIGURA 12 - Histamina como Base Livre                                                                   | 70      |
| FIGURA 13 - Reação entre o TNBS e a Histamina em meio Alcalino (pH 9,3), a 70°C, no Tempo de 5 minutos. | 71      |
| FIGURA 14 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9,0         | 73      |
| FIGURA 15 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9,5         | 74      |

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 16 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 10,0                                                                                                                                                                   | 76 |
| FIGURA 17 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 11,0                                                                                                                                                                   | 77 |
| FIGURA 18 - Efeito do pH na Formação do Complexo TNBS-HM a 70°C, Tampão NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                                                                                                                        | 80 |
| FIGURA 19 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, (pH inicial 9,3), à 70 C, em Tolueno/HCl.                                                                                                                                                         | 82 |
| FIGURA 20 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, (pH inicial 9,3), a 70°C, em Tolueno/Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                                                                                                              | 83 |
| FIGURA 21 - Curvas-Padrão do Complexo TNBS-HM, pH 9,3.<br>Curva A: Padrões não submetidos a Partição em n-Butano;<br>Curva B: Padrões com Partição em n-Butanol. Equação da reta para Curva A: $1.192E-07) + (8.000E-03)*X$ Curva B: $(3.836E-03) + (6.110E-03)*X$ | 86 |
| FIGURA 22 - Espectro de Absorção do Derivado Sulfonado TNBS-HM, em HCl 0,25N                                                                                                                                                                                       | 88 |
| FIGURA 23 - Espectro de Absorção do Derivado Sulfonado TNBS-HM, em meio alcalino (Álcool Etilico, N,N-DMFM e KOH)                                                                                                                                                  | 89 |
| FIGURA 24 - Espectro de Absorção do Ácido 2,4,6-Trinitrobenzeno sulfônico em HCl 0,25N                                                                                                                                                                             | 90 |
| FIGURA 25 - Espectro de Absorção do Anel Imidazol, em HCl, na Região do Infravermelho                                                                                                                                                                              | 92 |
| FIGURA 26 - Espectro de Absorção da Histamina na Região do Infravermelho                                                                                                                                                                                           | 92 |

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 27 - Espectro de Absorção do TNBS na Região<br>do Infravermelho                                          | 93  |
| FIGURA 28 - Espectro de Absorção do Monoderivado Sulfonado,<br>TNBS-HM em HCl 0,25N, na Região do Infravermelho | 93  |
| FIGURA 29 - Complexo TNBS-Putrescina                                                                            | 99  |
| FIGURA 30 - Histamina Protonada                                                                                 | 99  |
| FIGURA 31 - Complexo de Amônio Quaternário (TMA)                                                                | 100 |
| FIGURA 32 - Curvas de Recuperação de Padrões de Histamina<br>em Extratos de Atum e Bonito                       | 104 |

## ÍNDICE DE TABELAS.

|                                                                                                                                                      | Páginas |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| TABELA 1 - Espécies de Peixes Relacionados na Intoxicação por Histamina.                                                                             | 26      |
| TABELA 2 - Níveis de Histamina (HMD) em Enlatados de Peixes.                                                                                         | 29      |
| TABELA 3 - Efeito das Soluções Extratoras na Recuperação da Histamina                                                                                | 68      |
| TABELA 4 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9,0. Absorbância a 420nm                                  | 75      |
| TABELA 5 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9,5. Absorbância a 420nm                                  | 75      |
| TABELA 6 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 10 Absorbância a 420nm                                    | 78      |
| TABELA 7 - Influência do Tempo de Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 11. Absorbância a 420nm                                   | 78      |
| TABELA 8 - Efeito do pH na Reação do TNBS com Histamina, a 70°C e Tempo de 5 minutos                                                                 | 79      |
| TABELA 9 - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina (pH inicial 9,3), a 70°C, em Tolueno/HCl, Absorbância a 420nm.                        | 84      |
| TABELA 10 - Influência do Tempo de Reação do TNBS com Histamina (pH inicial 9,3), a 70°C, em Tolueno/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Absorbância a 420nm | 84      |

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABELA 11 - Valores de Absorbância e Níveis de Interferência<br>de Diversos Compostos na Determinação de Histamina<br>pelo Método Desenvolvido | 96  |
| TABELA 12 - Valores de Recuperação de Padrões de Histamina<br>Adicionados em Extratos sem Amostra                                              | 102 |
| TABELA 13 - Valores de Recuperação de Padrões de Histamina<br>Adicionados em Amostras de Atum e Bonito                                         | 103 |
| TABELA 14 - Avaliação da Reprodutibilidade Analítica DO<br>Método em Amostras de Enlatados de Atum e Bonito.                                   | 105 |
| TABELA 15 - Teores de Histamina em Amostras de Atum.                                                                                           | 107 |
| TABELA 16 - Teores de Histamina em Amostras de Bonito.                                                                                         | 108 |
| TABELA 17 - Teores de Histamina em Amostras de Sardinha                                                                                        | 109 |

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
HISTAMINA EM PESCADOS PROCESSADOS.

RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido um método simples e preciso para dosar histamina em pescados processados. O método envolve a reação do ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) com a histamina, dando como produto um complexo colorido com absorção na região próxima a 420nm.

Foram realizados diversos experimentos para a dissociação e extração da histamina dos tecidos musculares. Dentre as soluções testadas, a mais eficiente foi uma mistura de solução de cloreto de sódio a 20% e ácido clorídrico a 2,5%.

A técnica de extração e purificação mostrou-se eficiente para eliminar interferências de aminoácidos, aminas voláteis, diaminas, creatina, uréia, derivados dos nucleotídeos e de outros compostos comumente presentes em extratos de peixe.

A recuperação da histamina adicionada, nas amostras, em concentrações de 25µg, 50µg, 100 e 200µg, ficou entre 85,6 e 100%.

Os ensaios para avaliar a reprodutibilidade do método, foram realizados em produtos comerciais de atum (Thunnus maccoyii) e bonito (Euthynnus affinis) e os resultados mostraram boa reprodutibilidade, com desvio-padrão de 3,8 e 3,4%, respectivamente.

Os resultados indicam que este método pode ser usado para detectar histamina em níveis acima de 0,1mg/100g de amostra.

## Development of a method for the determination of histamine in processed fish.

### SUMMARY

In this research, a simple method to analyze histamine in canned fish was developed. The method involve a reaction of histamine with 2,4,6-Trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS), with production of colored complex with absorption in 420nm. In a first step, were conducted essays for the dissociation and extraction of histamine in muscular tissue. The most appropriate solution was a mixture of 20% sodium chloride and 2,5% hydrochloric acid.

The extraction technique proved efficient to eliminate the interference of aminoacids, volatile amines, diamines, creatin, urea, nucleotide derivatives and other compounds commonly found in fish extracts.

The recovery of histamine added to 10g of fish samples at levels of 25µg, 50µg, 100µg and 200µg, in pure extracts and extracts with samples, were between 85,6 and 100%.

The assays to evaluate the reproductibility of the method were carried out with tuna (*Thunnus maccoyii*) and striped tunny (*Euthynnus affinis*) commercial products and the results showed good reproductibility with a standard deviation of 3,8 and 3,4%, respectively.

The results, indicate that this method can be used to detect histamine in levels above 0,1mg/100g of sample.

## 1 - INTRODUÇÃO

Do ponto de vista sanitário é muito importante determinar a existência de amins não voláteis, como a histamina, visto que estas substâncias podem conferir toxicidade ao alimento, mesmo antes deste ser considerado deteriorado ou organolepticamente inaceitável (Eitenmiller, 1975).

Essas amins, aromáticas ou alifáticas, são compostos nitrogenados de caráter básico, que se formam normalmente nos tecidos animais e vegetais durante seu processamento, em consequência de uma estocagem inadequada.

O aparecimento dessas substâncias pode ocorrer pela degradação dos aminoácidos, dos dipeptídeos ou de outros compostos típicos dos músculos. Os mecanismos responsáveis pela sua formação são bem distintos.

A presença de histamina, principalmente em concentrações acima de 100mg/100g de pescado, tem sido relacionado com episódios ou surtos de intoxicação.

Levantamentos epidemiológicos conduzidos no Japão, nos Estados Unidos da América, na Inglaterra e em outros países tem revelado que produtos de pescado, industrializados ou não, são comumente relacionados com tais surtos (Leitão et alii, 1983).

No Brasil, os enlatados de atum e bonito tornaram-se, na última década, o único item da indústria pesqueira que apresentou

um crescimento ostensivo, ameaçando deslocar para o segundo lugar a tradicional sardinha enlatada. Por outro lado, a cada ano, o atum congelado está se tornando mais importante dentre os produtos marinhos de exportação.

Essa situação faz com que as indústrias procurem, com mais frequência, controlar a qualidade das matérias-primas, para satisfazer aos compradores que exigem teores muito baixos de histamina.

Existe na literatura científica uma variedade de métodos para quantificar histamina em materiais biológicos, incluindo os métodos fluorimétricos e cromatográficos. Todavia, a maioria dos métodos são trabalhosos, consomem muito tempo e, embora apresentem uma boa exatidão, são caros para serem implantados no controle rotineiro das indústrias.

Ao longo do tempo esses métodos sofreram uma série de modificações que visavam, além de uma análise mais acurada da histamina, uma diminuição do tempo de análise para viabilizar sua aplicação a nível de laboratório de controle de qualidade industrial. O método oficial da A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists), inclui uma purificação em coluna de resina de troca iônica e essa manipulação excessiva dos extratos resulta frequentemente em perdas, até mesmo do padrão de histamina adicionado na amostra.

Os fatores que podem influenciar na escolha dos métodos usados incluem o tempo gasto, habilidade técnica envolvida, custo e disponibilidade de reagentes e de equipamentos.

Os procedimentos oficiais de análise de histamina requerem certamente resultados exatos, utilizando equipamentos sofisticados e caros, enquanto que para avaliações rotineiras de controle de qualidade em planta piloto, ou na indústria, estas podem ser realizadas dentro de uma faixa aceitável de exatidão, usando técnicas mais simples e de menor custo.

Com base nessas observações, este trabalho teve como objetivo desenvolver um método simples e confiável, para estimular e viabilizar o controle do teor de histamina em enlatados de peixes. Este método envolve a extração, purificação e quantificação da histamina mediante partição com solvente e posterior reação com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). A quantificação do complexo formado é realizada através de um espectrofotômetro VIS.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 - CARACTERÍSTICAS DA HISTAMINA (HMD).

#### 2.1.1 - ANEL IMIDAZÓLICO

O imidazol, um isômero do pirazol, encontra-se formando parte do núcleo da purina, do aminoácido histidina e da histamina, e suas características principais são descritas por Jones (1966) e Finar (1970).

O imidazol, com ponto de fusão a 90°C, é uma base fraca, porém mais forte que o pirrol ou a piridina. Isto ocorre porque a protonação de um dos átomos de nitrogênio (N-3) do imidazol não destrói o sexteto aromático do anel. Como o imidazol tem dois nitrogênios, o par de elétrons de um deles é como o do pirrol, faz parte de um sexteto aromático e, portanto, não aceita um próton com facilidade; o outro par de elétrons está muito mais disponível ao ataque de um próton (Figura 1), daí a razão do imidazol ser uma base mais forte e estável à oxidação e à redução que o pirrol e a piridina. Um raciocínio semelhante explica porque o imidazol é um pouco mais ácido do que o pirrol.

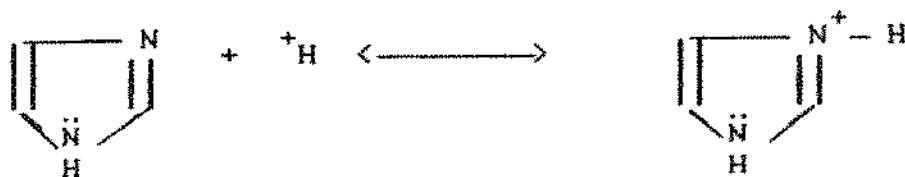


FIGURA 1. - Protonação do Anel Imidazólico

A forma protonada do imidazol é, de fato, mais estável, uma vez que duas estruturas equivalentes de ressonância podem ocorrer, conforme a Figura 2.

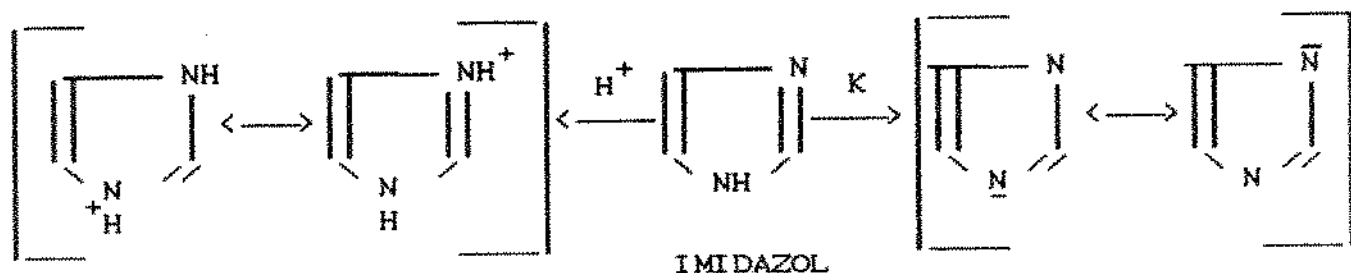


FIGURA 2 - Estruturas Ressonantes Do Anel Imidazólico

O imidazol ocorre na natureza no aminoácido histidina, como constituinte de proteínas. O imidazol é muito mais sensível à substituição eletrofílica do que a piridina, mas é menos reativo que o pirrol. Com substituintes na posição 1, a substituição

eletrofilica ocorre na posição 4, como mostra a reação, Figura 3.

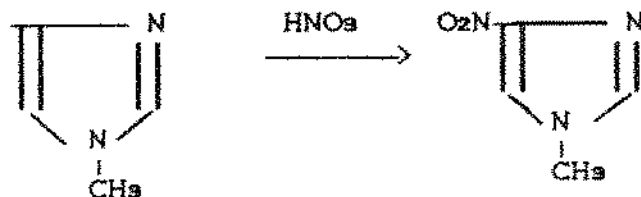


FIGURA 3 - Substituição Eletrofilica na Posição 4 do Anel Imidazólico

O imidazol possui propriedades anfóteras, logo funciona como um ácido e como uma base. Por ser um ácido fraco, reage com bases fortes para formar Ânions (Figura 4).



FIGURA 4. - Ânion Imidazol

O nitrogênio, sendo mais eletronegativo do que o carbono, é menos apto a acomodar a deficiência de elétrons, que caracteriza o estado de transição da etapa determinante da velocidade das reações de substituição eletrofilica aromática. Por

apto a acomodar o excesso de cargas negativas que um anel aromático, na substituição nucleofílica. A estrutura anterior representa um híbrido de ressonância e a carga negativa não está localizada em um átomo de nitrogênio ou no carbono, mas sim distribuída por toda a molécula, tornando o íon mais estável.

### 2.1.2 - ESTRUTURA QUÍMICA

A histamina é uma substância farmacologicamente ativa, formada por uma molécula hidrofílica, composta de um anel imidazólico e de um grupo amino ligado por dois grupos metileno. Estruturalmente, a histamina é a 4-(ou 5)-2-aminoetilimidazol, e está representada por ambas as formas I e II, Figura 5 (Gilman & Goodman, 1987).



FIGURA 5. - Fórmulas Estruturais da Histamina

O modo convencional para numeração dos átomos do anel imidazólico é atribuir a posição 1 ao grupo amino, e segue em volta do anel atribuindo ao átomo de nitrogênio, o menor número possível, que é 3. Como observado nas estruturas I e II (Figura 5), os átomos de carbono do grupo etila recebem a numeração 1 e 2, independentemente do anel. O hidrogênio imino do anel é móvel e pode mudar de um átomo de nitrogênio para outro, com concomitante mudança da dupla ligação. Assim, as duas fórmulas I e II da histamina coexistem.

No pH fisiológico, o nitrogênio amínico da cadeia lateral encontra-se protonado, existindo a histamina na forma de cátion monovalente, e formando uma ponte de hidrogênio intramolecular entre o grupo amino da cadeia lateral e um nitrogênio do anel imidazólico, Figura 6 (Jones, 1966).

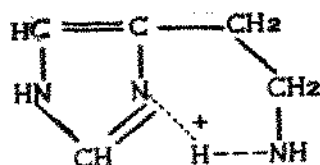


FIGURA 6. - Forma Ionizada da Histamina em Condições de pH Fisiológico.

### 2.1.3 - PROPRIEDADES QUÍMICAS

A histamina apresenta as reações características do grupo amino primário e do grupo imidazólico (Jones, 1966).

A acetilação do grupo amino primário da histamina realiza-se facilmente pela reação com anidrido acético, dando a N-acetil histamina. A N-benzoil-histamina tem sido preparada por tratamento brando da histamina com o cloreto de benzoila. Novas reações deste produto com o cloreto de benzoila, em solução de benzeno e sob condições cuidadosamente controladas, conduz ao 1-benzoil-4- (2-benzamidoetil) imidazol. As reações são mostradas na Figura 7.

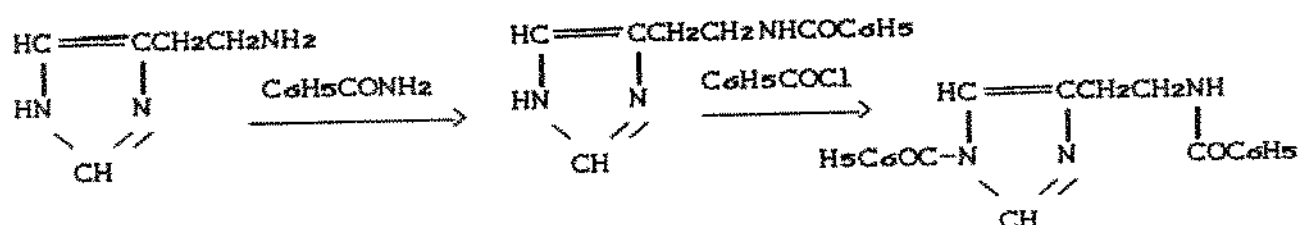


FIGURA 7. - Reação de Acetilação do Grupo Amino da Histamina.

Aldeídos aromáticos reagem com a histamina para formar bases de Schiff, as quais são isoladas como cristais sólidos amarelos ou alaranjados. Esses compostos podem ser reduzidos cataliticamente com álcool e sódio para formar histamina N-alquilada.

A histamina reage com formaldeído em meio ácido, dando

como produto final um composto bicíclico, conforme é mostrado na Figura 8. Inicialmente esse produto foi relatado como sendo mais ativo do que a histamina em musculatura lisa. Mais tarde foi observado que o composto é praticamente destituído de atividade do tipo da histamina (Jones, 1966).

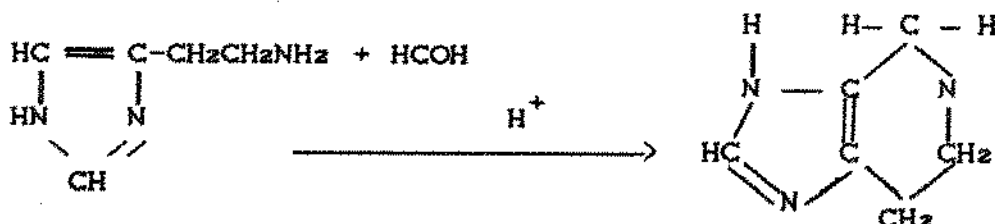


FIGURA 8. - Reação da Histamina com Formaldeído em Meio Ácido.

Uma reação típica de muitos compostos imidazólicos, incluindo a histamina, é obtida com sais de diazônio ( $X^- N \equiv N^+ - Ar$ ) dando produtos mono e diazotados, mostrados na Figura 9 (Finar, 1970).

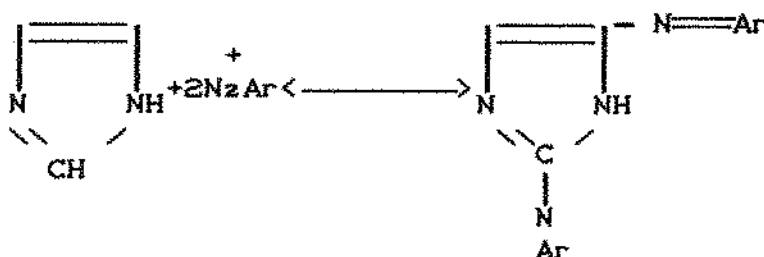


FIGURA 9 - Reação da Histamina com Sal de Diazônio.

Esta reação foi descrita inicialmente como um teste de cor para histidina e outros compostos imidazólicos.

Posteriormente, foi desenvolvida uma reação com o composto de diazônio como teste qualitativo para a histamina. Após cuidadosos estudos sobre reações entre compostos de diazônio e imidazol foi concluído que, nos produtos, o grupo azo está ligado ao átomo de carbono no núcleo do anel imidazol. Para ocorrer a ligação, o grupo imino presente deve estar livre e, um átomo de hidrogênio, ou algum outro grupo substituinte, ocupará as posições 2, 4 ou 5 do anel imidazol.

#### 2.1.4 - PROPRIEDADES FÍSICAS.

A histamina funde a  $83^{\circ}\text{C}$  -  $84^{\circ}\text{C}$  em forma de cristais incolores. Seu ponto de ebulição está entre  $209^{\circ}\text{C}$  e  $210^{\circ}\text{C}$ . A base é altamente solúvel em água, mas insolúvel em éter etílico e benzeno.

Estudando a solubilidade da histamina em água, Tabor & Mosettig, citados por Jones (1966), observaram que a mesma é altamente associada às pontes de hidrogênio.

O espectro de absorbância no ultravioleta não permite utilização prática como método analítico da histamina, pois o composto não exibe absorbância máxima na região de 210nm a 700nm.

Quando titulada em solução aquosa, a histamina apresenta dois centros básicos com valores de  $\text{pK}_a$  de 5,94 e

9,80. Se a titulação for realizada em solução aquosa de cloreto de potássio, a 25°C, os valores de pKa são 5,79 e 9,76. Duas séries de sais de histamina são formados, dependendo da neutralização de um ou de ambos os grupos básicos.

## 2.2 - TOXICIDADE

Alguns incidentes de intoxicação alimentar, associados com o consumo de vários tipos de peixe "'in natura"' e processados, contendo altos níveis de histamina, demonstram os riscos à saúde pública, devido à formação de amins biologicamente ativas.

Essas intoxicações estão relacionadas, geralmente, com o consumo de certas espécies de peixes que contêm grandes quantidades de histidina livre no músculo (Baldini, 1982). Essas espécies incluem peixes pelágicos ( que vivem na superfície ou próximos a ela) e, particularmente, peixes do filo Chordata, classe Osteichthyes, ordem Perciformes e família Scombridae; nesta família algumas espécies de amplo consumo, como atum (Tunnus thynnus L), bonito (Sarda sarda) e cavalinha (Scomber japonicus Houtt). Quando manuseados ou processados em condições impróprias, podem atingir níveis elevados de histamina, causando casos graves de intoxicação alimentar (Taylor & Lieber, 1977).

Cabe acrescentar que outras espécies do tipo sardinha, jurel, arenque e anchova, também revelam alto conteúdo de

histamina (Ienistea, 1973; Bostock *et alii*, 1989).

Segundo a International Commission on Microbiological Specifications For Food (I.C.M.S.F) (1978), o envenenamento de seres humanos por histamina ocorre quando o alimento consumido possui níveis superiores a 100mg/100g de pescado.

Ienistea (1973), relaciona os teores de histamina em pescados normalmente associados aos seguintes efeitos: valores inferiores a 5mg/100g são normais, ao passo que níveis entre 5mg e 10mg/100g já podem causar sintomas em indivíduos mais sensíveis; entre 10mg e 100mg/100g são potencialmente tóxicos e, por fim, em níveis acima de 100mg/100g, a toxicidade é muito elevada. O mesmo autor indica que o nível de tolerância à histamina, num indivíduo de 70kg está por volta de 5mg a 6mg por refeição. Os efeitos prejudiciais em relação à quantidade de histamina ingerida em uma refeição são: intoxicação leve, de 8mg a 40mg; distúrbios de intensidade moderada, de 70mg a 1000mg e, distúrbios graves, de 1500mg a 4000mg.

A Food and Drug Administration considera, para atum, um nível de 20mg/100g como evidência de decomposição e 50mg/100g como um nível perigoso (Leitão *et alii*, 1983).

Apesar da histamina ser apontada como agente causador de intoxicação por peixes escombrídeos, a evidência para o envolvimento desta substância é geralmente circunstancial e está sustentada em três fatos: a) a similaridade em sintomatologia quando comparada à administração endovenosa de histamina; b) a eficiência na terapia de anti-histamínico e c) a correlação entre

os altos níveis de histamina com os efeitos tóxicos dos alimentos. Todavia, a administração de histamina pura em seres humanos e em animais resulta na ausência de efeitos tóxicos, segundo Geiger, (1955) e Motil et alii (1979), citados por Arnold & Brown (1978).

Em levantamento realizado por Arnold & Brown (1978), reporta-se que Weiss et alii (1966), administraram doses de fosfato de histamina de 200mg a 500mg (500mg equivalem a 180mg de histamina) em voluntários, sem que se notasse qualquer alteração no quadro clínico. Os mesmos autores citam mais dois casos de ingestão oral de altas doses de histamina em humanos, sem manifestação de intoxicação.

O paradoxo entre a aparente toxicidade dessa amina, quando consumida com certos peixes e a falta desse efeito quando ingerida pura, pode ser explicado pela presença de potenciadores dessa intoxicação. É provável que outras aminas biogênicas, como a putrescina e em especial a cadaverina, possam potencializar o efeito da histamina mediante a inibição do efeito anti-histamínico (Bostock et alii, 1989)

A idéia de potenciadores da toxicidade da histamina em peixes da família Scombridae não é particularmente nova. Em meados de 1954, dois cientistas japoneses, Miyaki & Hayashi, citados por Taylor (1985), sugeriram que a "saurina", substância tóxica de efeitos similares aos da histamina, atuava sinergisticamente com a histamina em processos de intoxicação; no entanto, pesquisas mais recentes revelaram que a "saurina" era idêntica à histamina (Foo, 1976).

Parrot & Nicot (1966), citados por Arnold & Brown (1978), reportaram que a administração de putrescina, antes da histamina, aumentava a sua toxicidade em cobaia, e que a cadaverina também tem se mostrado um potenciador forte dessa toxicidade.

No homem, sob circunstâncias normais, as aminas absorvidas a partir de alimentos, são rapidamente destoxicadas por uma aminoxidase. A histamina é oxidada por uma diamino-oxidase encontrada nas paredes dos intestinos (Chu & Bjeldanes, 1981).

Segundo Karmas & Mietz, citados por Baldini (1982), as altas concentrações das diaminas putrescina e cadaverina em peixes, poderiam reduzir a oxidação da histamina e atuar como potenciadores de seus efeitos biológicos.

Chu & Bjeldanes (1981) estudaram o mecanismo pelo qual determinadas diaminas, em associação com a ingestão de atum fresco, alteram as proporções de transporte de histamina através das paredes intestinais e/ou potencializam a toxicidade da histamina pela influência das substâncias na ligação com a mucina gástrica. Os resultados desses estudos, "in vitro", mostraram que existe uma relação linear de ligação da histamina à mucina, como função da concentração de histamina. Em presença de poliaminas houve inibição da ligação, e essa inibição aumentava quando a concentração das poliaminas era aumentada, até um máximo de inibição.

Uma vez que a histamina, quando ingerida oralmente, não é tóxica, é possível que haja uma barreira à absorção de histamina no intestino. Essa barreira seria uma quantidade relativamente

grande de mucina estomacal que retarda o transporte de histamina nos intestinos e, em combinação com uma série de processos metabólicos, destoxicam a histamina quando liberada da mucina.

A inibição da ligação da histamina à mucina pela cadaverina, putrescina, carnosina, anserina e outros compostos, observada por Mietz & Karmas (1977), está de acordo com a hipótese de que estas substâncias podem liberar a histamina da mucina gástrica e aumentar sua absorção intestinal, resultando no aumento da toxicidade.

#### 2.2.1 - SINTOMATOLOGIA

Infelizmente não existem boas estatísticas sobre a incidência de intoxicação causada por histamina, uma vez que os incidentes raramente são publicados, há erros de diagnósticos e os serviços de saúde pública muitas vezes não fazem ou fazem pouco esforço para disseminar informações sobre os casos ocorridos. Por isso, a verdadeira incidência de envenenamento relacionado com essa toxina é pouco conhecido.

Visto tratar-se de uma "intoxicação", o período de incubação é curto, variando de alguns minutos a 2 ou 3 horas, embora frequentemente seja inferior a uma hora (Leitão, 1980; Taylor 1985).

O processo patológico apresenta sintomas muito bem definidos e característicos; o mais comum é um processo inflamatório da face e do pescoço, gerando uma sensação de calor e desconforto. Este processo é decorrente da ação dilatadora da histamina nos pequenos vasos e capilares sanguíneos. A seguir, o paciente apresenta normalmente uma cefaléia intensa e contínua, centralizada nas regiões frontal e temporal, acompanhada de problemas de palpitações cardíacas. Outros sintomas que podem ocorrer são: tonturas, desfalecimento, sensação de queimação na boca e garganta, dificuldade em engolir, eritema no rosto e pescoço acompanhado por comichões (Leitão, 1980).

Os sintomas secundários, apresentados por aproximadamente 25% dos pacientes, são de natureza gastrointestinal. Estes incluem dores abdominais, diarreia e náuseas sem vômitos.

A taxa de mortalidade é desprezível (0,07%), ao passo que a recuperação dos pacientes é usualmente rápida, variando de 4 a 12 horas (Arnold & Brown, 1978).

A confusão em se diagnosticar a intoxicação por histamina como alergia alimentar é compreensível, visto ser esta amina o mediador primário "in vivo" da enfermidade (Taylor, 1988).

## 2.3 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DA HISTAMINA EM PEIXE

Os primeiros estudos realizados sobre a formação de histamina em tecido de pescado foram baseados na autólise, embora tenha sido concluído que essa amina era formada após a morte, por contaminação bacteriana (Arnold & Brown, 1978).

Estudos extensivos sobre a descarboxilação da histidina, provocada por bactérias, foram realizados posteriormente, com o isolamento e a caracterização desses microorganismos.

Inúmeras pesquisas evidenciam que a formação de histamina em pescado "in natura", enlatado, defumado ou salgado, decorre principalmente da atividade bacteriana, envolvendo espécies capazes de produzir a enzima histidina descarboxilase, que atua no aminoácido L-histidina livre presente no tecido (Corlet et alii., 1978; Leitão, 1983; Frank, 1985).

### 2.3.1 - FORMAÇÃO DE HISTAMINA ATRAVES DA HISTIDINA LIVRE

No processo de formação da histamina, o aminoácido na forma livre sofre reação de descarboxilação biológica, com perda de uma molécula de dióxido de carbono e formação da amina, conforme mostrado na Figura 10.

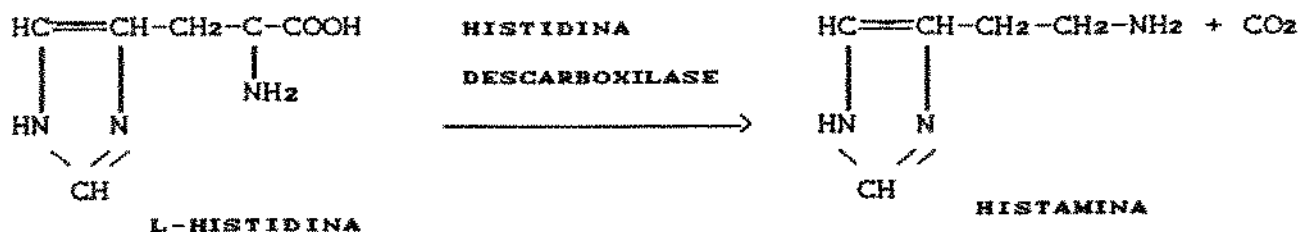


FIGURA 10- Formação da Histamina Através da Descarboxilação Biológica da Histidina.

Pesquisas indicam que a produção de histamina ocorre somente a partir da L-histidina livre, sendo que ligações peptídicas, tanto nos grupos  $-\text{COOH}$  como  $-\text{NH}_2$  da histidina, previnem qualquer atividade descarboxilase (Arnold & Brown, 1978). Por outro lado, também foi evidenciado que níveis mais altos de histidina livre são encontrados nos fluídos sarcoplasmáticos dos peixes de carne vermelha, como os da família Scombridae. Esses níveis de histidina livre variam de 400mg a 1200mg/100g de peixe, enquanto outras famílias biológicas contém apenas 0 a 100mg/100g de peixe. Convém acrescentar que outras espécies como sardinha, arenque e jurel também revelaram altos níveis de histidina (Ienistea, 1973; Frank, 1985).

Portanto, o acúmulo de histamina nos alimentos, dependerá fundamentalmente do teor de histidina livre e da proliferação microbiana de espécies histidina descarboxilase positivas. A histidina (ácido  $\alpha$ -amino-4 ou 5-imidazol propiônico,  $C_6H_9N_3O_2$ ), é o derivado mais importante do imidazol, por apresentar um papel vital nas reações que se passam em sítios ativos de certas enzimas.

#### 2.3.1.1 - EFEITO DA TEMPERATURA DE ESTOCAGEM

Nos processos de estocagem à temperatura ambiente pode ocorrer variações bem significativas na formação de histamina (Edmunds & Eitenmiller, 1975). Omura, citado por Arnold & Brown (1978), detectou grandes diferenças nas concentrações de histamina em atum estocado sob condições semelhantes.

Numerosos estudos têm sido realizados quanto à produção de histamina próximo ao ponto de congelamento e à temperatura de refrigeração, onde os autores constataram que as bactérias formadoras de histamina foram destruídas ou incapacitadas de descarboxilar a histidina 0°C.

Estudos desenvolvidos em processos de estocagem a 4°C mostraram que pouca histamina foi produzida em tecidos de cavala e de outros peixes e que os microorganismos psicrófilos apresentavam baixa capacidade para descarboxilar (Edmunds & Eitenmiller, 1975). Esses mesmos autores, em trabalhos posteriores

(1982), determinaram que o Proteus morganii apresenta ótima síntese da enzima a 24°C, diminuindo com o aumento da temperatura, sendo mínima a 42°C. A 37°C, o nível de atividade da enzima foi aproximadamente 25% daquela encontrada a 24°C. Arnold & Brown (1978), mencionam que a descarboxilase de origem bacteriana é mais ativa em temperatura abaixo de 30°C e sem atividade acima de 40°C ; entretanto, abaixo de 10°C a produção de histamina é muito reduzida sendo praticamente interrompida a 5°C. Outros autores reportaram que a 6°C, conforme a umidade do meio, quantidades pequenas de histamina foram formadas e que não houve formação a -20°C, durante dois meses. Trabalhos recentes têm mostrado que certas cepas de Proteus morganii e Proteus vulgaris são capazes de produzir níveis de histamina em excesso (120mg%), quando o meio de cultura padrão é enriquecido com uma infusão de atum e incubada por seis dias a 7°C (Arnold & Brown, 1978).

Gale & Kimata, citados por Baldrati et alii (1980), observaram que a histidina descarboxilase manifestava atividade máxima em temperaturas inferiores a 30°C e que as espécies Achromobacter histamineum (Proteus morganii), apresentavam crescimento ótimo entre 20°C a 25°C, com atividade descarboxilase máxima a 20°C. Em temperaturas mais elevadas (30°C-40°C) não foi detectada a formação de histamina e, a 60°C, as bactérias produtoras de histamina estavam inativadas.

É evidente que, tanto a flora bacteriana original do peixe, como aquela contaminação durante o manuseio e processamento, podem influenciar drasticamente na formação de histamina.

### 2.3.1.2 - EFEITO DO pH.

Kawabata *et alii*, citados por Arnold & Brown (1978), relatam que estudos realizados com treze cepas de Proteus morganii, Proteus mirabilis, Proteus rettgeri e Proteus vulgaris, mostraram maior atividade histidina descarboxilase em uma faixa de pH 6,0 a 6,5. A produção máxima de histamina pelo Proteus morganii ocorreu em pH 5,1. Os organismos que cresciam no intervalo de pH 5,5 a 7,3 apresentaram 50% de atividade máxima, enquanto os que cresciam em pH de 7,6 a 8,7 apresentaram apenas 10% de atividade máxima. O pH no tecido fresco dos escombrídeos geralmente está no intervalo de pH de 5,5 a 6,5. Desse modo, a ligeira acidez no peixe favorece a produção de histamina.

Trabalhando com cepas de Proteus morganii, Eitenmiller *et alii* (1982), observaram que a enzima histidina descarboxilase apresentou um pico de atividade ótima em pH 6,5, diminuindo rapidamente em valores próximos a esse pH, com pouca atividade em pH 5,0.

Em pesquisas realizadas por Baranowsk *et alii* (1985), com Klebsiella pneumoniae UH-2 isolada de atum deteriorado, foi observado que a conversão de histidina para histamina por células em repouso, mostraram um pH ótimo de 4,0; e em pH 6,0 a atividade diminuiu para 70% do valor da atividade em pH 4. Assim, é possível a ocorrência de uma atividade enzimática em peixe fresco, onde o pH é de aproximadamente 6,0. O valor de pH 4,0 está de acordo com aquele reportado para conversão de histidina em histamina por

bactérias.

### 2.3.2 - BACTERIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA EM PESCADO DE ORIGEM MARINHA.

Muitos microorganismos foram evidenciados como tendo uma intensa capacidade de descarboxilar histidina dependendo, naturalmente, da natureza dos substratos e das condições de incubação. Ienistea (1973), destaca principalmente dentre os membros da família Enterobacteriaceae, os gêneros Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Shigella e Proteus; e também espécies dos gêneros Achromobacter, Pseudomonas, Streptococcus e Lactobacillus.

Segundo o I.C.M.S.F (1978), Proteus morganii parece ser o principal produtor de histamina, embora espécies de Salmonella, Shigella e Clostridium também revelem esse potencial.

Cattaneo & Cantoni, citados por Leitão et alii (1983), concluíram que, as enterobactérias são as principais responsáveis pela produção de aminas em pescado; contudo, a Escherichia coli e Proteus vulgaris se destacam como os maiores produtores.

Omura et alii (1978), isolaram bactérias produtoras de histamina a partir do atum e da cavala em decomposição e testaram a capacidade para produzirem histamina em caldo de infusão de atum. Eles identificaram 44 cepas formadoras de histamina, entre elas: Proteus morganii (21 cepas), Hafnia alvei (13 ), Proteus sp (3) Klebsiella sp (1) e seis cepas não identificadas.

Aiso *et alii*, citados por Jones (1966), comprovaram que a maior atividade, dentre um grande número de espécies e cepas de bactérias examinadas, foi de Proteus morganii. Pennimpede *et alii*, mencionado pelo mesmo autor, observaram várias espécies de Klebsiella, bactérias que podem converter de 13% a 16% de histidina em histamina, em 24 horas.

Segundo Chang & Snell, citados por Arnold & Brown (1978), certos Lactobacillus também são capazes de produzir histamina. Observaram também que a capacidade destes Lactobacillus em produzir histamina é limitada a poucas cepas.

Frank (1985), relacionou 15 espécies de bactérias produtoras de histamina, isoladas de peixes marinhos, constatando que Proteus morganii é o microorganismo mais comumente responsável pelos elevados níveis de histamina em pescados deteriorados.

No Brasil, Leitão *et alii* (1983), estudaram a ocorrência de bactérias produtoras de histamina em amostras do tecido muscular e vísceras de pescado de origem marinha (cação, corvina, cavalinha, bonito e atum). Constataram a presença principalmente na superfície dos tecidos musculares (52,6% e nas vísceras 33,1%, tanto a 35°C como a 25°C. Proteus morganii foi a bactéria histamina positiva de maior ocorrência (58,8%), seguida de Proteus rettgeri e outras espécies de Acinetobacter, Pseudomonas, Enterobacter e Klebsiella.

Okuzumi *et alii* (1982), realizaram estudos com bactérias psicrófilicas e halófilicas produtoras de histamina, quando estocadas a 5°C e 20°C. Esses organismos parecem fazer parte da

microflora natural dos peixes de origem marinha de carne vermelha, principalmente a cavala e a sardinha.

Em estudos realizados por Baldrati et alii (1980), com amostras de cavala (Scomber scombrus L.) armazenadas a 18°C e a 30°C, sobre a influência da temperatura na formação de histamina, foi observado que a flora bacteriana a 18°C era constituída por microorganismos Coliformes e Proteus, enquanto a 30°C, a flora bacteriana era constituída por microorganismos dos gêneros Achromobacter, Alcaligenes e Proteus.

#### 2.4 - OCORRENCIA DE HISTAMINA EM PEIXES E PRODUTOS PROCESSADOS.

Ainda que o alimento processado seja considerado seguro do ponto vista sanitário, considerando que tenha sido esterilizado, o mesmo pode não estar livre da presença de histamina uma vez que esta é resistente ao tratamento térmico. A histamina é parcialmente destruída quando submetida a uma temperatura de 102°C durante 3 horas, ou a 116°C durante 90 minutos, em latas de 250g (Ienistea, 1973).

Alguns dos peixes que têm sido relacionados a intoxicações por histamina, aparecem listados na Tabela 1.

Os peixes da família Scombridae são os mais comumente implicados nesse tipo de intoxicação, como as várias espécies de de atum, bonito, albacora, cavala, cavala espanhola e sauri.

Existem certos tipos de peixe não-escombrídeos que também estão envolvidos em incidentes de intoxicação. Entre eles estão sardinha e arenque da família Clupeidae, dourado e mahi-mahi da família Coryphaenidae e anchova da família Engraulidae. Portanto, é inteiramente correto associar a intoxicação histamínica aos escombrídeos.

Suzuki *et alii*, citados por Arnold & Brown (1978), foram os primeiros a detectar a presença de histamina em extratos de atum, Geiger *et alii* também citados por Arnold & Brown (1978), investigaram o conteúdo de formação de histamina em extratos de cavala e de sardinha.

TABELA 1. - Espécies de Peixes Relacionados à Intoxicação  
por Histamina

| NOMENCLATURA                |                       |                            |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| CIENTIFICA                  | VULGAR                |                            |
|                             | INGLÊS                | PORTUGUÊS                  |
| <u>Auxis thazard</u> *      | Frigate Macherel      | Bonito cachorro            |
| <u>Euthynnus affinis</u> *  | Little Tuna           | Bonito                     |
| <u>Katsuwonus pelamis</u> * | Skipjack Tuna         | Bonito de barriga-listrada |
| <u>Makaira mazara</u>       | Bleak Marlin          | Marlin negro               |
| <u>Scomber scombrus</u>     | Macherel              | Cavala * *                 |
| <u>Thrachurus japonicus</u> | Horse Macherel        | Cavala                     |
| <u>Thunnus alalunga</u>     | Albacore              | Albacora                   |
| <u>Thunnus albacore</u>     | Yellowfin Tuna        | Albacora-de-lage           |
| <u>Thunnus maccoyii</u>     | Southern Bluefin Tuna | Atum                       |
| <u>Xiphias gladius</u>      | Swordfish             | Peixe espada               |

Fonte: Taylor, S.L., 1985. \* - Família Scombridae

\* \* - Cavalinha (no Brasil).

Nos Estados Unidos, o dourado (Coryphaena hippus) é o peixe não-escombrideo mais comumente implicado em casos de intoxicação por histamina. No Canadá tem ocorrido, com frequência, incidentes de intoxicação por histamina causada pelo consumo de mahi-mahi. No Japão ocorreu um episódio envolvendo dourado e vários outros envolvendo marlin, sardinha, cavala e anchova. A sardinha é uma espécie responsável por incidentes de intoxicação em vários países, inclusive na República Federal da Alemanha e Inglaterra (Taylor, 1985).

Ababouch et alii (1986), no Marrocos, analisaram os níveis de histamina em 248 amostras de peixe processados comercialmente, consistindo de sardinha, cavala e atum. A maioria das amostras (85,5%) apresentou baixos níveis de histamina ( $<10\text{mg}/100\text{g}$ ); 26 amostras (10,5%) apresentaram níveis dentro do limite ( $10\text{mg}-50\text{mg}/100\text{g}$ ) e 10 amostras (4%), apresentaram níveis significativamente tóxicos, acima de  $50\text{mg}/100\text{g}$ . O atum foi mais suscetível ao desenvolvimento de histamina em comparação com a sardinha e a cavala 7% ; as amostras de atum continham níveis acima de  $50\text{mg}/100\text{g}$  contra 3,7% e 3,2% de sardinha e cavala, respectivamente.

Em pesquisa feita na Espanha por Salgueiro e Mackie (1987a), sobre os níveis de histamina em 32 amostras de enlatados de atum, cavala e sardinha, foi constatado que todas as amostras analisadas apresentavam concentrações de histamina abaixo de  $0,5\text{mg}/100\text{g}$

Esses mesmos autores (1987b), analisando amostras de

filés e peixes inteiros de hadoque (Melanogrammus aeglefinus) e arenque (Clupea harengus), obtiveram os seguintes resultados: os filés de hadoque deterioraram-se mais rapidamente do que o peixe inteiro quando estocados em gelo e a 5°C, ocorrendo o inverso com o arenque, onde o peixe inteiro sofreu deterioração mais rápida do que os filés. Além disso, foi observado uma maior produção de histamina em arenque, como esperado para espécies pelágicas com altas concentrações "in-vivo" de histidina livre utilizável pela bactéria que produz a histidina descarboxilase. O limite recomendado para o controle de qualidade para histamina em peixes pelágicos é menor que 5mg/100g, conforme proposto por Murray et alii, citados por Salgueiro & Mackie (1987b), havendo uma grande possibilidade dessa concentração ser excedida, próximo ao fim da vida de prateleira do produto (8 dias a 0°C ou 5 dias a 5°C).

Em levantamento feito por Pan et alii (1986), sobre os teores de histamina em produtos enlatados atunídeos, são citadas diferentes concentrações de histamina nas amostras analisadas. Estas pesquisas conduzidas em Taiwan, com 92 amostras de atum, 230 amostras de bonito e 48 amostras de cavala, mostraram que 6,5%; 33,5% e 16,0% das amostras, respectivamente, apresentaram níveis de histamina acima de 100mg/100g.

Pesquisas realizadas na Holanda em 1981, com 22 amostras de cavalinha, 23 de atum e 30 de sardinha, revelaram que 4,5%; 8,7% e 10,0% das respectivas amostras excederam o nível de 100mg/100g. (Pan, 1985).

Eitenmiller et alii (1982), constataram que em filés de atum inoculados com Proteus morganii, os níveis de histamina alcançavam valores de 43,7mg, 520mg e 608mg/100g de amostra após 48 horas, mantidas a 15°C, 24°C e 30 C°, respectivamente.

Leitão et alii (1983), inocularam Proteus morganii em homogeneizado de tecido muscular de cavalinha, não constatando produção de histamina a 7°C durante 7 dias, enquanto que a 25°C foi atingido um nível de 90mg/100g, em 24h. A ocorrência de histamina em enlatados de peixe indica uma deficiência crítica no processamento, geralmente relacionada com a manutenção das matérias-primas em temperaturas acima de 15°C. Assim, para garantir a qualidade de produtos processados é de importância vital garantir a continuidade da cadeia de refrigeração nas várias etapas de produção, desde a captura, transporte e recepção na indústria, até a obtenção do produto final (Leitão, 1983).

Na Tabela 2 apresentam-se alguns níveis de histamina em pescado enlatado.

TABELA 2. - Níveis de Histamina (HM) em Enlatados de Peixes

| ESPÉCIE  | VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO<br>DE HM (mg/100g) | MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO<br>DE HM (mg/100g) |
|----------|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| albacora | 0,66-2,21                                   | 1,45                                     |
| atum     | 1,60-7,41                                   | 3,46                                     |
| bonito   | 1,30-4,50                                   | 2,35                                     |
| cavala   | 1,20-4,50                                   | 2,25                                     |
| sardinha | 0,31-1,38                                   | 0,79                                     |

Fonte: Leitão et alii (1983).

Quanto ao pescado fermentado, um relato da Finlândia indica que o arenque mostrou um alto teor de histamina. Por alguma razão, o arenque salgado parece mais propício a conter altos níveis de histamina que o arenque enlatado. Esse tipo de arenque é um produto fermentado que frequentemente possui altos níveis de histamina, mas que não tem sido implicado em casos de intoxicação. Talvez isso possa ser explicado pela falta de potenciadores do envenenamento por histamina. Produtos fermentados, contendo altos níveis de histamina, poderiam possivelmente apresentar um alto risco para o consumidor, portanto, mais pesquisas são necessárias para definir os limites do nível de histamina permitido em produtos de peixes fermentados (Taylor, 1985).

No Brasil, Leitão *et alii* (1983) avaliaram os teores de histamina e histidina livre em amostras "in natura" de atum, bonito de barriga listrada, cavalinha, sardinha, pescada, corvina, cação e camarão-sete-barbas. As amostras de pescados recém desembarcadas apresentaram níveis de histamina relativamente baixos e altos níveis de histidina.

## 2.5 - MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA.

### 2.5.1 - MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS

Até há bem pouco tempo a fluorimetria, método desenvolvido por Shore (1959), era indiscutivelmente o método químico mais promissor para análise quantitativa de histamina, por ter maior sensibilidade e especificidade que o método colorimétrico do DNFB (2,4-dinitrofluorbenzeno) até então utilizado. O autor observou que o o-ftalaldeído (OPT) poderia se condensar com a histamina, sob condições extremamente alcalinas, formando um produto cujo espectro de ativação apresenta um pico máximo a 350nm e um espectro fluorescente com um pico máximo a 450nm. Ele encontrou que a intensidade de fluorescência era proporcional à concentração de histamina na faixa de 0,005 a 0,5µg/ml. Compostos como amônia, histidina e peptídeos não interferem na reação, sempre que forem eliminados antes da condensação com o OPT.

A histamina reage com (OPT) em pH alcalino originando produtos fluorescentes. A reação da histamina com o OPT envolve inicialmente uma reação de condensação, seguida pela acidificação com ácido sulfúrico (pH 2 a 5), que aumenta e estabiliza a fluorescência do complexo por 20 horas. Foi sugerido que a condensação com o OPT poderia ser conduzida a 0°C, por 40 minutos

em pH 12,5. Este procedimento triplicou a intensidade de fluorescência, permitiu a determinação de uma quantidade mínima de 2ng/ml de histamina e uma melhor reprodutibilidade (Hakanson *et alii*, 1972). Numerosos compostos tais como espermidina, arginina glutatona, histidina e peptídeos com NH<sub>2</sub>-terminal da histidina também reagem e podem ser detectados fluorimetricamente após a reação com OPT. Desses compostos, em particular, a espermidina é o que mais interfere na reação.

Os métodos fluorimétricos para ensaios de histamina têm sido aperfeiçoados pela introdução de modificações nas condições de reação. Hakanson *et alii* (1974), observaram que a condensação da histamina com OPT, realizada em pH 12,5 a -20°C por 10 horas, aumentava a sensibilidade e especificidade do método. A concentração mínima de histamina detectada na amostra é de 1 ng/ml. A reprodutibilidade do método mostrou um coeficiente de variação de 1%. A recuperação dos padrões (5µl-50µl), se situou na faixa de 75% a 85%. Os compostos interferentes como a espermidina, conhecida por interferir no ensaio convencional, não apresentam nenhuma fluorescência tornando, assim, desnecessária a utilização do teste que distingue a histamina da espermidina.

Lerke & Bell (1976), desenvolveram um método fluorimétrico para determinação de histamina em enlatados de atum. O procedimento é similar ao método da A.O.A.C, exceto quanto ao uso do metanol que foi substituído por solução de ácido tricloroacético a 10% e da resina de troca aniônica substituída por

uma resina catiônica. Uma combinação de técnicas de extração, purificação e detecção foram adaptadas e modificadas para assegurar rapidez, exatidão e reprodutibilidade do método. A recuperação dos padrões foi determinada em soluções de ácido tricloroacético a 10%. A recuperação, para níveis de histamina adicionada de 5mg e 30mg/100g de amostra, ficou entre 98% e 103% e para níveis de 100mg/100g (histamina adicionada ao extrato de peixe em decomposição) e a recuperação esteve entre 94% e 101%. A reprodutibilidade foi boa, com coeficiente de variação de 1%. X

Taylor & Lieber (1977), estudaram seis métodos fluorimétricos e um espectrofotométrico para detectar histamina em alimentos. Os métodos, descritos a seguir, foram comparados com base em dois critérios: especificidade e sensibilidade.

- Método 1. A reação desenvolvida por Shore (1959), baseada no uso o-ftalaldeído e determinação fluorimétrica, foi utilizada sem modificações. As medidas de fluorescência dos derivados foram realizadas nos comprimentos de excitação de 360nm e de emissão de 450nm. Os processos de extração e purificação são os mesmos descritos no método proposto por Shore (1959).

- Método 2. Método fluorimétrico modificado por Hakanson & Rönnberg (1974), o qual requer um tempo de reação de 10 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em pH 12,5.

- Método 3. Método de Roth (1971), que utiliza como reagente fluorimétrico, uma mistura de mercaptanoetanol e OPT, em condições de reações descritas por Taylor & Tappel (1973). O pH ótimo para o

desenvolvimento do fluorocromo com histamina foi 10,5. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram fixados em 340nm e 450nm respectivamente.

- Método 4. Método fluorimétrico originalmente desenvolvido para detectar lisina (Roth & Jeanneret, 1972), o qual está baseado no o-diacetilbenzeno como reagente fluorimétrico. O pH ótimo de reação foi 10. As medidas da fluorescência dos produtos foram 362nm para excitação e 450nm para emissão.

- Método 5. Método desenvolvido por Udenfriend *et alii* (1972), para análise de aminas, baseado no uso da fluorescamina, em condições de pH ótimo de reação de 8,5 (solução tampão de borato de sódio). A fluorescência do composto derivado foi medida a 390nm (excitação) e 470nm (emissão).

- Método 6. Fundamentado no uso do reagente 7-cloro-4-nitrobenzeno-2-oxal-1,3-diazole (NBD-Cl), para análise de aminas (Anonymous, 1971). As medidas de fluorescência foram realizadas nos comprimentos de onda de 475nm e 528nm para excitação e emissão, respectivamente.

- Método 7. Método espectrofotométrico para detectar aminas, baseado na reação da histamina com ninidrina com medidas realizadas no comprimento de onda de 570nm de absorbância.

Dos métodos descritos anteriormente, as principais conclusões foram : a) os métodos de 1 a 5, apresentaram relativa especificidade para dosar histamina em tecido animal, sendo que o método 1 apresentou maior sensibilidade para detectar histamina em alimentos; b) o método 4 mostrou menor interferência pela histidina e histidil dipeptídeos; c) os métodos 6 e 7 foram os menos

sensíveis. Assim, além da especificidade, a sensibilidade tem sido o maior problema no desenvolvimento de um método rápido e acurado para análise de histamina em alimentos.

Staruszkiewicz *et alii* (1977) , estudaram um método fluorimétrico com OPT para determinação de histamina em atum, utilizando uma resina de troca iônica para purificação total das amostras. A maior vantagem do método foi quanto à rapidez. A recuperação da histamina adicionada ao extrato foi de 90% a 83%, para níveis de 10mg e 100mg/100g, respectivamente. Uma das vantagens apontadas é a não utilização de técnica cromatográfica para separação da histamina de outras substâncias interferentes. A sensibilidade do método permite a quantificação da histamina em níveis acima de 10mg/100g de amostra.

Em trabalhos posteriores, Staruszkiewicz (1977), desenvolveu estudos colaborativos em diferentes laboratórios, com seis amostras de enlatados de atum, albacora, albacora-de-laje, e bonito em água e em óleo, para aperfeiçoamento do método fluorimétrico, descrito no parágrafo anterior. A recuperação da histamina adicionada foi, em média, de 90%. O autor assegura que a histamina é o melhor indicador químico da decomposição de atum antes do enlatamento. Isto torna o método de aplicação prática, por ser rápido, sensível e relativamente econômico. Em 1980, esse método foi adotado pela A.O.A.C como um dos métodos oficiais de análise de histamina em tecidos de peixe.

Taylor et alii (1978), descreveram um método analítico para determinação de histamina em alimentos que requer homogeneização da amostra em metanol, aquecimento, filtração ou centrifugação, várias extrações com solventes e, por fim, a detecção fluorimétrica do complexo histamina - OPT. O método elimina possíveis interferências por outras aminas, através de uma extração seletiva com n-butanol e hidróxido de sódio. O método pode ser utilizado para detectar histamina em alimentos que contém pouco mais que 0,02mg histamina/100g de amostra, com recuperação em torno de 106%.

Um sistema de fluxo automatizado, para extração e análise fluorimétrica da histamina em produtos de peixe, foi desenvolvido por Luten (1981). A amostra contendo histamina é ligada diretamente ao OPT, sem precipitação prévia das proteínas e sem o isolamento da histamina. A histamina adicionada em diferentes concentrações nas amostras de peixe homogeneizadas foi recuperada quantitativamente, com boa reprodutibilidade. O pré-tratamento das amostras é a etapa mais lenta e leva cerca de 15 minutos. O método pode ser muito útil para analisar um grande número de amostras de atum enlatado.

Udenfriend et alii (1972), desenvolveram um método fluorimétrico baseado no uso da fluorescamina, reagente usado na detecção de aminas primárias, num limite de picomoles. A reação ocorre quase que instantaneamente à temperatura ambiente, em meio

aquoso e pH 9, dando produtos altamente fluorescentes com excitação a 390nm e emissão a 475nm. A fluorescência do produto resultante é proporcional à concentração da amina e o composto fluorocromo é estável por várias horas. Uma das vantagens do uso da fluorescamina é que, comparativamente, pouca fluorescência é obtida com amônia. Esse reagente pode ser usado para detectar aminas não somente em soluções aquosas, mas também em solventes orgânicos e em sólidos.

#### 2.5.2 - MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Os primeiros métodos colorimétricos desenvolvidos para determinação quantitativa de histamina, ou envolvem uma reação de acoplamento da histamina com sais de diazônio, formando substâncias chamadas compostos azóicos de fórmula geral  $Ar-N \equiv N-Ar$ , ou uma reação da histamina com 2,4-dinitrofluorbenzeno (DNFB) (Code & McIntire, 1956).

Os méritos relativos de ambos os métodos podem ser assim resumidos : a estabilidade da cor dos produtos derivados da histamina com o DNFB é de grande conveniência. A determinação pode ser interrompido por um período de horas ou dias sem comprometer os resultados. Por outro lado, o método com sal de diazônio produz derivados coloridos instáveis, que sofrem decomposição em torno

de 7% nas primeiras horas. A estabilidade e a sensibilidade dos produtos derivados tornam o método com DNFB mais conveniente e satisfatório que o com sais de diazônio, particularmente quando estão sendo analisadas várias amostras simultaneamente. Resultados publicados indicam que, em termos de precisão, o método com sal de diazônio requer pelo menos cinco vezes mais a quantidade mínima de histamina que pode ser medida pelo método com DNFB. A natureza química e a estabilidade dos derivados do DNFB, permitem manipulação adicional na qual, em casos especiais, pode ser desejável uma maior especificidade; um exemplo é a utilização da técnica de cromatografia em papel para identificação qualitativa e quantitativa de algumas amostras.

A margem de erro apresentada pelo método com DNFB está entre 5% a 7%, incluindo as etapas de purificação e ensaio. A quantidade mínima de histamina detectada é de 0,5µg/ml a 10µg/ml. A recuperação da histamina nos extratos de n-butanol está em torno de 94% a 95%. (Code & McIntire, 1956).

Sager & Horwitz (1957), desenvolveram um método colorimétrico para dosagem de histamina em carne de atum, que é basicamente uma modificação e adaptação do método desenvolvido pela Food And Drug Administration (F.D.A), para determinação de histamina em estreptomicina.

O método foi dividido em cinco etapas :a) extração da histamina do tecido do peixe, utilizando metanol como solvente; b) purificação da histamina, que reage com benzaldeído em meio alcalino, formando uma base de Schiff, que é extraída com uma

mistura de benzeno\ n-butanol e purificada em coluna de troca iônica; c) o eluído, histamina purificada, é ligada ao reagente diazotizado P-nitroanilina em pH controlado (8,6), para dar um complexo colorido; d) o complexo resultante histamina p-nitroanilina é purificado e estabilizado pela extração com metil-isobutil-cetona e lavado com solução tampão de barbitol em pH 7,7; e) a leitura de absorbância do complexo é feita em espectrofotômetro a 475nm.

Ota (1958), citado por Arnold *et alii* (1978), sugeriu uma modificação para o método colorimétrico citado anteriormente, que consiste na extração do complexo colorido histamina-diazocomposto, utilizando solventes orgânicos. Com esse procedimento, todas as substâncias interferentes foram removidas, inclusive a histidina. Essa modificação foi questionada posteriormente por Tsuda *et alii*, também citado por Arnold *et alii* (1978). Esses autores sugeriram o uso da cromatografia de troca iônica como uma alternativa para separar os compostos interferentes, baseada na extração do complexo colorido de histamina com um diazo composto.

Kabata *et alii* (1960), segundo Arnold *et alii* (1978), relataram um método rápido e simples para determinação de histamina em amostras de peixe, baseado na reação de acoplamento da histamina com sal de diazônio. Utilizaram resina de troca catiônica para separar a histamina de outras substâncias interferentes, incluindo a histidina. Aliquotas do eluído (histamina) se ligava ao reagente

de Pauly, formando um complexo colorido que foi lido no espectrofotômetro a 510nm. A recuperação do padrão adicionado aos extratos foi de 99% a 101%. A coluna utilizada na separação dos interferentes apresentou alta capacidade de resolução para histamina.

A histidina ocorre na natureza na forma livre ou combinada. Portanto, para estudá-la em suas várias formas é necessário um método sensível e específico. Newman & Turnbull (1960), propuseram um método quantitativo para análise de histamina e histidina, baseado na reação com iodo ( $KI_2$ ) e posterior complexação com piridina em pH de 11 a 12, na qual uma cor violeta é formada. O método pode ser usado para detectar histamina em soluções contendo de 1  $\mu g$  a 60  $\mu g$  / ml. A reprodutibilidade e a recuperação, sob as condições propostas pelos autores, foram satisfatórias. O mecanismo dessa reação ainda não está bem esclarecido.

Williams (1960), realizou estudos detalhados sobre o método colorimétrico desenvolvido por Sager & Horwitz (1957), introduzindo mudanças no procedimento de desenvolvimento da cor do complexo, proporcionando maior estabilidade e leituras mais precisas. Numa série de experimentos, nos quais foram estudados, a quantidade de reagente, a ordem de sua adição, o efeito do pH e do tempo, o autor concluiu que o pH inicial de 8,3 a 8,6 dá mais uniformidade no desenvolvimento da cor e que esta faixa de pH poderia ser prontamente estabelecida pela adição de 1 ml de solução

tampão pH 10,9 , seguida pela adição de 0,5ml do reagente sal de diazônio. A intensidade da cor final foi aumentada e estabilizada pela adição de álcool.

Um método colorimétrico mais simples para determinação de histamina em carne de cavala deteriorada e estocada à temperatura ambiente, foi desenvolvido por Hardy e Smith (1976). A técnica de cromatografia em papel foi utilizada para confirmar a presença de histamina nas soluções de ácido tricloroacético (TCA) a 2,5%. A determinação quantitativa de histamina presente nos extratos de TCA foi conduzida através da reação com sal de diazônio (p-bromoanilina). Como outras substâncias existentes no extrato reagem com o sal de diazônio, se fez necessário o uso de uma coluna de troca iônica para remoção dos interferentes. As aminas de cadeia longa, cadaverina e putrescina, não interferem na reação. O desenvolvimento desse método é relativamente simples, sendo que o grau de dificuldade apresentado é quase equivalente ao procedimento fluorimétrico da A.O.A.C.

### 2.5.3 - METODOS CROMATOGRÁFICOS.

A histamina também tem sido quantificada por técnicas cromatográficas, usualmente cromatografia em papel (CP), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida gasosa (CLG).

Foo, (1976), através da cromatografia em papel, identificou e isolou a ''saurina''(sal da histamina) em amostras de peixe envolvidos em casos de intoxicação por alimentos, empregando três sistemas de solventes: a) n-butanol-ácido acético-água (4:2:1); b) t-butanol-ácido acético-água (3:1:1) e c) etanol-solução de amônia-água (80:5:15). Os extratos que continham as amostras de peixe deteriorado apresentaram duas manchas, quando cromatografados com os solventes a e b, e apenas uma quando cromatografados com o solvente c.

Schwartzman (1973), descreveu um método de cromatografia em camada delgada para separação e quantificação de histamina, metilhistamina, acetilhistamina, ácido-metilimidazolacético, e ácido-imidazolacético, usando um sistema de separação constituído de n-butanol-ácido acético glacial-água (60:22:23). Na visualização das manchas das aminas separadas, foram produzidos compostos fluorescentes com as cinco aminas detectadas quantitativamente por absorção ou fluorescência. Essas aminas, depois de expostas aos vapores de iodo, foram aquecidas, produzindo compostos fluorescentes mais estáveis e quantificados ''a níveis de  $\mu\text{g}$  ''.

Para detectar histamina em produtos de peixe, um método rápido e conveniente foi desenvolvido por Schutz et alii (1976). As amostras dos sucos prensados ou de peixe fresco foram aplicadas diretamente nas placas de sílica gel, desenvolvidas em acetona-hidróxido de amônio (95:5) e as manchas visualizadas com ninidrina ou com o reagente de Pauly. Este último foi escolhido por

apresentar desenvolvimento de cor mais rapidamente e estável. Níveis máximos de 2,5mg histamina/100g são prontamente detectados. O complexo de histidina formado, devido sua pouca mobilidade frente ao eluente é claramente separado da histamina.

Baseados no fato, de que a reação da fluorescamina em placas de sílica gel com compostos que apresentam grupos aminos primários é lenta, Nakamura & Pisano (1976), desenvolveram uma técnica com alta eficiência sem utilizar a etapa de extração, para eliminar interferentes (aminoácidos, peptídios, etc). Algumas aminas, como a  $\beta$ -naftilamina, não podem ser detectadas seguindo esse procedimento porque são extraídas pela fluorescamina. Peptídeos, proteínas e muitas aminas de interesse biológico (histamina) foram detectadas a níveis de 10 picomoles, o qual se aproxima da sensibilidade previamente reportada por outros autores.

Lin *et alii* (1977), desenvolveram um método cromatográfico (CCD) para avaliar o teor de histamina em atum. As amostras de peixe foram tratadas com metanol, o extrato foi filtrado, aquecido por 15 min a 60°C em banho-maria e aplicado nas placas. As placas foram desenvolvidas em metanol-hidróxido de amônio (20:1) e as manchas reveladas com solução de ninidrina. A quantificação da histamina foi realizada através de um densitômetro. A sensibilidade do método foi de 0,1µg/ml. Visto que a histamina foi bem separada dos outros constituintes, o método não requer purificação preliminar dos extratos em coluna.

Uma nova reação fluorogênica específica para histamina, histidina, histidil peptídeos e compostos derivados do imidazol, com a fluorescamina, reagente fluorogênico potente para aminas primárias (Udenfriend *et alii*, 1972), foi reportada por Nakamura (1977). A técnica utilizada foi a cromatografia de camada delgada sendo o método sensível na faixa de 4 a 60 picomoles. Após a reação com a fluorescamina e a conversão em diferentes produtos fluorescentes, pelo aquecimento em meio ácido e posterior separação em de sílica gel, houve notável melhora na sensibilidade do método. Além disso, o método é específico para 2-(4-imidazol) e etilaminas, sendo que compostos aromáticos não interferem na reação.

Uma técnica de cromatografia em papel, simples e rápida para determinação simultânea de histamina e histidina foi descrita por Foo, (1977). O método baseia-se na reação da histamina ou histidina com o reagente cádmio-ninidrina, formando um complexo de cor rosa. O sistema de solvente utilizado foi o 2-metil-2-propanol - metil etil cetona - solução de amônia - água (50+30+10+10). O método é sensível na faixa de 0,5 a 30 µg/ml, e apresentou uma recuperação de 100% de histamina e 90% de histidina.

Lieber & Taylor (1978a), testaram a habilidade de doze sistemas de solventes para separar histamina e histidina em uma variedade de métodos por CCD e concluíram que os melhores foram: clorofórmio-metanol-amônia (2:2:1), metanol-amônia (20:1); acetona-amônia (95:5), e desenvolvimento duplo com n-butanol-acetona-água (2:2:1) e clorofórmio-metanol-amônia

(12:7:1), todos em camada de sílica gel. A revelação das manchas foram feitas com ninidrina. Esses quatro sistemas foram avaliados e usados como procedimento rápido na detecção dos níveis de histamina em atum deteriorado. Os resultados indicaram que, no caso dos quatro sistemas, a histamina é bem separada das outras substâncias interferentes. Os sistemas clorofórmio-metanol-amônia, metanol-amônia e acetona-amônia, foram os mais promissores para a separação da histamina dos extratos de atum em placas de sílica gel.

Um outro estudo comparativo importante realizado por Liebert & Taylor (1978b), foi sobre a sensibilidade e a especificidade dos reagentes: ninidrina, o-ftalaldeído, fluorescamina e o-diacetilbenzeno, utilizados na visualização das manchas de histamina em CCD. Das 19 aminas testadas, além da histamina, 17 reagiram com ninidrina, 8 com fluorescamina e 15 com o-diacetilbenzeno. O reagente o-ftalaldeído foi considerado insatisfatório, devido à instabilidade das manchas fluorescentes formadas. A fluorescamina e o o-diacetilbenzeno ofereceram maior especificidade na resolução da mancha de histamina.

Staruszkiewiez & Bond (1981), estudaram um procedimento para determinação quantitativa de histamina, cadaverina e putrescina em tecidos de peixe por CGL. Estas substâncias foram analisadas na forma de pentaflúor propionil derivado (PFP). As aminas foram extraídas do tecido do peixe com metanol. A mistura de reação foi separada em coluna de alumina, para remover excessos de

reagentes, e os derivados eluídos com solução de acetato de etila em tolueno. O método não se mostrou eficiente na quantificação de histamina, podendo ser usado apenas qualitativamente.

Henion (1981), relatou um método analítico para determinação de histamina em atum, baseado na trimetilação daquela, utilizando uma coluna capilar de alta resolução para separar o composto derivado. O uso da cromatografia a gás acoplada ao espectrofotômetro de massa, apresentou vantagem quanto ao uso da coluna, o que reduziu o tempo de análise para 15 minutos, com melhor separação dos componentes em relação às colunas empacotadas. O autor concluiu que esta técnica minimiza os efeitos dos interferentes presentes em matrizes tão complexas.

Friedman & Noma (1981), investigaram a possibilidade do uso do analisador de aminoácidos, para medir histamina juntamente com os aminoácidos em infusões de atum. Este método oferece certas vantagens, pois as etapas de purificação e extração da histamina são desnecessárias, visto que a histamina pode ser medida na presença dos aminoácidos. Isso é particularmente importante na análise de alimentos deteriorados, devido à descarboxilação tanto da histidina como de outros aminoácidos. Uma outra vantagem é quanto a automação das análises, permitindo, após a hidrólise, o ensaio sequencial de, pelo menos, 80 amostras.

Wada *et alii* (1982), descreveram um método quantitativo para determinação de histamina em produtos marinhos, baseado na

técnica de CGL. A histamina foi extraída com ácido tricloroacético e isolada em coluna cromatográfica de troca iônica. A histamina foi convertida no derivado N<sup>α</sup>-heptafluorobutiril, através do anidrido heptafluorobutírico em acetato de etila. O método permitiu avaliar até 0,5mg/100g. A recuperação da histamina adicionada aos extratos de atum foi de 104% a 113%.

Através de um método rápido e reprodutível, Volk & Gemmer (1982) realizaram testes sobre o teor de histamina no tecido de atum, cavala e bonito por meio da cromatografia de pares iônicos. Neste método, a substância a ser analisada deve estar na forma iônica, em uma faixa de pH determinada (tampão fosfato pH 2,2) e acoplada reversivelmente com o reagente dodecilsulfonato de sódio. Pela adição de concentrações crescentes de acetonitrila à coluna, foi possível diminuir o tempo de retenção da histamina, e assim, separar a amostra da matriz protéica. Para determinação da histamina foi utilizado um detector ultravioleta, a 208nm. O limite de detecção foi de 2mg/100g e o tempo de análise de 30 minutos. A reprodutibilidade do método foi boa e a recuperação de 67% a 81%.

Walters (1984), desenvolveu um sistema de cromatografia líquida (CL), usando uma coluna de troca catiônica para dosagem de histamina. O método requer extração simples da amostra antes da introdução no sistema CL. Devido a sua rapidez, especificidade e sensibilidade, essa técnica foi proposta como uma possível alternativa para o método oficial da A.O.A.C. O limite de

detecção do método é de 1,5 ng/100g. A média de histamina recuperada foi em torno de 98,4%, com desvio-padrão relativo de 2,18%.

Gouygou (1987), determinou níveis de histamina utilizando CLAE em extratos de ácido tricloroacético, após reação com o-ftalaldeído. A fluorescência dos produtos derivados foi monitorada em 350nm para excitação e 450nm para emissão, após eluição com água contendo acetonitrila a 40%. A vantagem do método está na rapidez de execução das análises, devido à eliminação da etapa de extração seletiva. As substâncias interferentes foram facilmente separadas do derivado da histamina. A recuperação foi de 94,2 %.

Os resultados das determinações de aminas biogênicas efetuadas em amostras de jurel (Trachurus symmetricus murphyl) e sardinha, sob diferentes condições de armazenamento, foram apresentados por Bostock et alii (1989). As aminas foram detectadas através do método de CLAE, acoplado a um detector ultravioleta a 254nm. Os produtos derivados foram preparados com cloreto de dansila (1-clorosulfonilo-5-dimetilamino naftaleno), e separados através de uma coluna C8.

Um método combinando as técnicas cromatográficas por CCD e CLAE foi desenvolvido para analisar histamina em tecidos de atum (Costa & González, 1989). O cromatógrafo foi acoplado a um detector de fluorescência com excitação a 358nm e emissão a 447nm. O sistema

de solvente usado para o desenvolvimento das placas foi metanol-hidróxido de amônio (4:1) e o reagente revelador das manchas de histamina, foi a nitroanilina dissolvida em HCl 0,1N.

A técnica por CCD assegurou a eliminação dos interferentes presentes no extrato, enquanto a CLAE permitiu a quantificação da histamina em menores concentrações e com maior exatidão.

### 3 - PARTE EXPERIMENTAL.

#### 3.1. - MATERIAIS.

##### 3.1.1. - AMOSTRAS DE PEIXES ENLATADOS.

As amostras utilizadas nesta pesquisa constaram de amostras comerciais de peixes, enlatados originários do Brasil, Chile e Perú, e adquiridas no comércio local no decorrer do trabalho. As amostras, todas em óleo comestível, foram agrupadas em função da espécie (atum, bonito e sardinha), da forma de preparo (sólido ou "grated") e da procedência (nacional e importado), como segue:

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| Grupo A: 15 latas de atum sólido,     | nacionais  |
| Grupo B: 5 latas de atum sólido,      | importadas |
| Grupo C: 5 latas de atum "grated",    | nacionais  |
| Grupo D: 5 latas de bonito sólido,    | nacionais  |
| Grupo E: 5 latas de bonito "grated";  | nacionais  |
| Grupo F: 5 latas de bonito "grated",  | importadas |
| Grupo G: 8 latas de sardinha, sólida, | nacionais  |
| Grupo H: 5 latas de sardinha, sólida, | temperada, |
| nacionais.                            |            |

### 3.1.2. - REAGENTES E SOLUÇÕES

- Alcool butílico (n-butanol) - p.a. Merck
- Alcool etílico - p.a. Ecibra
- Carbonato de sódio - p.a. Ecibra
- Clorofórmio - p.a. Merck
- Solução de ácido clorídrico 0,25N, 0,5N e 2,5%
- Solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBSO), 0,1% Sigma
- Solução de cloreto de sódio 20%
- Solução de hidróxido de potássio 50%
- Solução saturada de bicarbonato de sódio
- Solução saturada de carbonato de sódio
- Solução saturada de n-butanol
- Solução padrão (estoque) de dicloridrato de histamina (HM.2HCl), 0,2% em HCl 0,5N Sigma
- Tolueno - p.a. Merck
- Soluções de aminas, aminoácidos, diaminas e outras substâncias nitrogenadas, 0,1%
- AMINOÁCIDOS:
  - ácido aspártico Merck
  - ácido glutâmico Merck
  - alanina Merck
  - arginina.HCl Merck
  - cisteína.HCl.H<sub>2</sub>O Merck
  - fenilalanina Merck

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| glicina                               | Merck   |
| histidina.HCl.H <sub>2</sub> O        | Merck   |
| lisina.HCl                            | Merck   |
| prolina                               | Merck   |
| taurina                               | Merck   |
| triptofano                            | Merck   |
| <u>- AMINAS VOLÁTEIS:</u>             |         |
| cloreto de amônia                     | Merck   |
| trimetilamina.HCl                     | Merck   |
| <u>- BASES DE AMÔNIO QUATERNÁRIO:</u> |         |
| glicina - betaina                     | Aldrich |
| óxido de trimetilamina.2HCl           | Sigma   |
| <u>- BASES DE NUCLEOTÍDIOS:</u>       |         |
| adenina                               | Sigma   |
| guanina                               | Sigma   |
| inosina                               | Sigma   |
| <u>- DIAMINAS:</u>                    |         |
| cadaverina                            | Sigma   |
| espermidina                           | Sigma   |
| espermina                             | Sigma   |
| putrescina                            | Sigma   |
| <u>- DERIVADOS DA GUANIDINA:</u>      |         |
| creatina                              | Merck   |
| creatinina                            | Merck   |
| guanidina.HCl                         | Merck   |
| <u>- DIPEPTÍDIOS:</u>                 |         |
| carnosina (N-β-L-histidina)           | Sigma   |
| <u>- OUTROS:</u>                      |         |
| imidazol                              | Merck   |
| uréia                                 | Merck   |

### 3.1.3. - APARELHOS E EQUIPAMENTOS.

- Agitador de tubos, Tecnal - TE, 162
- Balança analítica, Mettler - AE, 120
- Balança semi-analítica, Mettler - P1000
- Banho-maria com controle de temperatura, Fanen, 120, potência 1,0 KW
- Centrífuga, Fanen, 216
- Digestor e destilador de nitrogênio (semi-micro)
- Espectrofotômetro, Micronal - B 295 II
- Espectrofotômetro infravermelho Perkin - Elmer, 1430
- Espectrofotômetro UV e VIS., DMS 100 - Intralab
- Estufa secadora /esterilizadora, Fanen, modelo 315-SE
- Micropipetas volumétricas - 50 $\mu$ l e 100 $\mu$ l
- Microseringa graduada - 25 $\mu$ l

### 3.2 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Considerando-se que a histamina existe apenas em concentrações a nível de traços, em relação às demais aminas (cadaverina, putrescina, etc) e outras substâncias nitrogenadas (amônia, dipeptídios, etc), presentes na fração solúvel do músculo dos peixes marinhos, houve a necessidade de um estudo minucioso, no sentido de removê-las dos extratos e obter uma extração quantitativa da histamina. Assim, foram realizadas extrações com água, ácido tricloroacético 10%, n-butanol em partição com meio aquoso do peixe, metanol e mistura de cloreto de sódio e ácido clorídrico para a escolha da melhor solução extratora.

Na fase da avaliação quantitativa foram realizados estudos preliminares revendo os métodos colorimétricos, buscando uma melhor adequação destes às nossas necessidades e condições de trabalho. Optou-se pelo desenvolvimento de um método colorimétrico devido a sua simplicidade, sensibilidade, precisão e economia.

Foram testados vários compostos que, em reação com a histamina, poderiam formar complexos coloridos, como a ninidrina complexada com cádmio, ninidrina complexada com cobre, iodo complexado com piridina, e o reagente de Pauly. Outro teste foi conduzido com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), reagente usado atualmente para quantificar lisina disponível em proteínas. (Kakade & Liener, 1969).

Após esses testes iniciais, concluiu-se que o TNBS apresentava potencial para o desenvolvimento do método colorimétrico, por reagir intensamente com grupos aminos primários. Assim, o trabalho passou a ser desenvolvido com a reação do TNBS, de forma a estudar, por etapas, a sua aplicação, visando a consolidação do método analítico descrito na Figura 11, e cuja base e aplicação foram avaliadas através de ensaios específicos em matriz de peixe.

FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA HISTAMINA

EXTRAÇÃO DA HISTAMINA DO TECIDO

Pesou-se 10g de amostra homogeneizada e adicionou-se 30ml de solução extratora (NaCl 20% / HCl 2,5%). Agitou-se por 1 minuto e levou-se ao banho-maria por 10 minutos a 70°C. Filtrou-se em papel de filtro comum.

↓  
PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO

Do filtrado pipetou-se uma aliquota de 20ml, adicionou-se 10ml de n-butanol saturado, 3ml de KOH 50% e 5g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; agitou-se por 5 minutos e centrifugou-se (3000rpm, por 10 minutos). Pipetou-se 8ml do sobrenadante, adicionou-se 3ml de HCl 0,5N e 5ml de clorofórmio, agitou-se por 2 minutos e deixou-se em repouso (2 minutos) para separação das fases.

↓  
REAÇÃO QUÍMICA ( FORMAÇÃO DO COMPLEXO TNBS-HM )

Pipetou-se 2ml da fase superior, adicionou-se 3ml de NaHCO<sub>3</sub>, (pH 9,3) e 1ml de TNBS 0,1%. Levou-se ao banho-maria por 5 minutos a 70°C para o desenvolvimento da cor.

↓  
EXTRAÇÃO DO COMPLEXO COLORIDO

Adicionou-se, nos próprios tubos de reação, 2ml de solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 ml da mistura tolueno/n-butanol 4:1 (v/v), agitou-se por 3 minutos, e deixou-se em repouso para separação das fases. Pipetou-se 4ml da fase superior (orgânica), adicionou-se 3ml de HCl 0,25N, 5ml de clorofórmio e agitou-se por 2 minutos.

↓  
AValiação ESPECTROFOTOMÉTRICA

Pipetou-se em tubos pequenos, 2ml da fase superior (ácida) e adicionou-se 0,5ml de álcool etílico, 0,5ml de N,N-dimetilformamida e 0,1ml de KOH 50%, agitando-se a cada adição. Após 5 minutos, efetuou-se a leitura a 420nm.

### 3.2.1- HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PEIXES

As latas de atum, bonito e sardinha foram abertas e o conteúdo total (peixe e líquido de enchimento), foi moído em homogeneizador de laboratório até que o material adquirisse consistência pastosa.

As amostras homogeneizadas foram colocadas em frascos de vidro e guardadas em geladeira para análise.

### 3.2.2 - EXTRAÇÃO DA HISTAMINA DO TECIDO DO PEIXE.

Pesou-se, em duplicata, 10g de amostra de peixe homogeneizado, em tubos de polipropileno de 60ml. Diluiu-se com 30ml de solução extratora contendo cloreto de sódio a 20% em ácido clorídrico 2,5% . Agitou-se manual e energicamente até completa desintegração dos tecidos e levou-se ao banho-maria a 70°C por 5 minutos, agitando-se ocasionalmente.

Após esse tempo, os tubos foram resfriados em água corrente e o conteúdo filtrado em papel de filtro comum, dando um volume em torno de 25ml.

Paralelamente, foram conduzidos dois ensaios com metanol e ácido tricloroacético 10%, para compararmos a eficiência das soluções na extração da histamina do tecido do peixe.

Pesou-se, em duplicatas, 10g de amostra de peixe (atum) homogeneizado, em quatro tubos de polipropileno de 60ml. Diluiu-se duas amostras com metanol e duas com ácido tricloroacético 10%. As etapas posteriores estão detalhadas na Figura 11.

### 3.2.3. - PURIFICAÇÃO DO EXTRATO

Em tubos de ensaio de 40ml, foram transferidos 20ml do extrato filtrado contendo histamina, acrescentando-se 10ml de n-butanol saturado com água, 3ml de hidróxido de potássio 50% e 5g de carbonato de sódio anidro. Misturou-se bem para liberar o gás formado, tampou-se, agitou-se manual e vigorosamente por 5 minutos e centrifugou-se por 10 minutos a 3000rpm.

Houve a separação de duas fases distintas: uma fase superior, orgânica (que continha histamina) e outra inferior, aquosa.

Da fase orgânica pipetou-se uma alíquota de 8ml em tubo de vidro de 30ml, adicionou-se 3ml de ácido clorídrico 0,5N, 5ml de clorofórmio, agitou-se por 2 minutos e deixou-se em repouso para separação das fases.

### 3.2.4. - REAÇÃO DA HISTAMINA (PRESENTE NOS EXTRATOS)

#### COM O TNBS

Em tubos de ensaio de 30ml, com tampa de rosca, adicionou-se 2ml da fase superior (ácida), 4ml de solução saturada de bicarbonato de sódio e 1ml do reagente TNBS. Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria, por 5 minutos a 70°C, para desenvolvimento da cor do complexo TNBS-HM e posteriormente resfriados.

### 3.2.5. - EXTRAÇÃO DO DERIVADO SULFONADO TNBS-HM

Nos tubos contendo o complexo TNBS-HM, adicionou-se 2ml de solução saturada de carbonato de sódio (pH 11) e 5ml da mistura tolueno-n-butanol 4:1 (v/v). Agitou-se por 3 minutos e deixou-se separar as fases. Ocasionalmente, a separação foi acelerada mediante centrifugação a 3000rpm. Após a centrifugação, pipetou-se 4ml da fase superior (tolueno-n-butanol) e agitou-se por 2 minutos com 3ml de solução de ácido clorídrico 0,25N e 5ml de clorofórmio. O derivado TNBS-HM estava presente na fase superior (ácida).

Em tubos de 25ml, pipetou-se 2ml da fase superior (ácida) 0,5ml de álcool etílico, 0,5ml de N,N-dimetilformamida e 0,1ml de hidróxido de potássio 50%, agitando-se a cada adição. Foi deixado em repouso por 5 minutos.

### 3.2.6. - AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMETRICA DO COMPLEXO TNBS-HM

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Micronal B 295 II a 420nm.

Os cálculos para histamina foram feitos subtraindo-se a absorbância do branco e calculando-se o teor de histamina no material, como segue:

$$\text{mg de histamina /100g de peixe} = \frac{\mu\text{g HM} \times F \times 100\text{g/10g} \times F_c}{1000}$$

$\mu\text{g HM} = \text{abs da amostra} \times \mu\text{g de histamina no padrão} / \text{abs do padrão}$

F = fator de diluição (F=5,27)

Fc = fator de conversão da histamina (0,604), uma vez que foi utilizada histamina na forma de dicloridrato de histamina (HM.2HCl).

Para os cálculos de concentração da histamina não foi utilizada a equação da reta ( $Y=0,008x + 0,000$ ), obtida da curva padrão, uma vez que a lei de Beer foi obedecida.

### 3.3 - ESTUDO DA REAÇÃO ENTRE O ÁCIDO 2,4,6-TRINITROBENZENO SULFÔNICO E HISTAMINA.

#### 3.3.1. - PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE HISTAMINA

*a - Solução estoque de histamina 0,2%.*

Pesou-se 0,2g de dicloridrato de histamina e diluiu-se a 100ml com solução de ácido clorídrico 0,5N.

*b - Padrões de histamina com 5µg, 10µg, 20µg, 30µg, 40µg e 50µg/ml de dicloridrato de histamina.*

Pipetou-se alíquotas de 0,25ml; 0,50ml; 1,0ml; 1,5ml; 2,0ml e 2,5ml da solução estoque de histamina em um balão de 100ml e completou-se o volume com solução de ácido clorídrico 0,25N.

#### 3.3.2 - REAÇÃO ENTRE TNBS E HISTAMINA

Dos padrões de histamina (5µg, 10µg, 20µg, 30µg, 40µg e 50µg/ml), foram pipetadas alíquotas de 1ml em duplicata, em tubos de ensaio de 30ml, com tampas de rosca; adicionou-se 4ml de

solução saturada de bicarbonato de sódio pH 9,3 e 1ml do reagente TNBS 0,1%; agitou-se e levou-se ao banho-maria por 5 minutos a 70°C para o desenvolvimento completo da reação e obtenção do composto colorido (cor amarelo brilhante). Procedeu-se, subsequentemente, à extração do derivado TNBS-HM, empregando-se 2ml de uma solução saturada de carbonato de sódio (pH 11) e 5ml da mistura de tolueno/n-butanol 4:1 (v/v); agitou-se por 3 minutos. Deixou-se em repouso para separação das fases.

Da fase superior, orgânica, pipetou-se uma alíquota de 4ml, adicionou-se 3ml de ácido clorídrico 0,25N, 5ml de clorofórmio e agitou-se por 2 minutos. Após repouso e separação das fases, pipetou-se uma alíquota de 2ml da fase superior, acrescentou-se 0,5ml de álcool etílico, 0,5ml de N,N-dimetilformamida e 0,1ml de hidróxido de potássio 50% .

Esperou-se 5 minutos e procedeu-se à leitura da absorbância a 420nm.

O branco foi preparado similarmente, excluindo-se apenas o padrão de histamina, que foi substituído por ácido clorídrico 0,25N.

Os valores de absorbância versus concentração de histamina ( $\mu\text{g/ml}$ ) foram lançados em gráfico, para a elaboração da curva padrão.

### 3.3.2.1 - OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO DO COMPLEXO TNBS-HM

Foram obtidas duas curvas padrão através de dois procedimentos distintos, a fim de verificar possíveis perdas de histamina nas diversas etapas da metodologia. Assim, foi obtida uma curva padrão a partir da reação com TNBS e outra curva submetendo-se as soluções padrões às etapas anteriores de extração e purificação (partição com n-butanol).

### 3.3.2.2 - ESTUDO DO pH ÓTIMO E DO TEMPO DE REAÇÃO

A partir das soluções padrões de histamina com concentrações de 5µg, 10µg, 20µg e 40µg/ml, foi realizado o estudo do pH ideal para reação do TNBS com a histamina, na faixa de pH de 8,0 a 11,0, a intervalos de 0,5 unidades. O procedimento seguido para a condução desse experimento foi idêntico ao do item 3.3.2, exceto quanto ao uso do tampão carbonato / bicarbonato de sódio (pH 11,9). Os pH desejados foram ajustados pela adição de gotas de solução de ácido clorídrico. O estudo foi conduzido sob duas condições de tempo e temperatura: a) temperatura ambiente, nos tempos de 2 a 10 minutos (intervalo de 2 minutos), 22, 30 e 60 minutos; b) temperatura de 70°C, no tempo de 5 minutos.

Após a escolha do pH ideal, baseado na absorção máxima e linearidade das leituras, realizou-se um estudo para avaliar o tempo de reação a 1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos. Para efeito de comparação, as leituras de absorbância foram realizadas tanto na fase orgânica (tolueno/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), quanto na fase ácida (tolueno/ $\text{HCl}$ ).

#### 3.3.2.3 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DO COMPLEXO TNBS-HM

Os espectros no ultravioleta, foram realizados em fase líquida ( $\text{HCl}$ ), através de um espectrofotômetro UV e VIS, DMS.

#### 3.3.2.4 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPLEXO TNBS-HM

Os espectros no infravermelho, para comprovação do composto TNBS-HM, foram realizados em fase sólida ( $\text{KBr}$ ), através de um espectrofotômetro infravermelho Perkin Elmer.

#### 3.3.3. - REAÇÃO ENTRE TNBS E HISTAMINA, EM PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS NITROGENADAS DE OCORRÊNCIA COMUM EM PESCADOS

Soluções padrão de histamina com  $50\mu\text{g/ml}$  foram adicionadas a cada uma das soluções contendo as substâncias nitrogenadas com concentração de  $100\mu\text{g/ml}$ , mencionadas no item

3.1.2. A mistura foi submetida a uma sequência de etapas detalhadas na Figura 11, registrando-se os valores de absorbância para verificar o nível de interferência de cada substância na avaliação da histamina.

#### 3.4. - ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE PADRÕES DE HISTAMINA ADICIONADOS NAS AMOSTRAS DE PEIXE.

O estudo da recuperação de histamina foi realizado empregando-se a sequência completa do método descrito na Figura 11. Os peixe, atum e bonito, foram provenientes de enlatados, preparando-se quatro amostras de cada.

Em tubos de ensaio de 75ml pesou-se 10g de amostra, que foram homogeneizadas, adicionando-se, com auxílio de micropipeta, alíquotas de 12,5 $\mu$ l, 25 $\mu$ l, 50 $\mu$ l e 100 $\mu$ l da solução estoque de histamina (2mg/ml), para dar concentrações finais de 0,25mg; 0,50mg; 1,00mg e 2,00mg/100g. Após a adição dos padrões, as amostras foram analisadas simultaneamente com as amostras sem adição de padrões. Para controle, preparou-se uma série de tubos contendo somente a solução extratora com os respectivos padrões.

Os dados de absorbância foram lançados em gráfico e processados estatisticamente através do cálculo do desvio-padrão, para avaliar a porcentagem de recuperação em função da concentração de histamina adicionada às amostras.

Para calcular a recuperação dos padrões, foi necessário determinar a umidade das amostras homogeneizadas. Assim, pesou-se 5g de amostra que foi secada em estufa a 105°C, até peso constante. Os resultados foram expressos em g de umidade/100g, (Horwitz, 1975).

### 3.5. - AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE ANALÍTICA.

Para avaliar a precisão do método, testou-se três amostras de atum (A1,A2,A3) e três de bonito (B1,B2,B3); de cada amostra foram preparados 10 extratos para análises posteriores.

As etapas de purificação dos extratos, formação e purificação do complexo TBNS-HM, e determinação espectrofotométrica seguiram os procedimentos descritos na Figura 11.

Com os resultados obtidos efetuou-se a análise estatística, obtendo-se o desvio-padrão e o coeficiente de variação, segundo Baccan et alii (1979).

### 3.6. - DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM ENLATADOS DE ATUM, BONITO E SARDINHA.

Essas análises foram realizadas seguindo-se todas as etapas do método descritas anteriormente, para estabelecer uma avaliação mais completa e segura do método desenvolvido.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

##### 4.1 - ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE HISTAMINA DO TECIDO DO PEIXE E POSTERIOR PURIFICAÇÃO.

###### 4.1.1 - EXTRAÇÃO DA HISTAMINA

Testou-se diversos meios para liberação e extração da histamina. Entre estes foi usado o metanol e o ácido tricloroacético 10% (Lerke & Bell, 1976), que têm se mostrado mais apropriados para a precipitação das proteínas (Code & McIntire, 1956). Em todos os casos onde têm sido empregados, como nos fluidos biológicos e nos tecidos musculares, a liberação da histamina é quase total. O material precipitado por esses reagentes pode ser removido por centrifugação ou filtração. Segundo os autores, os os fluidos sobrenadantes e os filtrados podem ser estocados à temperatura ambiente por um longo período de tempo, sem perda de histamina. Todavia, os resultados obtidos ( Tabela 3 ) mostram baixa recuperação para esses extratos.

Outras substâncias citadas em trabalhos (Taylor et alii, 1978), como sendo eficientes na extração da histamina são os sais, como NaCl e os ácidos como HCl. Assim, a partir de vários testes com misturas de soluções de NaCl e HCl, observou-se que a

mistura de ambos nas concentrações de 20% e 2,5%, respectivamente, permitiu a obtenção de excelentes resultados. A desproteinização com solução ácida e salina permite uma extração mais eficiente, aparentemente devido à dissociação da histamina ligada às estruturas celulares, promovida pelos efeitos dos ions  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  durante a extração. Isto permitiu uma recuperação dos padrões de 99,0%, enquanto que apenas 42,3% e 31,7% foram recuperados através da homogeneização em metanol e ácido tricloroacético, respectivamente, como mostra a Tabela 3.

TABELA 3 - Efeito das Soluções Extratoras na  
Recuperação de Histamina

| SOLUÇÃO<br>EXTRATORA            | HISTAMINA<br>DO ATUM<br>( $\mu\text{gHM}/10\text{g}$ ) | HISTAMINA<br>ADICIONADA<br>( $\mu\text{gHM}/10\text{g}$ ) | HISTAMINA<br>RECUPERADA<br>( $\mu\text{gHM}/10\text{g}$<br>de carne) | RECUPERAÇÃO<br>( % ) |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------|
| METANOL                         | 52,00                                                  | 50,00                                                     | 73,15                                                                | 42,3                 |
| ÁCIDO<br>TRICLOROACÉTICO<br>10% | 52,00                                                  | 50,00                                                     | 67,85                                                                | 31,7                 |
| NaCl 20%<br>+<br>HCl 2,5%       | 52,00                                                  | 50,00                                                     | 101,50                                                               | 99,0                 |

#### 4.1.2 - PURIFICAÇÃO DA HISTAMINA CONTIDA NO EXTRATO

DE NaCl 20% / HCl 2,5%

Para purificação dos extratos, dois caminhos podem ser seguidos: a) a purificação é acompanhada pela remoção ou destruição das substâncias interferentes; b) a purificação é acompanhada pela remoção da própria histamina, de forma mais específica, através da adsorção ou extração com solventes orgânicos ou pela combinação de ambos (Code & McIntire (1956)).

Neste trabalho utilizamos a técnica de extração da histamina com solventes orgânicos, nas etapas de pré-purificação do extrato e na purificação do complexo TNBS-HM.

O extrato em NaCl 20% / HCl 2,5% contendo a histamina, foi pré-purificado pela transferência da histamina para n-butanol, previamente alcalinizado com KOH 50% e solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Juntamente com a histamina, passam para o butanol outras substâncias, provavelmente todas as amins e poliaminas, além de traços de aminoácidos. As proteínas e peptídeos que não precipitam na extração preliminar, não são transferidos para o n-butanol e a maior parte dos aminoácidos livres permanecem na camada aquosa, formando os respectivos sais de potássio. Sager & Horwitz, (1957) e McIntire (1956), foram os primeiros a purificar histamina utilizando extração com álcool etílico e metanol respectivamente, em pH elevado, onde a histamina se encontra como base livre e os aminoácidos não estão dissociados dos sais de sódio. Por ser uma

base fraca, a solubilidade da histamina em água é favorecida, tornando-a mais solúvel em n-butanol, Figura 12.

A histamina e os vários interferentes dissolvidos no n-butanol são transferidos para o HCl 0,25N, onde é realizada a reação com TNBS, sob as condições detalhadas no capítulo referente ao desenvolvimento do método.

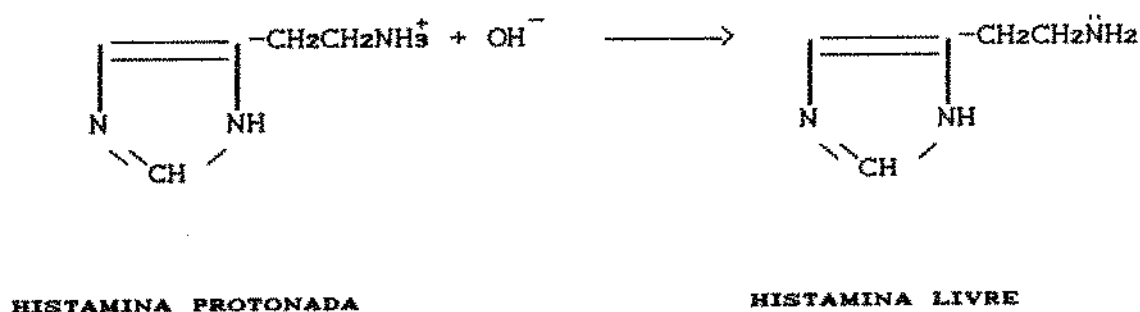


FIGURA 12 - Histamina como Base Livre.

Os derivados trinitrofenilados da histamina e das impurezas, que têm grupos NH<sub>2</sub> que se formam em meio alcalino, são então submetidos à partição com tolueno/n-butanol (4:1). Os complexos não ionizados com o TNBS-HM passam para a fase orgânica, permitindo mais uma purificação. Finalmente, na agitação da fase tolueno/n-butanol com HCl 0,25N, passam para a camada ácida somente aqueles derivados capazes de ionizar-se, como é o caso do TNBS-HM. Na camada orgânica são abandonados todos os derivados das mono, di e poliaminas, além do derivado da amônia.

#### 4.2 - ESTUDO DA REAÇÃO QUÍMICA ENTRE O ÁCIDO 2,4,6-TRINITROBENZENOSULFÔNICO E A HISTAMINA

O ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico reage com a histamina, em meio alcalino, através de um mecanismo de adição nucleofílica, formando o derivado Nα-2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico-histamina (Figura 13), onde o Nα refere-se ao nitrogênio β-etilamino.

No caso da reação entre TNBS e histamina, a adição nucleofílica ocorre com a perda de um próton do nitrogênio, que é captado pelo íon hidroxila, seguido da ligação do N ao S, formando assim, uma amida mono-substituída, que ainda possui um hidrogênio ligado ao nitrogênio, conferindo-lhe portanto, um caráter ácido.

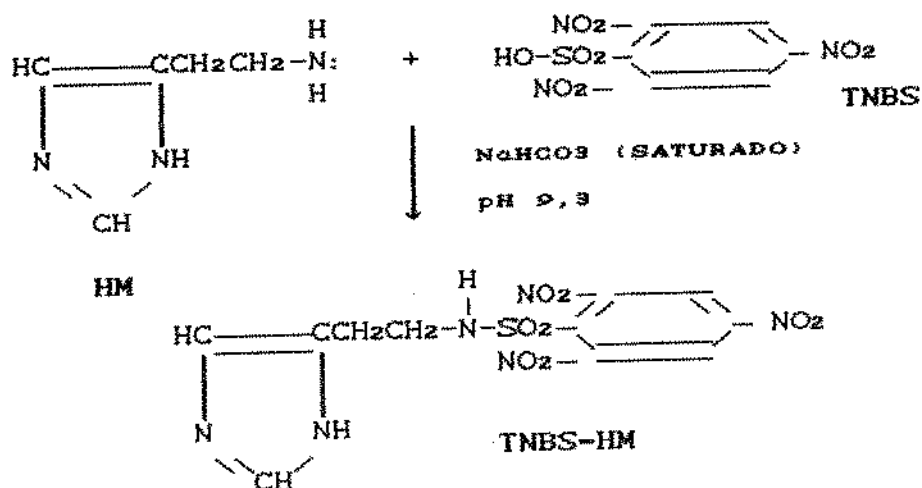


FIGURA 13 - Reação entre TNBS e Histamina, em meio Alcalino (pH 9,3), a 70°C, no Tempo de 5 minutos.

O TNBS não é um reagente específico para histamina. Ele foi desenvolvido por Okujama & Sotake (1960), como um reagente colorimétrico para quantificar aminas primárias e, na década de 70, foi utilizado por Kakade & Liener (1969), para determinação de lisina disponível em proteínas alimentares, como uma alternativa ao método de Carpenter (1960), por ser mais rápido e específico que o reagente 2,4-dinitrofluorbenzeno (DNFB). O TNBS também tem sido usado para modificar grupos aminos primários em uma variedade de proteínas, e quantificar aminas e peptídeos. (Habeeb, 1966; Freedman & Radda, 1968; Benjamin *et alii*, 1973; Burger, 1974).

Não existe na literatura científica nenhum estudo do uso ou reação do TNBS com a histamina. Partindo-se desse conhecimento e verificando-se a grande reatividade deste reagente por grupos amino, decidimos estudar a potencialidade de seu emprego num método analítico colorimétrico, para determinação da histamina em alimentos. A trinitrofenilação de grupos aminos é facilmente quantificada por espectrofotometria.

#### 4.2.1 - ESTUDO DO pH ÓTIMO E DO TEMPO DE REAÇÃO

Observou-se que a reação entre TNBS e histamina a temperatura ambiente e em pH 8,0, mostrou-se extremamente lenta, havendo inibição total da reação até 30 minutos. Com 60 minutos de reação houve um desenvolvimento de cor muito leve, registrando-se

valores de absorbância muito baixos: 0,010; 0,020; 0,040 e 0,080nm que correspondem às concentrações de 5 $\mu$ g, 10 $\mu$ g, 20 $\mu$ g e 40 $\mu$ g/ml, respectivamente.

Entre pH 9,0 e 9,5 (Tabelas 4 e 5 e Figuras 14 e 15 ), a reação ainda é lenta, ocorrendo formação do complexo TNBS-HM somente acima de 8 minutos de reação, sendo que até 60 minutos não foi observado um máximo de reação.

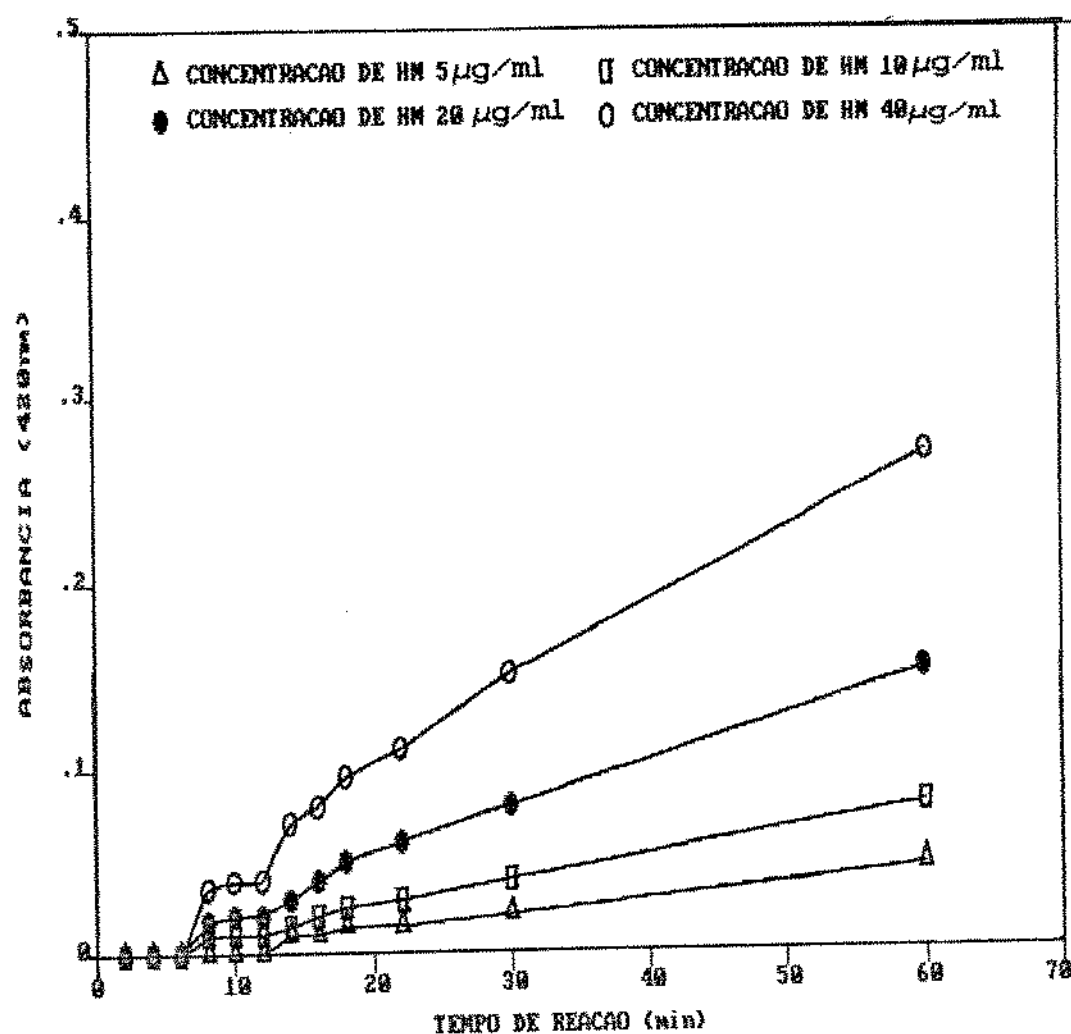


FIGURA 14. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9,0.

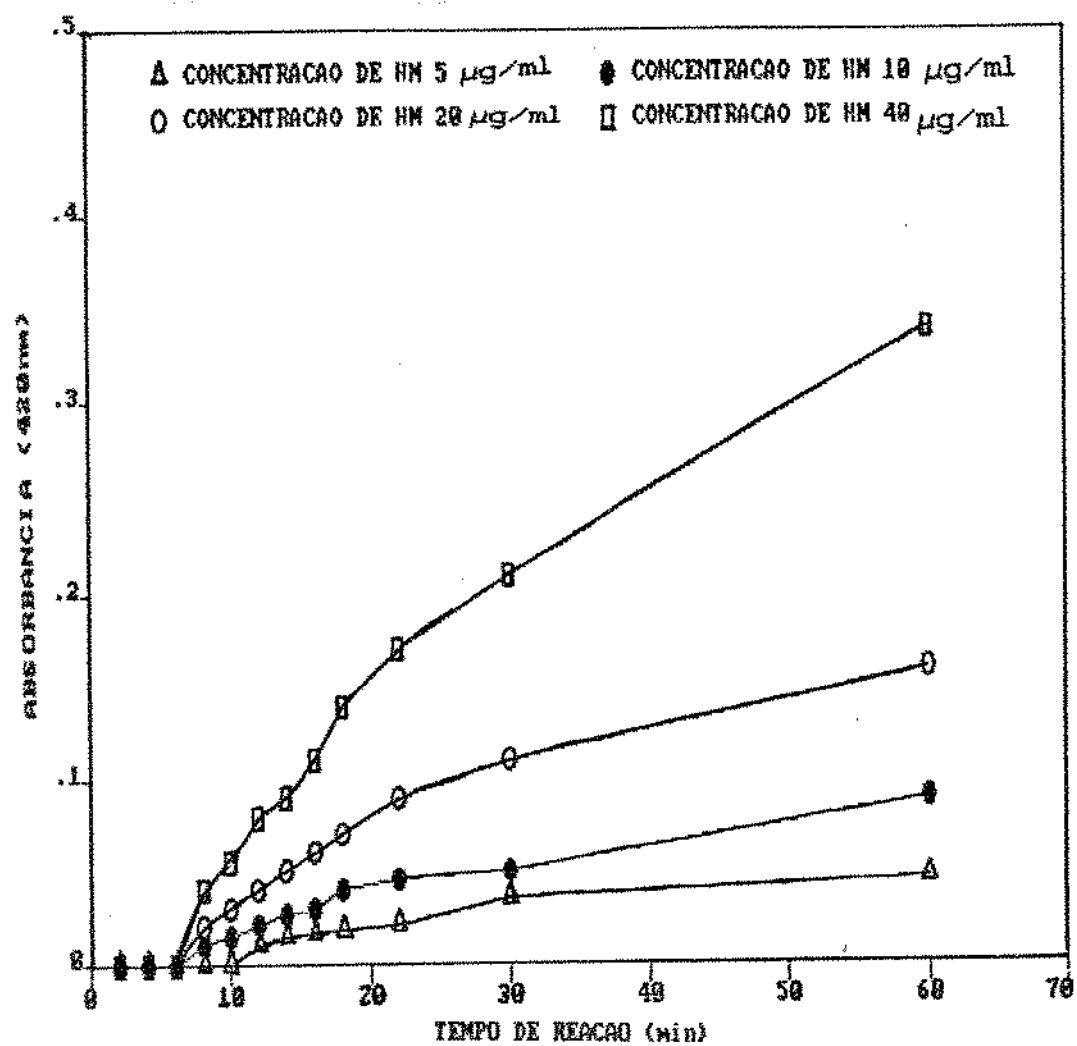


FIGURA 15. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9.5.

TABELA 4. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9,0. Absorbância a 420nm

| Tempo<br>(min) | Concentração de Histamina ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |       |       |
|----------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|                | 5                                              | 10    | 20    | 40    |
| 2              | 0,000                                          | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 4              | 0,000                                          | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 6              | 0,000                                          | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 8              | 0,000                                          | 0,010 | 0,018 | 0,035 |
| 10             | 0,000                                          | 0,010 | 0,020 | 0,040 |
| 12             | 0,000                                          | 0,010 | 0,020 | 0,040 |
| 14             | 0,010                                          | 0,015 | 0,030 | 0,070 |
| 16             | 0,010                                          | 0,020 | 0,040 | 0,080 |
| 18             | 0,015                                          | 0,025 | 0,050 | 0,095 |
| 22             | 0,015                                          | 0,030 | 0,060 | 0,110 |
| 30             | 0,020                                          | 0,040 | 0,080 | 0,150 |
| 60             | 0,045                                          | 0,080 | 0,150 | 0,270 |

TABELA 5. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 9,5. Absorbância a 420nm

| Tempo<br>(min) | Concentração de Histamina ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |       |       |
|----------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|                | 5                                              | 10    | 20    | 40    |
| 2              | 0,000                                          | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 4              | 0,000                                          | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 6              | 0,000                                          | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 8              | 0,000                                          | 0,010 | 0,020 | 0,040 |
| 10             | 0,000                                          | 0,015 | 0,030 | 0,055 |
| 12             | 0,010                                          | 0,020 | 0,040 | 0,080 |
| 14             | 0,015                                          | 0,028 | 0,050 | 0,090 |
| 16             | 0,018                                          | 0,030 | 0,060 | 0,110 |
| 18             | 0,018                                          | 0,040 | 0,070 | 0,140 |
| 22             | 0,020                                          | 0,045 | 0,090 | 0,170 |
| 30             | 0,035                                          | 0,050 | 0,110 | 0,210 |
| 60             | 0,040                                          | 0,090 | 0,160 | 0,340 |

Em pH 10 e 11 a reação é mais rápida, iniciando-se aos 4 minutos em pH 10, e aos 2 minutos em pH 11,0, como mostram as Tabelas 6 e 7 e as Figuras 16 e 17, respectivamente. Todavia, nestes valores de pH, o branco desenvolve cor intensa (amarela). Além do mais, nestes pH a intensidade da cor não é proporcional a quantidade de histamina presente na solução, principalmente em concentrações mais altas.

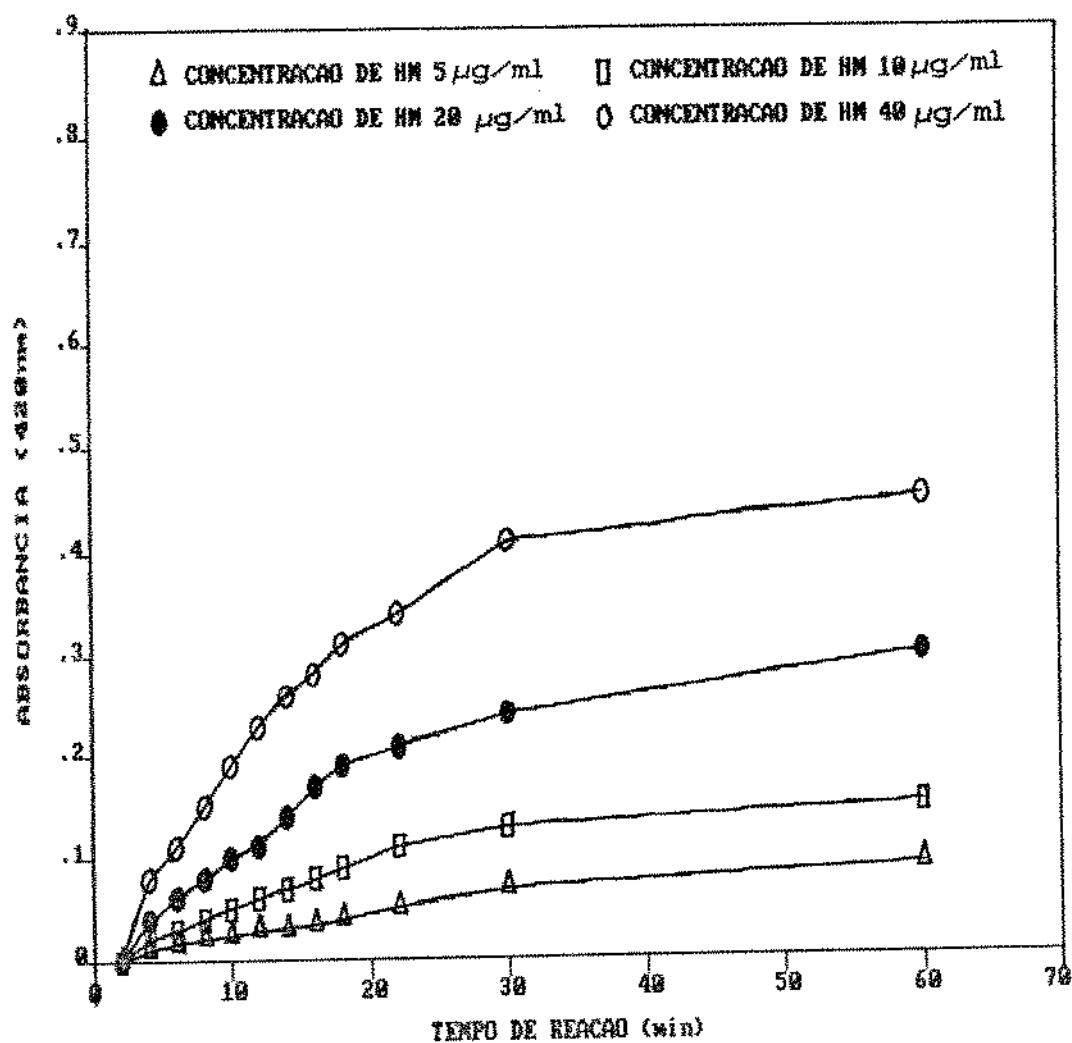


FIGURA 16. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 10,0.

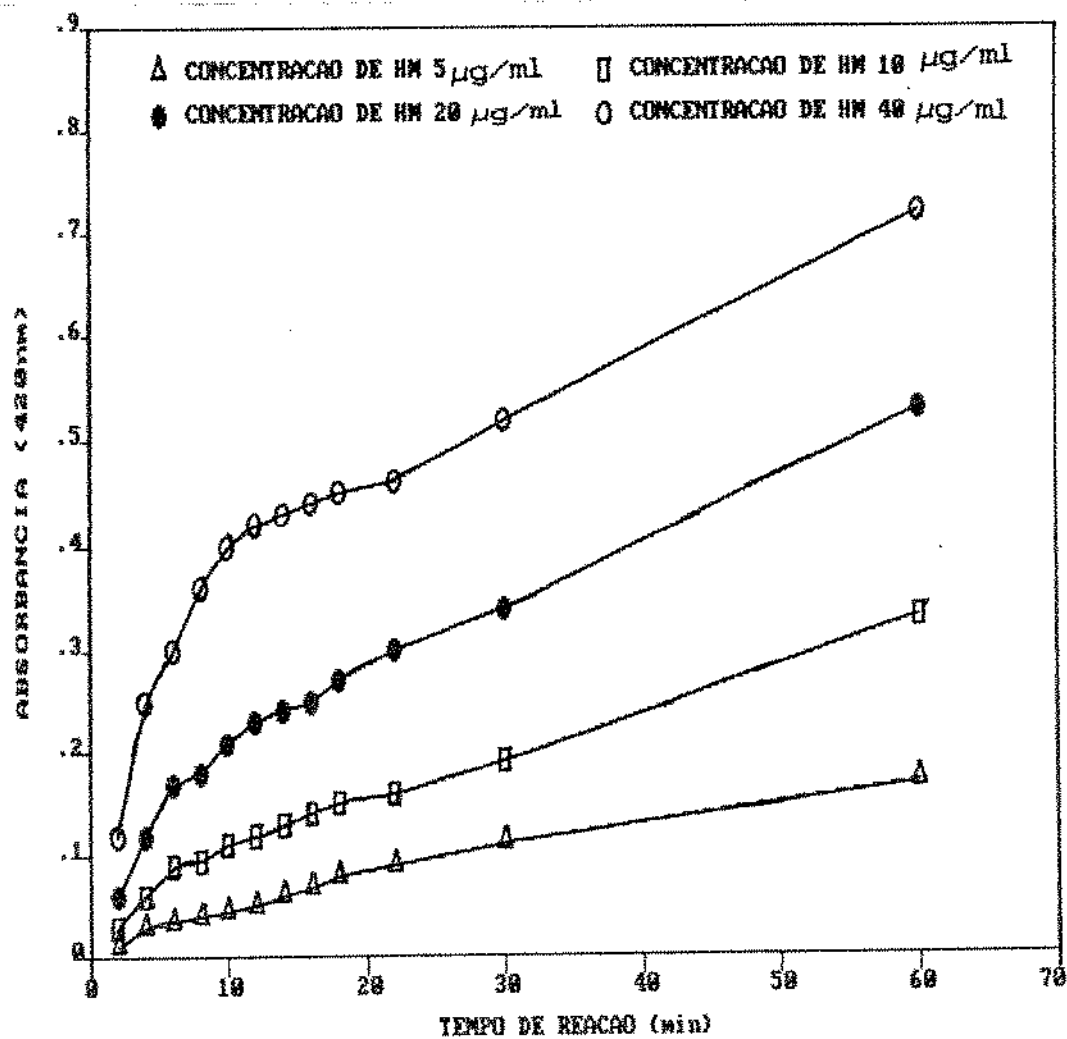


FIGURA 17.- Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 11,0.

TABELA 6. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 10. Absorbância a 420nm

| Tempo (min) | Concentração de Histamina ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |       |       |
|-------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|             | 5                                              | 10    | 20    | 40    |
| 2           | 0,000                                          | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 4           | 0,010                                          | 0,020 | 0,040 | 0,080 |
| 6           | 0,015                                          | 0,030 | 0,060 | 0,110 |
| 8           | 0,020                                          | 0,040 | 0,080 | 0,150 |
| 10          | 0,025                                          | 0,050 | 0,100 | 0,190 |
| 12          | 0,030                                          | 0,060 | 0,110 | 0,230 |
| 14          | 0,030                                          | 0,070 | 0,140 | 0,260 |
| 16          | 0,035                                          | 0,080 | 0,170 | 0,280 |
| 18          | 0,040                                          | 0,090 | 0,190 | 0,310 |
| 22          | 0,050                                          | 0,110 | 0,210 | 0,340 |
| 30          | 0,070                                          | 0,130 | 0,240 | 0,410 |
| 60          | 0,090                                          | 0,150 | 0,300 | 0,450 |

TABELA 7. - Influência Tempo na Reação do TNBS com Histamina, à Temperatura Ambiente, pH 11. Absorbância a 420nm

| Tempo (min) | Concentração de Histamina ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |       |       |
|-------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|             | 5                                              | 10    | 20    | 40    |
| 2           | 0,010                                          | 0,030 | 0,060 | 0,120 |
| 4           | 0,030                                          | 0,060 | 0,120 | 0,250 |
| 6           | 0,035                                          | 0,090 | 0,170 | 0,300 |
| 8           | 0,040                                          | 0,095 | 0,180 | 0,360 |
| 10          | 0,045                                          | 0,110 | 0,210 | 0,400 |
| 12          | 0,050                                          | 0,120 | 0,230 | 0,420 |
| 14          | 0,060                                          | 0,130 | 0,240 | 0,430 |
| 16          | 0,070                                          | 0,140 | 0,250 | 0,440 |
| 18          | 0,080                                          | 0,150 | 0,270 | 0,450 |
| 22          | 0,090                                          | 0,160 | 0,300 | 0,450 |
| 30          | 0,110                                          | 0,190 | 0,340 | 0,520 |
| 60          | 0,170                                          | 0,330 | 0,530 | 0,720 |

Com o objetivo de aumentar a velocidade de formação do complexo, foram realizados estudos, em temperatura mais elevada, baseados em observações da literatura. Assim, após vários experimentos, foi escolhida a temperatura de 70°C, por razões práticas, como facilidade operacional, rapidez no desenvolvimento da reação e por requerer um tempo razoável de 5 minutos. A Tabela 8 e a Figura 18, apresentam os valores de absorbância obtidos em diferentes pH, aos 5 minutos e a 70°C. Verifica-se que o aumento da temperatura provoca um aumento na velocidade da reação. Constata-se, assim, que a reação entre o TNBS e a histamina nas condições estudadas pelos autores deste trabalho, não se desenvolve totalmente à temperatura ambiente e em valores de pH abaixo de 9,0 requerendo, portanto, um tempo mais longo de reação.

TABELA 8 - Efeito do pH na Reação do TNBS com Histamina,  
a 70°C e Tempo de 5 minutos

| Histamina<br>µg/ml | Absorbância a 420nm |        |       |        |       |         |       |
|--------------------|---------------------|--------|-------|--------|-------|---------|-------|
|                    | pH 8                | pH 8,5 | pH 9  | pH 9,5 | pH 10 | pH 10,5 | pH 11 |
| 5                  | 0,010               | 0,015  | 0,025 | 0,030  | 0,040 | 0,040   | 0,050 |
| 10                 | 0,020               | 0,030  | 0,050 | 0,060  | 0,075 | 0,080   | 0,090 |
| 20                 | 0,035               | 0,060  | 0,090 | 0,120  | 0,140 | 0,150   | 0,170 |
| 40                 | 0,070               | 0,130  | 0,190 | 0,240  | 0,290 | 0,290   | 0,300 |

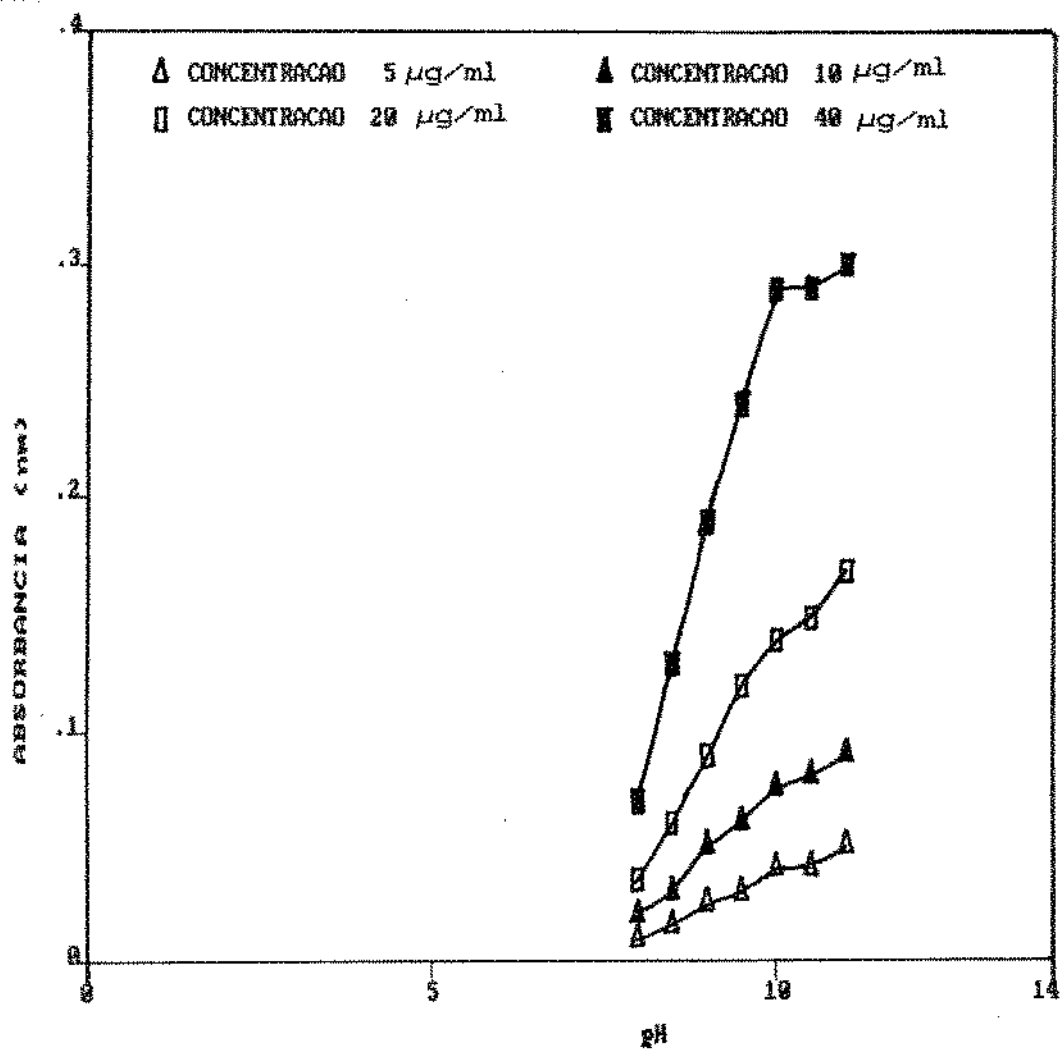


FIGURA 18. - Efeito do pH na Formação do Complexo TNBS-HM a 70°C, Tampão NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Em pH 10, 10,5 e 11, os valores de absorbância variam muito pouco entre si. Nesta faixa de pH e nas condições de tempo e temperatura citadas anteriormente, podem ocorrer reações secundárias, comprometendo assim, a especificidade da reação. Portanto, estes estudos permitem-nos concluir que o pH ótimo para a formação do complexo TNBS-HM está entre 9,0 e 9,5, onde o grupo amino da histamina parece estar mais livre e reativo, sem favorecer outro tipo de reação. Esta faixa de pH permite, também, mais uniformidade no desenvolvimento da cor do complexo. Desse modo, estudou-se o tempo da trinitrofenilação da histamina em quatro concentrações diferentes, na presença de solução saturada de bicarbonato de sódio pH (9,3), nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas em meio ácido (Tabela 9 e Figura 19) e em meio alcalino (tolueno/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Tabela 10 e Figura 20). Observou-se que as leituras em meio ácido foram um pouco inferiores às realizadas em meio alcalino. Provavelmente, na fase orgânica (tolueno/n-butanol), ainda existam algumas impurezas (excesso de reagente TNBS, ou alguma substância interferente), que são eliminadas na extração com HCl 0,25N. A trinitrofenilação atingiu o máximo com 5 minutos de reação (Figura 19). Após esse tempo a reação atingiu um patamar. Por razões de segurança, recomenda-se que a leitura seja realizada entre 5 e 10 minutos.

As leituras realizadas em meio alcalino (tolueno/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), não foram uniformes após os 5 minutos de reação, (Figura 20).

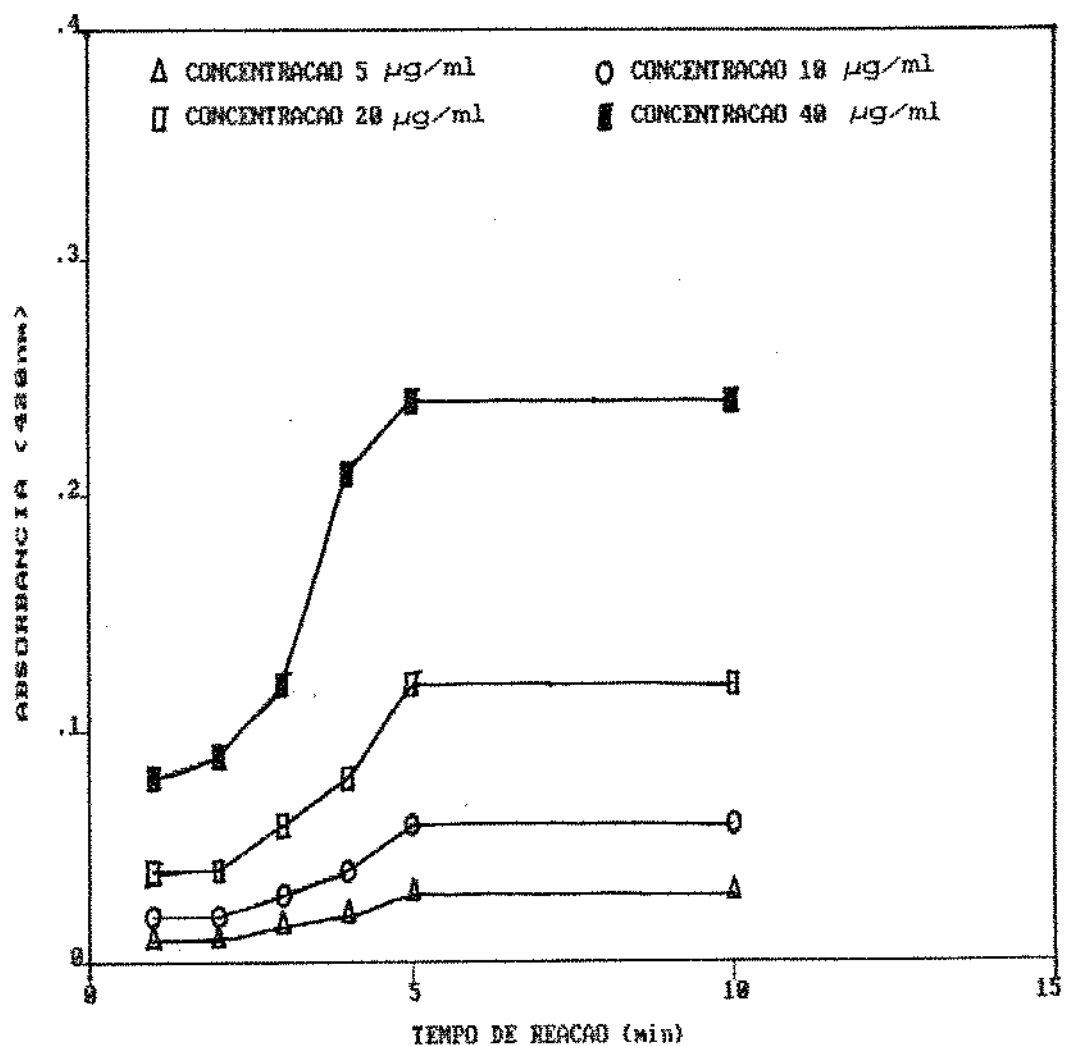


FIGURA 19. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina, (pH inicial 9,3), a 70°C, em tolueno/HCl.

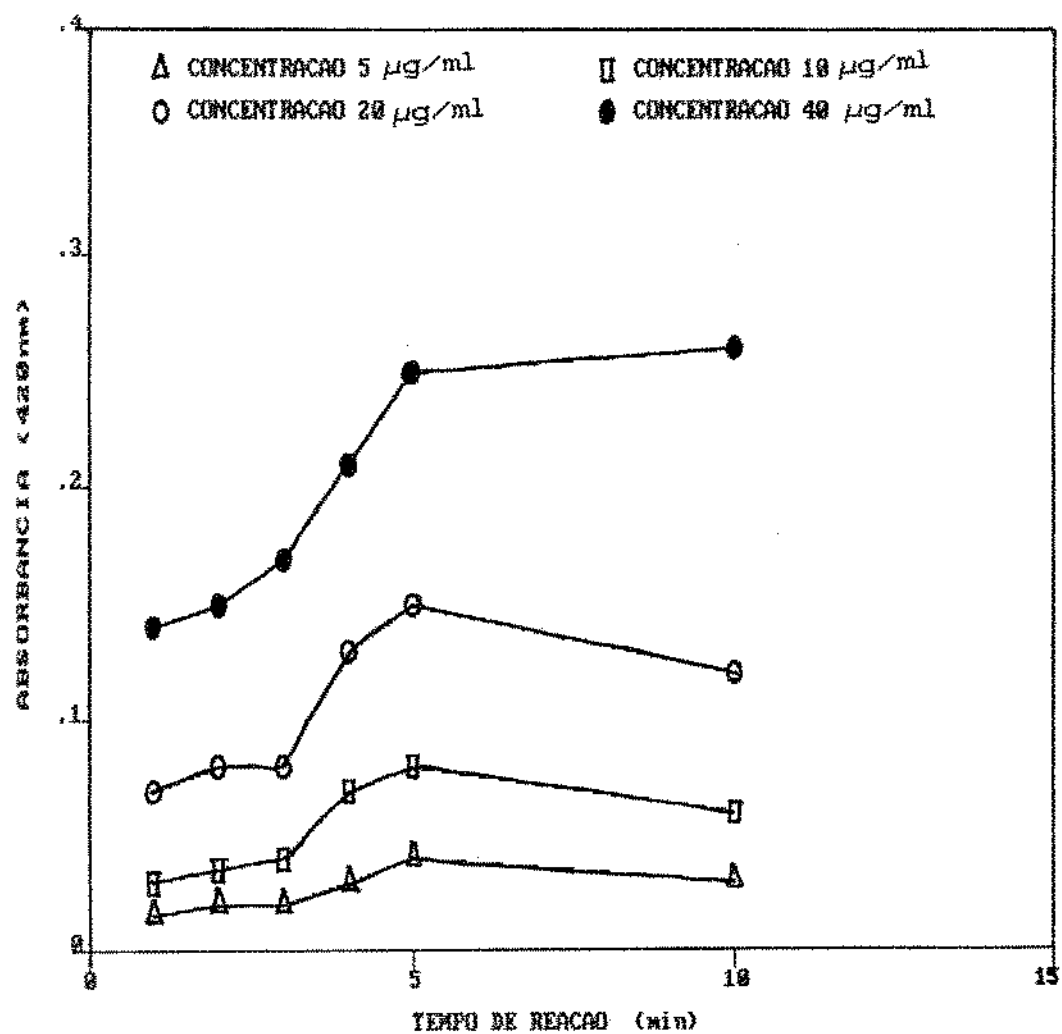


FIGURA 20. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina  
(pH inicial 9,3), a 70°C, em tolueno/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$

TABELA 9. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina (pH inicial 9,3), a 70°C, em Tolueno/HCl, Absorbância a 420nm.

| Tempo (min) | Concentração de Histamina ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |       |       |
|-------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|             | 5                                              | 10    | 20    | 40    |
| 1           | 0,010                                          | 0,020 | 0,040 | 0,080 |
| 2           | 0,010                                          | 0,020 | 0,040 | 0,080 |
| 3           | 0,015                                          | 0,030 | 0,060 | 0,120 |
| 4           | 0,020                                          | 0,040 | 0,080 | 0,210 |
| 5           | 0,030                                          | 0,060 | 0,120 | 0,240 |
| 10          | 0,030                                          | 0,060 | 0,120 | 0,240 |

TABELA 10. - Influência do Tempo na Reação do TNBS com Histamina (pH Inicial 9,3), a 70°C, em Tolueno/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Absorbância a 420nm

| Tempo (min) | Concentração de Histamina ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |       |       |
|-------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|             | 5                                              | 10    | 20    | 40    |
| 1           | 0,015                                          | 0,030 | 0,070 | 0,140 |
| 2           | 0,020                                          | 0,035 | 0,080 | 0,150 |
| 3           | 0,020                                          | 0,040 | 0,080 | 0,170 |
| 4           | 0,030                                          | 0,070 | 0,130 | 0,210 |
| 5           | 0,040                                          | 0,080 | 0,150 | 0,250 |
| 10          | 0,030                                          | 0,060 | 0,120 | 0,260 |

#### 4.2.2 - OBTENÇÃO DA CURVA-PADRÃO

A Figura 21 apresenta as curvas padrão obtidas. Na curva A, os padrões não foram submetidos à partição com n-butanol, enquanto que na curva B todas as soluções padrão foram alcalinizadas com KOH e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e recuperadas em n-butanol. As duas curvas ilustram dois pontos importantes: 1) a obediência à lei de Beer, e 2) a perda de uma pequena quantidade de histamina no decorrer do processo, desde a etapa de extração até a de purificação do complexo.

Após a extração com ácido clorídrico 0,25N, o composto produzido pela reação do TNBS com a histamina possui uma cor nitidamente diferente do branco. O ácido elimina o excesso de cor produzida pelo TNBS, tanto no branco quanto nas amostras. O complexo formado é estável em meio ácido, porém a absorbância nas amostras com baixas concentrações de histamina é pequena. Para contornar esse problema utilizou-se um artifício: após a última purificação com HCl 0,25N, adicionou-se aos tubos de reação 0,5ml de álcool etílico, 0,5ml de N,N-dimetilformamida e 0,1ml de KOH 50%. Esta mistura proporcionou um aumento na intensidade de cor e na estabilidade do complexo. Nestas condições, a cor do complexo muda de amarelo para alaranjado, que é lido no mesmo comprimento de onda, 420nm.

O valor de  $\epsilon$  (coeficiente de extinção molar ou absortividade molar do grupo amino livre), calculado para a reação do TNBS com a histamina, a 420nm, foi de  $6,95 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Este valor

pode ser comparado com o valor encontrado na literatura, para reação do TNBS com a glicina ( $6,51 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$ ). Mokrasch, 1967. Este valor indica que houve formação do complexo.

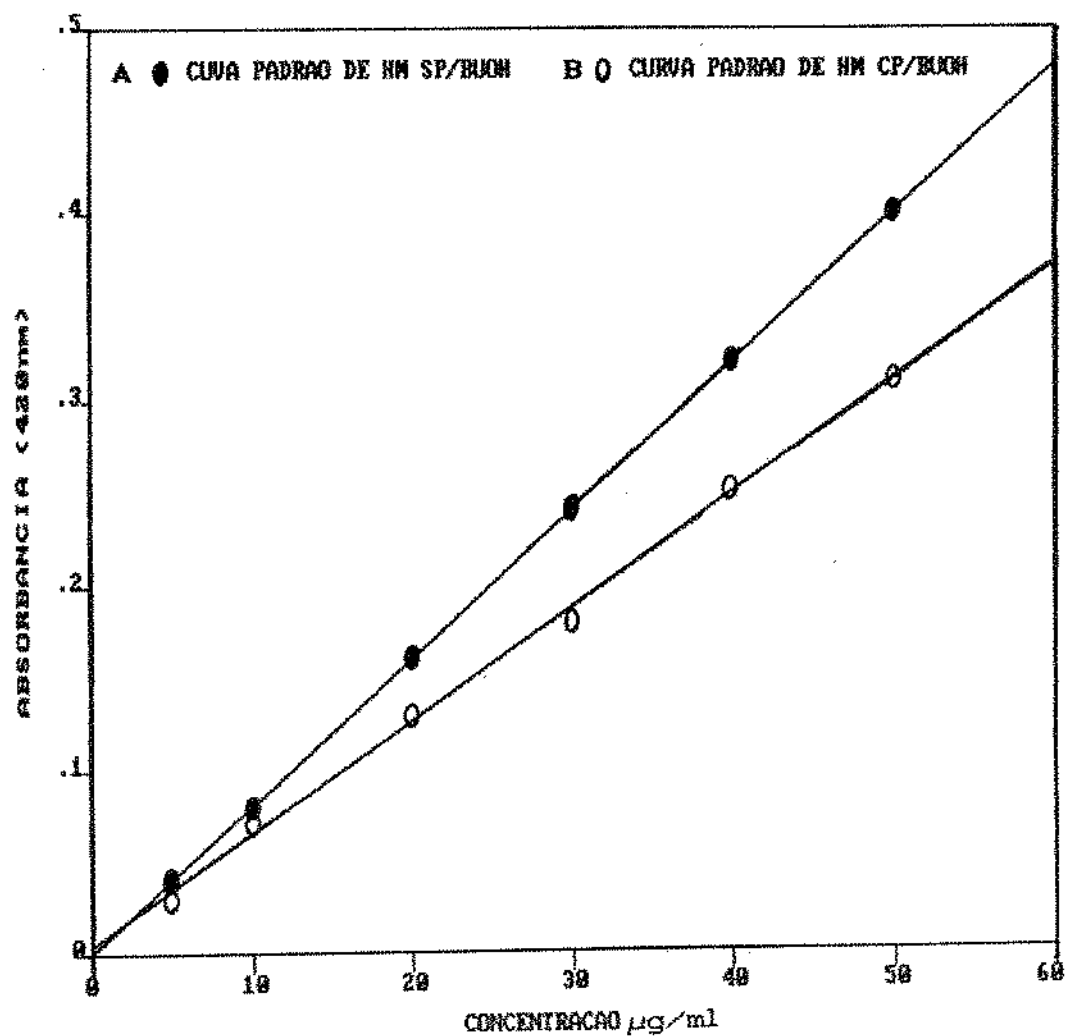


FIGURA 21. - Curvas Padrão do Complexo TNBS-HM, pH 9,3. Curva A: Padrões não Submetidos à Partição (SP) em n-Butanol; Curva B: Padrões com Partição (CP) em n-Butanol. Equação da reta para a Curva A:  $Y = (1.192E-07) + (8.000E-03) * X$  e Curva B:  $Y = (3.836E-03) + (6.110E-03) * X$

#### 4.2.3 - ESPECTROS DO COMPLEXO TNBS-HM NO ULTRAVIOLETA E NO VISÍVEL

O produto monoderivado TNBS-HM, tem cor amarela e apresenta, tanto em meio ácido como alcalino, conforme mostram as Figuras 22 e 23 um espectro de absorção com pico máximo a 343.0 e um pico secundário próximo 420nm, que foi o escolhido para a leitura das amostras, por permitir o uso de espectrofotômetro que opera somente na região do visível. A Figura 24 apresenta o espectro de absorção do ácido 2,4,6-Trinitrobenzenosulfônico puro, com um pico de absorção a 254nm.

O derivado sulfonado TNBS-HM apresenta todas as propriedades básicas do anel imidazol e é completamente solúvel em soluções ácidas, podendo ser separado do excesso de reagente, dos derivados trinitrofenilados, das mono, di ou poliaminas, por partição com tolueno/n-butanol, sob condições ácidas e dos derivados monotrinitrofenilados, dos aminoácidos não básicos e dos derivados dinitrofenilados da lisina por partição, sob condições alcalinas.

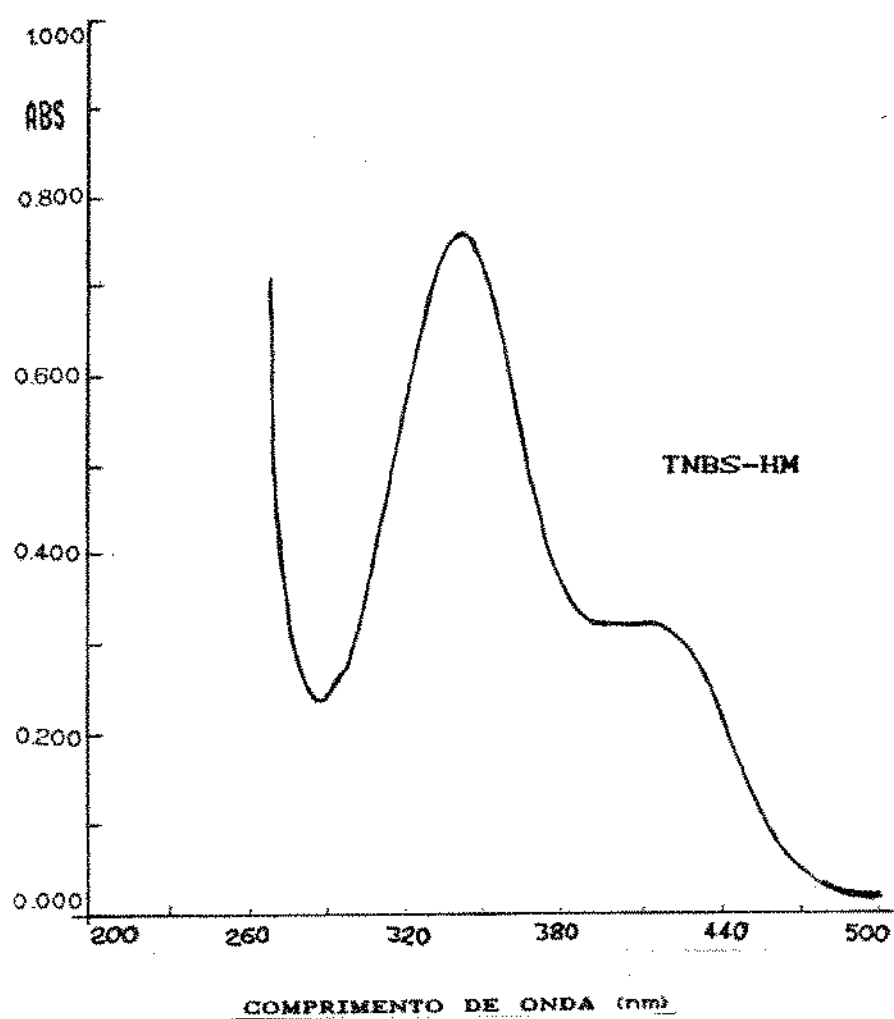


FIGURA 22. - Espectro de Absorção do Derivado Sulfonado TNBS-HM,  
em HCl 0,25N

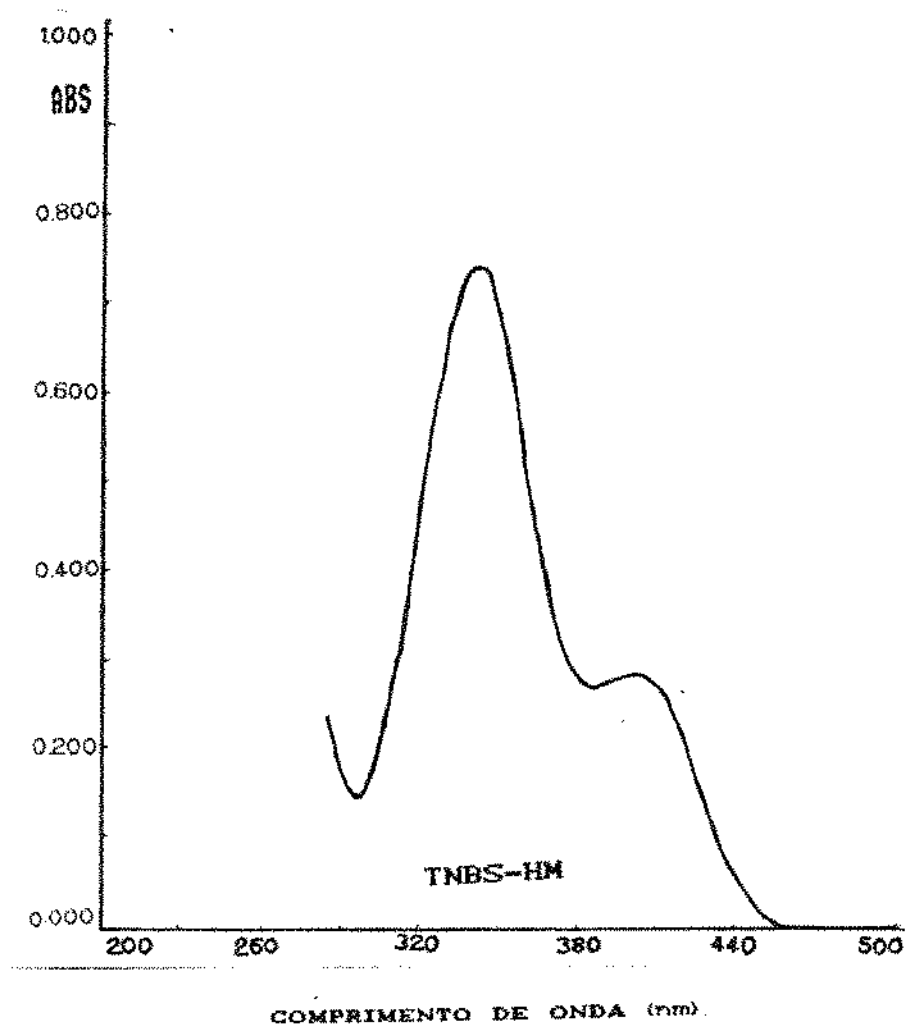


FIGURA 23. - Espectro de Absorção do Derivado Sulfonado TNBS-HM, em meio alcalino (Alcool Etílico, N,N-DMFM e KOH).

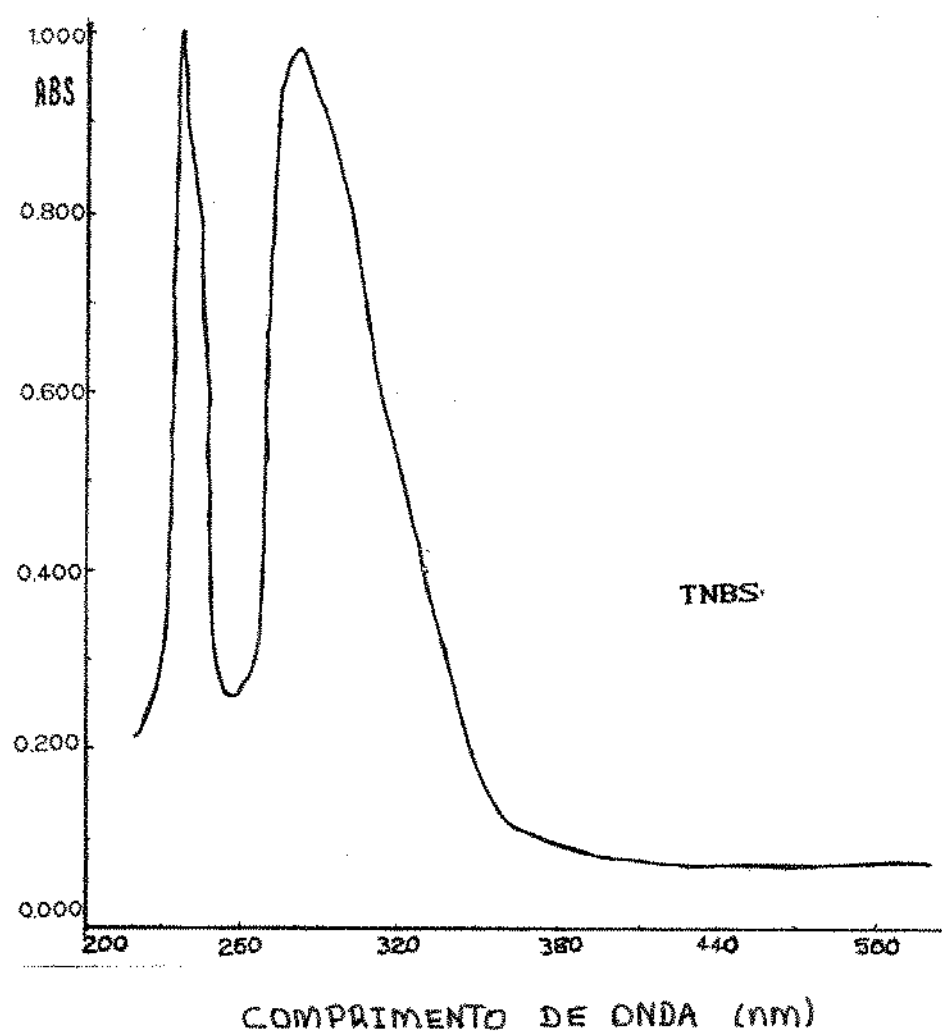


FIGURA 24. - Espectro de Absorção do Ácido 2,4,6-Trinitrobenzeno sulfônico (1% em HCl 0,25N)

#### 4.2.4 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO COMPLEXO

##### TNBS-HM.

Foram obtidos espectros na região do infravermelho do anel imidazol, do dicloridrato de histamina (HM.2HCl), do reagente ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfônico e do complexo TNBS-HM, de acordo com as Figuras 25, 26, 27 e 28.

Observa-se, pela Figura 26, que o espectro da histamina pura apresenta duas bandas a  $3100\text{cm}^{-1}$  e a  $3020\text{cm}^{-1}$ , características das vibrações da ligação N-H e que não estão presentes no espectro do derivado trinitrofenilado (Figura 28). As bandas de absorção que aparecem em  $1260\text{cm}^{-1}$  e  $1480\text{cm}^{-1}$  (Figura 27), são típicas de grupos  $\text{NO}_2$  do TNBS, embora no espectro do complexo TNBS-HM (Figura 28), se apresentem um pouco deslocadas em relação às bandas observadas no espectro do TNBS puro. Outra evidência é mostrada pela presença de bandas a  $1680\text{cm}^{-1}$  e  $1560\text{cm}^{-1}$ , no espectro do complexo TNBS-HM, características de ligações duplas (C=C) e as bandas a  $1425\text{cm}^{-1}$  e  $2960\text{cm}^{-1}$ , atribuídas à presença de estiramento de carbono do grupo metileno e, por fim, observa-se a  $1400\text{cm}^{-1}$  uma banda que pode ser atribuída à ligação entre carbono e nitrogênio (C=N), já que elas aparecem nos espectros do imidazol e da histamina (Figura 25), embora esta banda também se encontre um pouco deslocada.

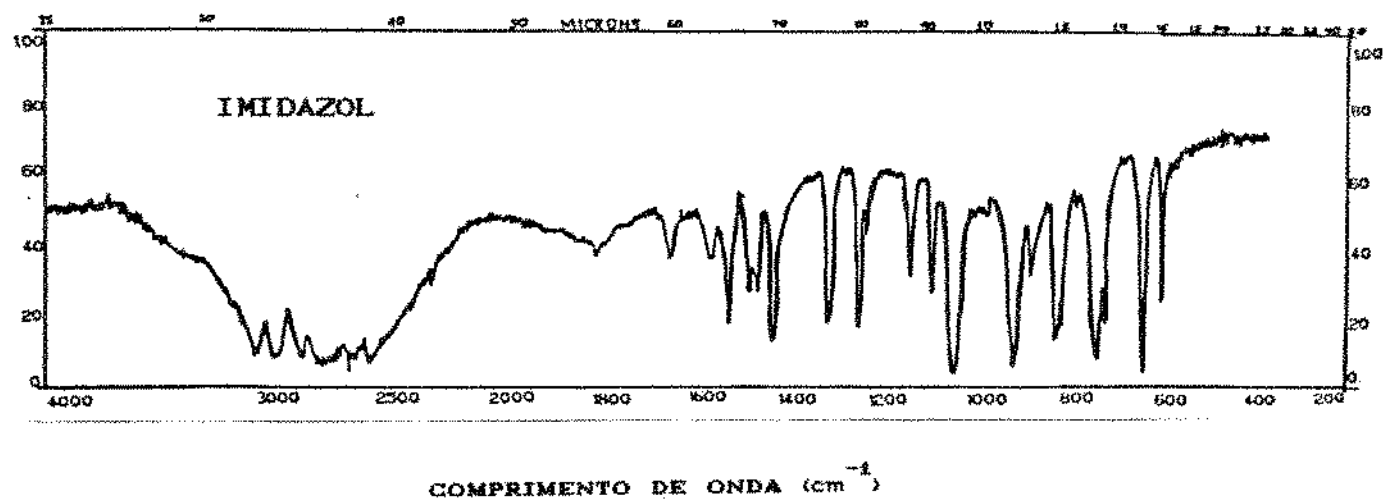


FIGURA 25. - Espectro de Absorção do Anel Imidazol, em HCl, na Região do Infravermelho

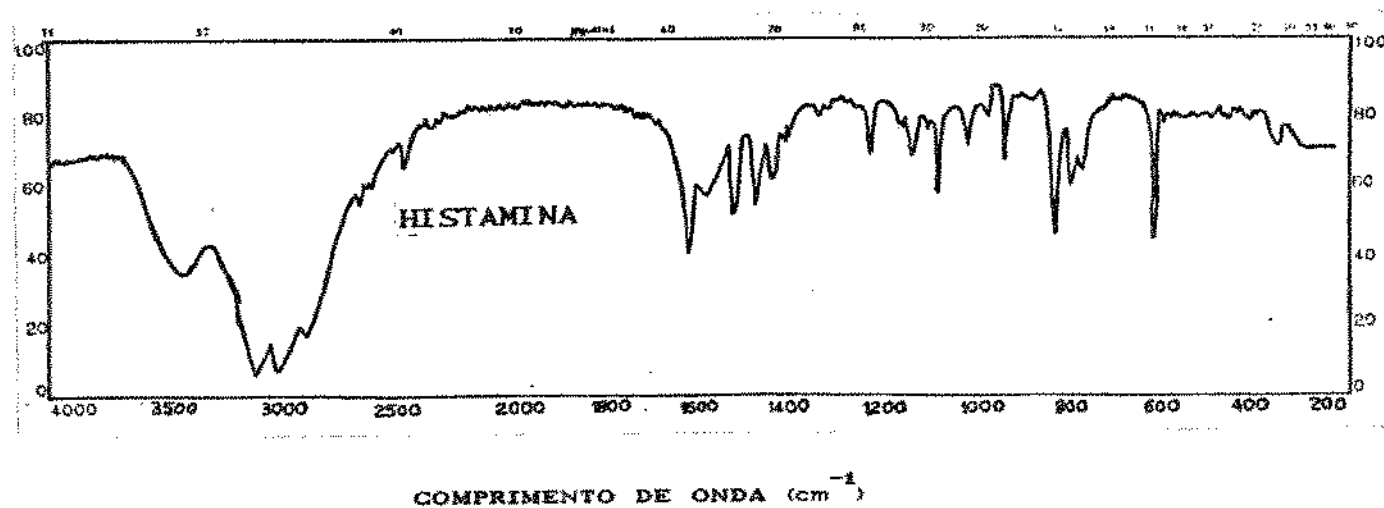


FIGURA 26. - Espectro de Absorção da Histamina, em HCl, na Região do Infravermelho

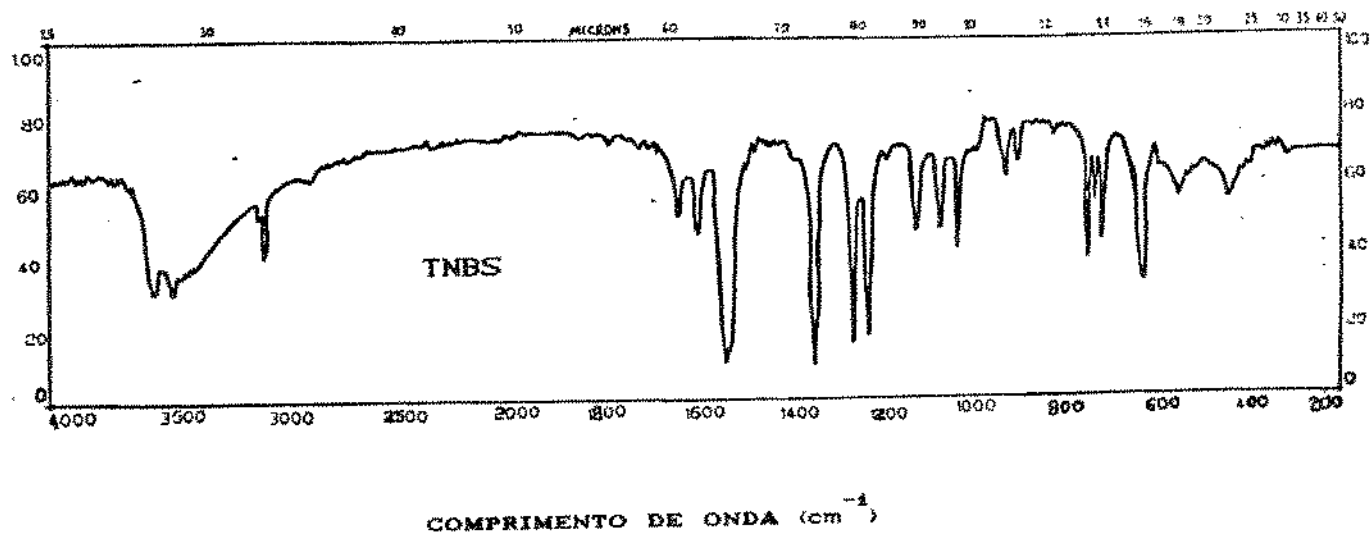


FIGURA 27. - Espectro de Absorção do TNBS na Região do Infravermelho

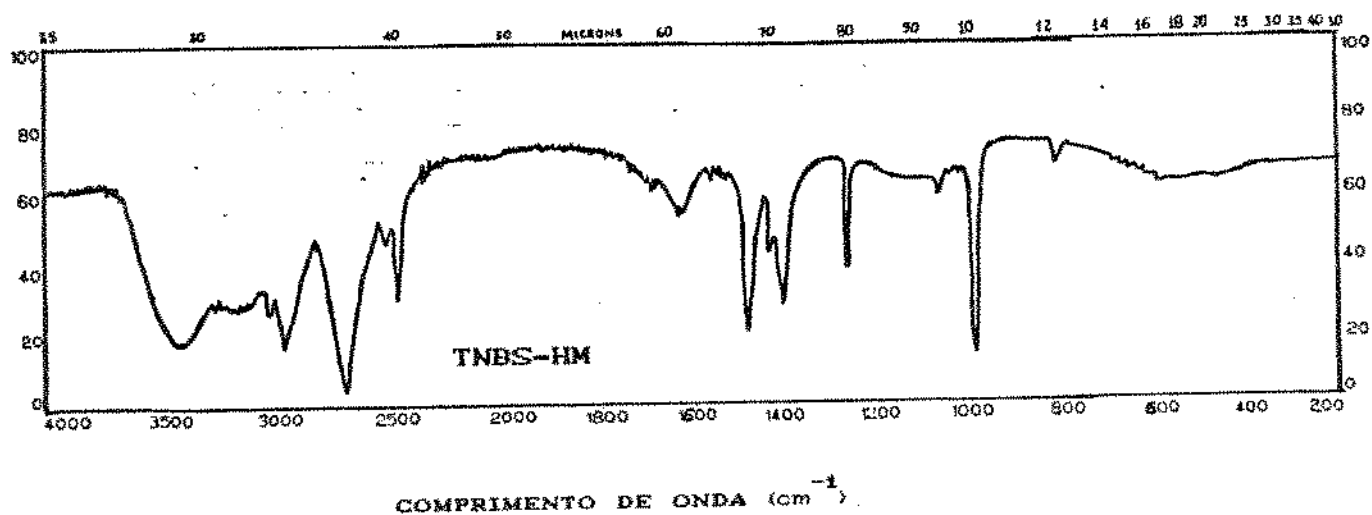


FIGURA 28. - Espectro de Absorção do Monoderivado Sulfonado, TNBS-HM em HCl 0,25N, na Região do Infravermelho.

Observando-se o espectro do complexo TNBS-HM, podemos afirmar que a resolução não está perfeita, haja visto que algumas bandas encontram-se deslocadas e que outras, consideradas importantes, não foram registradas. Para evitar esse tipo de problema, o complexo formado deveria ser purificado antes de ser tirado o espectro, evitando assim, que os traços de solvente que ficaram impregnados no complexo, devido às sucessivas extrações, interferissem na resolução do espectro.

Após o estudo dos espectros comentados anteriormente, podemos aceitar a hipótese de que a estrutura do complexo TNBS-HM, seria do mesmo tipo da estrutura proposta para aminoácidos (Mokrasch, 1967), estando ausente o grupo  $\alpha$ -carboxílico.

#### 4.3 - ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES DE OCORRÊNCIA

##### COMUM EM PESCADO.

A Tabela 11 apresenta os valores de absorbância obtidos da leitura a 420nm de algumas substâncias testadas, conforme o procedimento descrito no item 3.3.3, que poderiam interferir na reação da histamina com o TNBS. Observa-se, pela Tabela 11, que a interferência foi nula ou considerada negligenciável. É importante salientar que algumas substâncias, em concentrações relativamente altas, presentes nos músculos, não reagem com TNBS, e portanto, não interferem em nenhuma etapa do processo, como a trimetilamina, a creatina, a creatinina e a inosina. As outras substâncias, listadas na Tabela 11, reagem dando uma cor de intensidade muito próxima à da histamina, porém na leitura final não interferem porque são eliminadas nas passagens para tolueno/n-butanol e para HCl 0,25N.

TABELA 11 - VALORES DE ABSORBÂNCIA E NÍVEIS  
DE INTERFERÊNCIA DE DIVERSOS COMPOSTOS NA  
DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA PELO MÉTODO DESENVOLVIDO

| SUBSTÂNCIAS<br>INTERFERENTES<br>ADICIONADAS EM<br>50µg DE HM | ABSORBÂNCIA<br>DA HISTAMINA<br>PURA<br>(420NM) | ABSORBÂNCIA DA<br>HISTAMINA +<br>INTERFERENTES<br>(420NM) | PORCENTAGEM<br>DE<br>INTERFERÊNCIA<br>( % ) |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <u>AMINOÁCIDOS (100µg)</u>                                   |                                                |                                                           |                                             |
| HISTIDINA                                                    | 0,40 ± 0,009                                   | 0,402                                                     | 0,000                                       |
| FENILALANINA                                                 | 0,40 ± 0,009                                   | 0,405                                                     | 0,000                                       |
| TRIPTOFANO                                                   | 0,40 ± 0,009                                   | 0,400                                                     | 0,000                                       |
| CISTEÍNA                                                     | 0,40 ± 0,009                                   | 0,403                                                     | 0,000                                       |
| GLICINA                                                      | 0,40 ± 0,009                                   | 0,406                                                     | 0,000                                       |
| LISINA. HCl                                                  | 0,40 ± 0,009                                   | 0,408                                                     | 0,000                                       |
| AC. GLUTÂMICO                                                | 0,40 ± 0,009                                   | 0,400                                                     | 0,000                                       |
| AC. ASPÁRTICO                                                | 0,40 ± 0,009                                   | 0,403                                                     | 0,000                                       |
| ALANINA                                                      | 0,40 ± 0,009                                   | 0,403                                                     | 0,000                                       |
| ARGININA. HCl                                                | 0,40 ± 0,009                                   | 0,400 (NÃO REAGE)                                         | 0,000                                       |
| PROLINA                                                      | 0,40 ± 0,009                                   | 0,398 ( " " )                                             | 0,000                                       |
| TAURINA                                                      | 0,40 ± 0,009                                   | 0,404                                                     | 0,000                                       |
| <u>DIAMINAS (100µg)</u>                                      |                                                |                                                           |                                             |
| CADAVERINA                                                   | 0,40 ± 0,009                                   | 0,408                                                     | 0,000                                       |
| PUTRESCINA                                                   | 0,40 ± 0,009                                   | 0,406                                                     | 0,000                                       |
| ESPERMINA                                                    | 0,40 ± 0,009                                   | 0,402                                                     | 0,000                                       |
| ESPERMIDINA                                                  | 0,40 ± 0,009                                   | 0,402                                                     | 0,000                                       |
| <u>AMINAS VOLÁTEIS (100µg)</u>                               |                                                |                                                           |                                             |
| TRIMETILAMINA. HCl                                           | 0,40 ± 0,009                                   | 0,405                                                     | 0,000                                       |
| CLORETO DE AMÔNIO                                            | 0,40 ± 0,009                                   | 0,400 (NÃO REAGE)                                         | 0,000                                       |

CONTINUAÇÃO DA TABLA 11.

BASES DE AMÔNIO QUARTERNÁRIO (100µg)

|                 |              |                   |       |
|-----------------|--------------|-------------------|-------|
| ÓXIDO DE T.M.A  | 0,40 ± 0,009 | 0,396 (NÃO REAGE) | 0,000 |
| GLICINA-BETAÍNA | 0,40 ± 0,009 | 0,398 ( " " )     | 0,000 |

BASES DE NUCLEOTÍDEOS (100µg)

|         |              |                   |       |
|---------|--------------|-------------------|-------|
| GUANINA | 0,40 ± 0,009 | 0,398 (NÃO REAGE) | 0,000 |
| INOSINA | 0,40 ± 0,009 | 0,398 ( " " )     | 0,000 |
| ADENINA | 0,40 ± 0,009 | 0,400 ( " " )     | 0,000 |
| ADENINA | 0,40 ± 0,009 | 0,400 ( " " )     | 0,000 |

DERIVADOS DA GUANIDINA (100µg)

|               |              |                   |       |
|---------------|--------------|-------------------|-------|
| CREATINA      | 0,40 ± 0,009 | 0,400 (NÃO REAGE) | 0,000 |
| CREATININA    | 0,40 ± 0,009 | 0,400 ( " " )     | 0,000 |
| GUANIDINA.HCl | 0,40 ± 0,009 | 0,400 ( " " )     | 0,000 |

DIPEPTÍDEOS (100µg)

|           |              |       |       |
|-----------|--------------|-------|-------|
| CARNOSINA | 0,40 ± 0,009 | 0,406 | 0,000 |
|-----------|--------------|-------|-------|

OUTROS (100µg)

|          |              |                   |       |
|----------|--------------|-------------------|-------|
| URÉIA    | 0,40 ± 0,009 | 0,400 (NÃO REAGE) | 0,000 |
| IMIDAZOL | 0,40 ± 0,009 | 0,400 ( " " )     | 0,000 |

Os compostos que poderiam interferir na reação com TNBS são :

etilenodiaminas ou derivados, nos quais, ambos os grupos amino são aminas alifáticas primárias ou secundárias; e os grupos amino que poderiam ser atacados por átomos de carbono adjacentes sob as condições de ensaio para histamina. Tais compostos reagem com TNBS para dar produtos derivados monotrinitrofenilados, os quais seguem com os derivados da histamina; das diaminas, nas quais um grupo básico (ou ambos), reagem relativamente pouco com o TNBS como, por exemplo, o histidíno e N,N-dimetiletilenodiamina.

A eliminação de tais interferentes foi conseguida, neste trabalho, através do processo de purificação, após a reação da histamina com TNBS. Os compostos do grupo das diaminas podem ser separados da histamina por partição seletiva com tolueno/butanol (4:1), após a reação com TNBS. Os imidazóis sem grupos amino primários ou secundários, como por exemplo o imidazol, não reagem com o TNBS sob as condições seguidas neste método.

No caso das diaminas lineares, cadaverina, putrescina e, talvez, espermina e espermidina, podem resultar em complexos não reativos ou em ânions solúveis em tolueno/butanol, conforme a Figura 29.

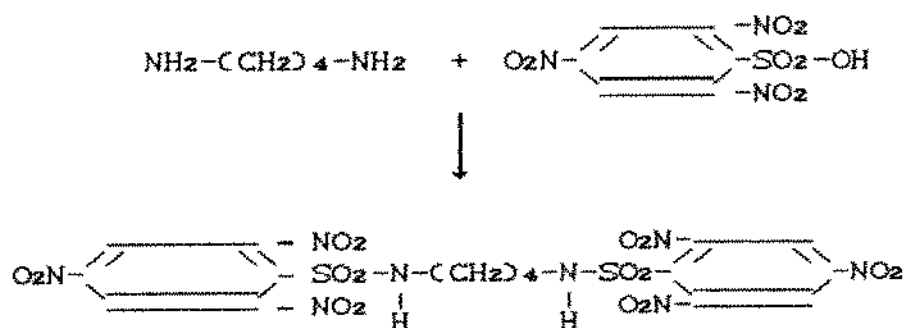


FIGURA 29 - Complexo TNBS-Putrescina

O extrato em tolueno/n-butanol certamente arrastou estes complexos junto com a histamina, porém quando agitados com ácido clorídrico 0,25N, houve separação da histamina que, por ser protonada, passa para a camada aquosa ácida. No caso, o único composto que pode ser protonado é a histamina, visto que a histidina e dipeptídeos, contendo grupos imidazóis, foram descartados anteriormente.

Em meio ácido a histamina é protonada, resultando em um cátion que é solúvel em água ou em ácido clorídrico, Figura 30.

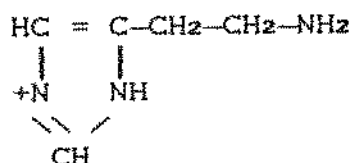


FIGURA 30 - Histamina Protonada.

Como nenhuma diamina pode ser protonada, esta permanece na camada de tolueno/n-butanol. No caso da trimetilamina (TMA), amina terciária, não possui nenhum hidrogênio para reagir com o TBNS, portanto não houve reação. A literatura relata que seria possível que a TMA formasse complexos de amônio quaternário (Figura 31), porém não detectamos mudança na absorbância após a reação da TMA com o TNBS. De qualquer maneira, em meio alcalino este composto comporta-se como cátion, portanto não pode ser extraído com tolueno/n-butanol.

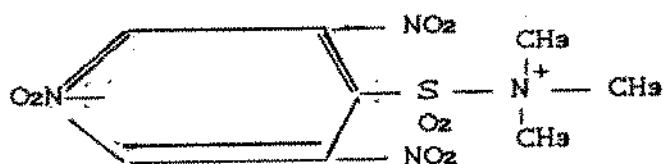


FIGURA 31. - Complexo de Amônio Quaternário (TMA)

Os derivados de todos os aminoácidos da trimetilamina e da dimetilamina são ânions, logo, ficaram retidos na fase aquosa.

De todos os compostos potencialmente interferentes que foram testados, somente a cadaverina e a putrescina deram uma pequena interferência, considerada desprezível.

Não ocorreu reação com histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina e ácido aspártico. No caso da lisina, glicina, ureia e TMA, os valores obtidos também foram considerados desprezíveis.

#### 4.4 - ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DE PADRÕES DE HISTAMINA.

Já foi citado no item 4.1.1 a porcentagem de recuperação de histamina, obtida com três soluções extratoras, e constatado que a solução de NaCl 20% e HCl 2,5% foi a mais eficiente para extrair a histamina do tecido do peixe. A Tabela 12 apresenta os teores de recuperação dos padrões de histamina adicionados aos extratos sem amostra e a Tabela 13 apresenta os valores de recuperação de padrões adicionados aos extratos com 10g de amostras de atum e bonito para dar concentrações finais de 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00mg de histamina/100g. As análises foram realizadas em duplicatas.

Observa-se, pela Tabela 13, que em amostras de atum com níveis de histamina de 25µg, a recuperação foi de 100% . Quando adicionada ao nível de 50µg, a média de recuperação foi de 99,8%, com um intervalo de 99,5% a 100% . Para os níveis de 100µg e 200µg, as médias de recuperação foram de 94,0% e 86,8%, respectivamente, com intervalo da média entre 93,5% a 94,4% para 100µg e 85,7% a 87,8% para 200µg. Para as amostras de bonito, os valores de recuperação foram praticamente iguais. A média total de recuperação do método foi de 95,0%, com um desvio-padrão de 5,8% .

Pela Figura 32 e pela Tabela 13, observa-se que as curvas de recuperação dos padrões de histamina vão decrescendo, conforme o aumento da concentração dos padrões adicionados aos extratos. Todavia, não podemos afirmar que este seja um comportamento padrão, haja visto que em alguns trabalhos consultados (Foo, 1977; Luten, 1981), tal comportamento nem sempre é verificado.

TABELA. 12 - Valores de Recuperação de Padrões de Histamina  
Adicionados em Extratos sem Amostras.

| EXTRATOS SEM<br>AMOSTRAS<br>(25ml) | HISTAMINA<br>ADICIONADA<br>( $\mu$ /ml) | RECUPERAÇÃO<br>( % ) | MÉDIAS<br>DAS<br>RECUPERAÇÕES |
|------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| 1                                  | 25                                      | 100                  |                               |
| 1                                  | 25                                      | 100                  | 100                           |
| 2                                  | 50                                      | 99,8                 |                               |
| 2                                  | 50                                      | 100                  | 99,9                          |
| 3                                  | 100                                     | 100                  |                               |
| 3                                  | 100                                     | 100                  | 100                           |
| 4                                  | 200                                     | 105,9                |                               |
| 4                                  | 200                                     | 100                  | 102,9                         |

TABELA. 13 - Valores de Recuperação de Padrões de Histamina Adicionados em Amostras de Atum e Bonito

| EXTRATOS COM<br>AMOSTRAS CATUMÓ<br>( 10g ) | HISTAMINA<br>ADICIONADA<br>( $\mu$ gHM/10g) | RECUPERAÇÃO<br>( % ) | MÉDIAS<br>DAS<br>RECUPERAÇÕES |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| A1                                         | 25                                          | 100                  | 100                           |
| A1                                         | 25                                          | 100                  |                               |
| A2                                         | 50                                          | 99,5                 | 99,8                          |
| A2                                         | 50                                          | 100                  |                               |
| A3                                         | 100                                         | 93,5                 | 94,0                          |
| A3                                         | 100                                         | 94,4                 |                               |
| A4                                         | 200                                         | 87,8                 | 86,8                          |
| A4                                         | 200                                         | 85,7                 |                               |
| <hr/>                                      |                                             |                      |                               |
| AMOSTRAS DE<br>BONITO                      |                                             |                      |                               |
| B1                                         | 25                                          | 100                  | 100                           |
| B1                                         | 25                                          | 100                  |                               |
| B2                                         | 50                                          | 99,4                 | 99,7                          |
| B2                                         | 50                                          | 100                  |                               |
| B3                                         | 100                                         | 94,4                 | 93,8                          |
| B3                                         | 100                                         | 93,1                 |                               |
| B4                                         | 200                                         | 86,0                 | 85,9                          |
| B4                                         | 200                                         | 85,6                 |                               |
| <hr/>                                      |                                             |                      |                               |
| MÉDIA TOTAL DE RECUPERAÇÃO (N=16) = 95,0   |                                             |                      |                               |
| DESVIO-PADRÃO = 5,8                        |                                             |                      |                               |

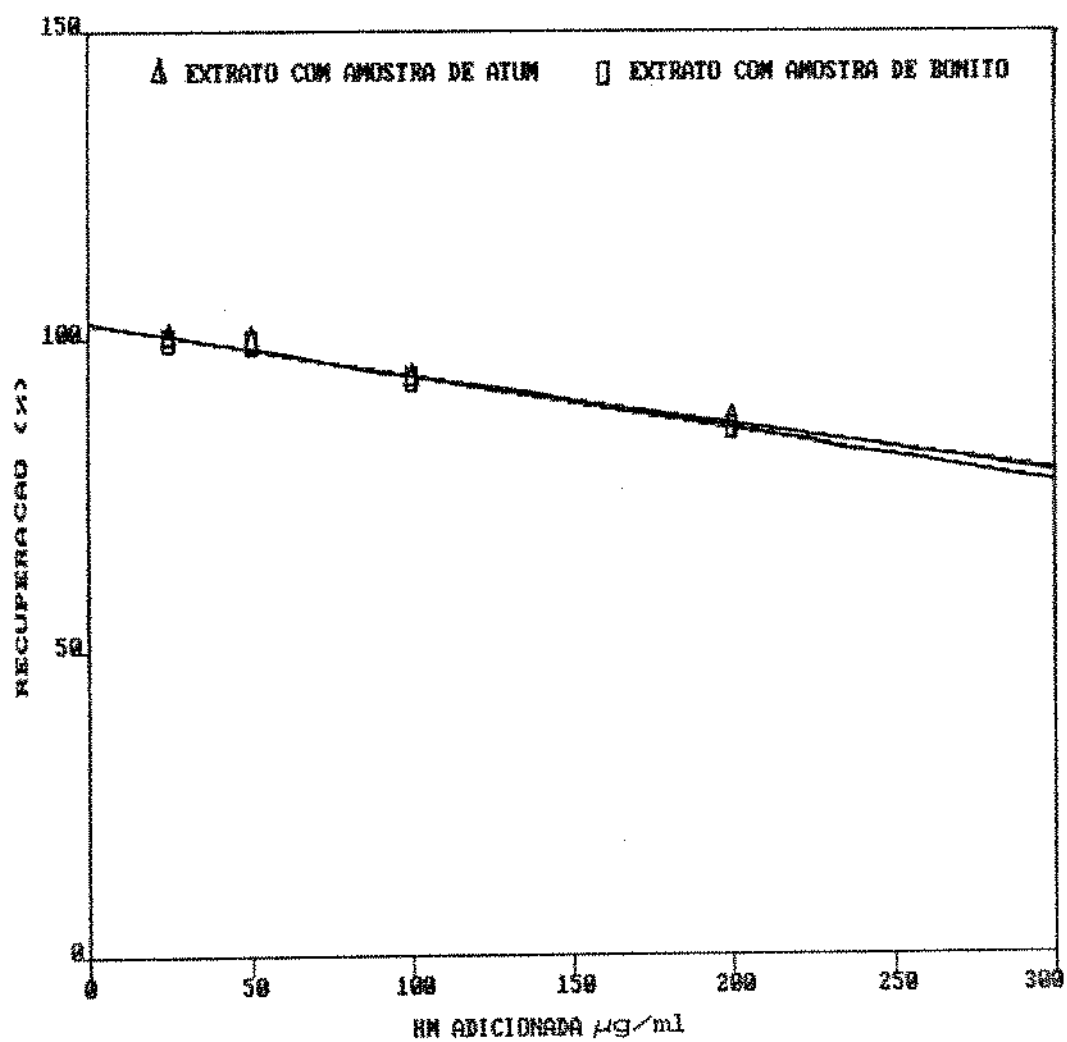


FIGURA 32. - Curvas de Recuperação de Padrões de Histamina em Extratos de Atum e Bonito.

#### 4.5 - REPRODUTIBILIDADE ANALÍTICA DO MÉTODO

Os resultados analíticos e a análise estatística dos dados estão mostrados na Tabela 14

**TABELA 14 - AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE ANALÍTICA DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE ENLATADOS DE ATUM(A) E BONITO(B)**

| AMOSTRAS       | VALORES INDIVIDUAIS<br>ABSORVÂNCIA<br>(420nm)                       | MEDIA | DESVIO-<br>PADRÃO<br>( S ) | COEFICIENTE<br>DE VARIAÇÃO<br>( % ) |
|----------------|---------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------|-------------------------------------|
| A <sub>1</sub> | 0,06; 0,06; 0,06<br>0,06; 0,06; 0,06<br>0,06; 0,06; 0,06<br>0,05    | 0,059 | 0,003                      | 5,4                                 |
| A <sub>2</sub> | 0,09; 0,09; 0,09;<br>0,09; 0,09; 0,08<br>0,08; 0,09; 0,09<br>0,09   | 0,088 | 0,003                      | 3,4                                 |
| A <sub>3</sub> | 0,11; 0,11; 0,11<br>0,11; 0,11; 0,11<br>0,11; 0,12; 0,12<br>0,11    | 0,111 | 0,003                      | 2,7                                 |
| B <sub>1</sub> | 0,11; 0,11; 0,11<br>0,12; 0,12; 0,12<br>0,11; 0,11; 0,12<br>0,11    | 0,115 | 0,005                      | 4,9                                 |
| B <sub>2</sub> | 0,14; 0,14; 0,14<br>0,14; 0,14; 0,14<br>0,15; 0,15; 0,14<br>0,14    | 0,142 | 0,004                      | 2,9                                 |
| B <sub>3</sub> | 0,16; 0,16; 0,16;<br>0,16; 0,15; 0,16;<br>0,16; 0,15; 0,16;<br>0,16 | 0,157 | 0,005                      | 3,2                                 |

Pelos resultados observa-se que os valores de absorbância obtidos para cada amostra estão em boa concordância entre si.

Os desvios-padrão para as amostras de atum foram baixos (0,003), com coeficientes de variação de 5,4%, 3,4%, e 2,7% respectivamente mostrando, assim, que o método tem boa reprodutibilidade.

Com relação às amostras de bonito, os valores do desvio-padrão ficaram entre 0,004 e 0,005 e os coeficientes de variação de 4,3%, 2,9% e 3,2%, respectivamente.

De modo geral, pode-se concluir que os valores dos desvios-padrão e dos respectivos coeficientes de variação das amostras de atum e bonito ficaram bem próximos, mostrando pouca ou nenhuma dispersão entre os valores de absorbância, conferindo ao método uma boa precisão.

#### *4.6 - ESTUDO DO TEOR DE HISTAMINA EM PRODUTOS ENLATADOS DE ATUM, BONITO E SARDINHA.*

A validade e a confiabilidade do método desenvolvido neste trabalho, foram testadas em produtos enlatados de atum, bonito e sardinha, nacionais e importados.

As Tabelas 15, 16 e 17 mostram os resultados dos teores de histamina, obtidos em duplicatas, estando de acordo com aqueles

da literatura (Taylor et alii, 1978).

Mietz & Karmas (1977), encontraram em várias amostras de enlatados de peixe, teores de histamina de 0,1mg a 8,0mg/100g de amostra. Esses valores são semelhantes aos valores de 0,1mg a 5,6mg de histamina/100g de amostra obtidos neste trabalho.

TABELA 15 - TEORES DE HISTAMINA EM AMOSTRAS DE ATUM.

| AMOSTRA | PROCEDÊNCIA | FORMA DE PREPARO | mg HM/100g DE AMOSTRA * |
|---------|-------------|------------------|-------------------------|
| A1      | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,22                    |
| A2      | NACIONAL    | TEMPERADO        | 0,22                    |
| A3      | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,22                    |
| A4      | IMPORTADO   | TEMPERADO        | 0,22                    |
| A5      | NACIONAL    | GRATED           | 0,10                    |
| A6      | NACIONAL    | GRATED           | 0,12                    |
| A7      | NACIONAL    | GRATED           | 0,10                    |
| A8      | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,20                    |
| A9      | NACIONAL    | GRATED           | 0,30                    |
| A10     | NACIONAL    | GRATED           | 0,20                    |
| A11     | IMPORTADO   | SÓLIDO           | 0,20                    |
| A12     | IMPORTADO   | SÓLIDO           | 0,30                    |
| A13     | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,50                    |

(\*) MÉDIAS DE DUPLICATAS

Pelas Tabelas 15, 16 e 17, observa-se que as amostras de atum, bonito e sardinha analisadas apresentaram baixos teores de histamina, inferiores aos limites de concentrações consideradas perigosas para o consumo humano.

Observa-se, também, que houve uma considerável diferença nos teores de histamina detectados nas diferentes amostras de atum, bonito e sardinha.

TABELA 16 - TEORES DE HISTAMINA EM AMOSTRAS DE BONITO.

| AMOSTRAS | PROCEDÊNCIA | FORMA DE PREPARO | mg HM/100g DE AMOSTRA * |
|----------|-------------|------------------|-------------------------|
| B1       | NACIONAL    | "GRATED"         | 5,60                    |
| B2       | IMPORTADO   | "GRATED"         | 0,23                    |
| B3       | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,11                    |
| B4       | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,22                    |
| B5       | IMPORTADO   | "GRATED"         | 0,40                    |
| B6       | IMPORTADO   | "GRATED"         | 0,30                    |
| B7       | IMPORTADO   | "GRATED"         | 0,54                    |
| B8       | IMPORTADO   | "GRATED"         | 0,82                    |
| B9       | IMPORTADO   | "GRATED"         | 0,96                    |
| B10      | IMPORTADO   | "GRATED"         | 0,82                    |
| B11      | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,54                    |

(\*) MÉDIAS DE DUPLICATAS

TABELA 17 - TEORES DE HISTAMINA EM AMOSTRAS DE SARDINHA.

| AMOSTRAS | PROCEDÊNCIA | FORMA DE PREPARO | mg HM/100g DE AMOSTRA * |
|----------|-------------|------------------|-------------------------|
| S1       | NACIONAL    | TEMPERADO        | 0,40                    |
| S2       | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,30                    |
| S3       | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,20                    |
| S4       | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,20                    |
| S5       | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,20                    |
| S6       | NACIONAL    | TEMPERADO        | 0,30                    |
| S7       | NACIONAL    | TEMPERADO        | 0,50                    |
| S8       | NACIONAL    | SÓLIDO           | 0,60                    |
| S9       | NACIONAL    | TEMPERADO        | 1,00                    |
| S10      | NACIONAL    | TEMPERADO        | 0,50                    |

(\*) MÉDIAS DE DUPLICATAS

## 5 - CONCLUSÕES:

- O método apresentou uma excelente reprodutibilidade, com coeficientes de variação de 5,4%, 3,4% e 2,7% para amostras de atum e 4,3%, 2,9% e 3,2% para amostras de bonito.

- O valor médio de recuperação obtido com o método foi de 95,0%, considerado bom, comparado com a maioria dos métodos citados na literatura.

- A sensibilidade do método permite a quantificação da histamina em níveis acima de 0,1mg/100g de amostra.

Os resultados obtidos neste trabalho foram viabilizados principalmente em função:

- Da utilização de uma mistura de solução de NaCl 20% e HCl 2,5%, que não permite a adsorção da histamina às paredes dos tubos de vidro, proporcionando, assim, uma boa recuperação da mesma;

- Do uso de n-butanol saturado com água, empregado na etapa de pré-purificação dos extratos;

- Otimização das condições de análise, como o uso de tolueno/n-butanol e HCl na etapa de purificação do complexo TNBS-HM permitindo, assim, a eliminação de todas as substâncias interferentes.

É interessante ressaltar que os custos com vidrarias e reagentes são baixos; os reagentes considerados mais caros são o TNBS e a N,N-DMFM, cujas quantidades consumidas são mínimas, não chegando a comprometer a aplicabilidade do método.

O método pode ser aplicado, na indústria ou em instituição de pesquisa que dispõe de um espectrofotômetro para medidas no espectro visível, aparelho simples e barato em relação a outros (fluorímetro ou cromatógrafo).

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABABOUC, L.; ALAQUI, M.M. & BUSTA, F.F. - Histamine levels in commercially processed fish in Morocco. *Journal of Food Protection*, 49 (11): 904-908, 1986.
- A.O.A.C., - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington D.C. 1980, 1094p.
- ARNOLD, S. H. & BROWN, W.D - Histamine (?) toxicity from fish products. *Advances in Food Research*, 24: 114-147, 1978.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S; BARONI, J.S.  
*Química analítica quantitativa elementar*. São Paulo, Edgard Blücher, 1979. p.3-26.
- BALDINI, V.L.S. - Aminas biogênicas e a deterioração do pescado *Boletim do ITAL*, Campinas, 19 (4): 389-402, 1982.
- BALDRATI, G.; FORNARI, M.B.; SPOTTI, E.; INCERT, I. - Enfluenza della temperatura sulla formazione d'istamina in pesci ad elevato contenuto d'istidina libera. *Industria Conserve*, 55: 144-122, 1980.

343-348, 1981.

GILMAN, A.G. & GOODMAN, L.S. - As bases farmacológicas da  
terapêutica 7.ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 1987  
cap.26, p.396-417.

GOUYGOU, J.P. - High pressure liquid chromatography determination  
of histamine in fish. *Journal of Food Science*, 52 (4):  
925-928, 1987.

HABEEB, A.F.S. - Determination of free amino groups in proteins  
by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*,  
14: 328-336, 1966.

HAKANSON, R ; RÖNNBERG, A.L.; STÖLUND, K. - Fluorometric  
determination of histamine with OPT: optimum reaction  
conditions and tests of identity. *Analytical Biochemistry*,  
47: 356-370, 1972.

HAKANSON, R.; RÖNNBERG, A.L.; SJÖLUND, K. - Improved fluorometric  
assay of histidine and peptides having NH<sub>2</sub>-terminal histidine  
using o-phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 59: 98-109, 1974.

HAKANSON, R. & RÖNNBERG, A.L. - Improved fluorometric assay of  
histamine : condensation with o-phthalaldehyde at -20°C.  
*Analytical Biochemistry*, 60: 560-567, 1974.

- HARDY, R. & SMITH, G.M. - The storage of mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity. *Journal Science of Food Agriculture*, 27: 595-599, 1976.
- HENION, J.D. - Capillary gas chromatographic - Mass spectrometric determination of histamine in tuna fish causing scombroid poisoning. *Journal Chromatography*, 213: 475-480, 1981.
- HORWITZ, W.(ed). - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13.ed. Washington D.C. A.O.A.C, 1975. p. 294-296.
- IENISTEA, C. - Significance and detection of histamine in Food. In: HOOBS, B.C. & CHRISTIAN, J.H.B The microbiological safety of food. London, Academic Press. 1973. p. 327-342.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (ICMSF). - Microorganisms in Foods: Their Significance and Methods of Enumeration. 2.ed. Toronto, 1978. 434p, v.1.
- JONES, R. - Chemistry, isolation of histamine. In: FARAH, A. ed. Handbook of experimental pharmacology. New York, Syracuse 1966. v. 18/1, chap.1.
- KAKADE, M.L. & LIENER, I.E. - Determination of available lysine in proteins. *Analytical Biochemistry*, 27: 273-280, 1969.

BARANOWSKI, P.; BRUST, P.A.; FRANK, H.A. - Growth of klebsiella pneumoniae UH - 2 and properties of its histidine decarboxylase system in resting cells. *Journal of Food Biochemistry*, 9: 349-360, 1985.

BARANOWSKI, J. - Methodology for histamine analysis. In: FAO. *Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation*. Rome, Food and Agriculture Organization, 1985. p.4-9 (FAO Fisheries Technical, 252).

BENJAMIN, D.M.; McCOMARCK, J.J.; GUMP, D.W. - Use of newer amino group reagents for the detection and determination of kanamycin. *Analytical Chemistry*, 45 (8): 1531-1534, 1973.

BOSTOCK, T; GONZALEZ, A.L.; SALAS, A. - Observaciones iniciales sobre el desarrollo post-mortem de aminas biogenas en pescado pequeno pelagico del Peru. In: CONSULTA DE EXPERTOS SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUCTOS PESQUEROS EN AAMERICA LATINA, 2. Montevideo, Uruguay, Diciembre, 1989.

BURGER, W.C. - Interference by carbonyl compounds in the trinitrobenzenesulfonic acid method for amino groups. *Analytical Biochemistry*, 57: 306-309, 1974.

CARPENTER, K.J. - The estimation of the available lysine in animal protein foods. *Biochemistry Journal*, 77: 604, 1960.

- CATTANEO, P. & CANTONI, C. - Indentificazione e dosaggio rapido dell'istamina nelle carne di pesce. *Industrie Alimentare*, 17: 303-307, 1978.
- CHU, C.H. & BJELDANES, F. - Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. *Journal of Food Science*, 47: 79-88, 1981.
- CODE, C.F. & MCINTIRE, C. - Quantitative determination of histamine. *Methods of Biochemical Analysis*, 3: 49-95, 1956.
- CORLETT, Jr.A.; JEFREY, M.B.; NIVEN, Jr.C.F. - Identification of histamine forming bacterial from scombroid fish. Abstract of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 78: 192, 1978.
- COSTAS, F.B. & GONZALEZ, A.L. - Determinación del contenido de histamina em pescado utilizando un método combinado de TLC Y HPLC. *Alimentaria*, 26 (207): 39-40, 1989.
- EDMUNDS, W.J. & EITENMILLER, R.R. - Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine descarxylase activity of aquatic species. *Journal of Food Science*, 40: 516-519, 1975.
- EITENMILLER, R.R; WALLIS, J.W.; ORR, J.H. - Production of histidine decarboxylase and histamine by Proteus morganii.

Journal of Food Protection, 44: 815-820, 1981.

FINAR, I.L. - Compuestos heterocíclicos com más de un heteroátomo. In: FINAR, I.L. - Estereoquímica y química de los productos naturales. 2.ed. Madrid, Ed. Alhambras, 1970. cap 12.

FOO, L.Y. - Scombroid poisoning. Isolation and identification of 'Saurine'. Journal Science of Food Agriculture, 27: 807-810, 1976.

FOO, L.Y. - Simple and rapid paper chromatographic method for the simultaneous determination of histidine and histamine in fish samples. Journal of the A.O.A.C., 60 (1): 183-185, 1977.

FRANK, H.A. - Histamine-Forming bacteria in tuna and other marine fish. In: FAO. Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. Rome, Food and Agriculture Organization, 1985. p.2-3. (FAO Fisheries Technical)

FREEDMAN, R.B. & RADDA, G.K. - The reaction of 2,4,6-trinitro benzenesulphonic acid with amino acids, peptides and proteins. Biochemistry Journal, 108: 383-390, 1968.

FRIEDMAN, M. & NOMA, A.T. - Histamine analysis on a single column amino acid analyzer. Journal of Chromatography, 219:

- LEITAO, M.F.F. - Histamina em pescado e outros alimentos de origem animal. Boletim do ITAL, Campinas, 17: (2):121-133, 1980.
- LEITAO, M.F.F.; BALDINE, V.L.S.; SALES, A.M. - Histamina em pescado e alimentos industrializados. Coletânea do ITAL 13: 123-130, 1983a.
- LEITAO, M.F.F.; BALDINI, V.L.S.; UBOLDIEIROA, M.N.; DESTRO, M.T. Bactérias produtoras de histamina em pescado de origem marinha. Coletânea do ITAL 13: 83-98, 1983
- LERKE, P.A. & BELL, L.D. - A rapid fluorometric method for the determination of histamine in canned tuna. Journal of Food Science, 41: 1282-1284, 1976.
- LIEBER, E.R. & TAYLOR, S.L. - Thin-layer chromatographic screening methods for histamine in tuna fish. Journal of Chromatography, 153: 143-152, 1978a.
- LIEBER, E.R. & TAYLOR, S.L. - Comparison of thin-layer chromatographic detection methods for histamine from food extracts. Journal of Chromatography, 160: 227-237, 1978b.
- LIN, J.S.; BARANOWSKI, J.D.; OLCOTT, H.S. - Rapid thin-layer chromatographic-densitometric determination of histamine in tuna. Journal of Chromatography, 130: 426-430, 1977.

- LUTEN, J.B. - An automated fluorimetric method for the determination of histamine in canned fish products. *Journal of Food Science*, 46: 958-959, 1981.
- MIETZ, J.L. & KARMAS, E. - Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 42: 155-158, 1977.
- MOKRASCH, L.C. - Use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the estimation of amines, amino acids, and proteins in mixtures. *Analytical Biochemistry*, 18: 64-71, 1967.
- MORII, H.; CANN, D.C.; TAYLOR, L.Y. - Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 299-305, 1988.
- NAKAMURA, H. & PISANO, J.J. - Detection of compounds with primary amino groups on thin-layer plates by dipping in a fluorescamine solution. *Journal of Chromatography*, 121: 79-81, 1976.
- NAKAMURA, H. - Thin-layer chromatography of histidine, histamine and histidyl peptides at picomole level using a unique fluorogenic reaction with fluorescamine. *Journal of Chromatography*, 131: 215-222, 1977.
- NEWMAN, P.M. & TURNBULL J.H. - A new colorimetric method for the estimation of histidine and histamine. *Biochemistry Journal*,

74: 379-382, 1960.

OKUZUMI, M.; OKUDA, S.; AWANO, M. - Occurrence of psychrophilic and halophylic histamine-forming bacteria (N-group bacteria) on/in red meat fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48 (6): 799-804, 1982.

OMURA, Y.; PRICE, R.J.; OLCOOT, H.S. - Histamine-Forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. *Journal of Food Science*, 43: 1779-1781, 1978.

PAN, S.B.; KUO, J.M.; LUO, L.J.; YANG, H.M. - Effect of endogenous proteinases on histamine and honeycomb formation in mackerel. *Journal of Food Biochemistry*, 10: 305-309, 1986

RIEDER, N.B.; GOERTZ, N.I.; HALL, J.D.; EIDSON, M.; HULL, H.F. Scombroid fish poisoning. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, Novo Mexico, 37 (29): 451, 1988.

RÖNNBERG, A.L.; HANSSON, C.; DRÄKENBERG, T.; HAKANSON, R. - Reaction of histamine with o-phthalaldehyde: isolation and analysis of the fluorophore. *Analytical Biochemistry*, 139: 329-337, 1984a.

RÖNNBERG, A.L.; HANSSON, C.; HAKANSON, R. - High-performance liquid chromatographic determination of histamine in biological samples after derivation with o-phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 139: 338-344, 1984b.

- SAGER, O.S & HORWITZ, W. - A chemical method for the determination of histamine in canned tuna fish. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 40 (3): 892-904, 1957.
- SALGUEIRO, J.F. & MACKIE, I.M. - Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (Melanogrammus aeglefinus) and herring (Clupea harengus) as determined by the formation of non-volatile and volatile aminas. *International Journal of Food Science and Technology*, 22: 385-390, 1987a.
- SALGUEIRO, J.F. & MACKIE, I.M. - Technical note: preliminary survey of the content of histamine and other canned fish. *International Journal of Food Science and Technology*, 22: 409-412, 1987b.
- SCHUTZ, D.E.; CHANG, G.W.; BJELDANES, L.F. - Rapid thin chromatographic method for the detection of histamine in fish products. *Journal of the A.O.A.C.*, 59 (6): 1224-1225, 1976.
- SHORE, P.A. - Fluorometric assay of histamine. *Method Enzimology* 17 (Pt. B): 842-845, 1959.
- STARUSZKIEWICZ, W.F. - Fluorometric determination of histamine in tuna: collaborative study. *Journal of the A.O.A.C.*, 60 (5): 1132-1136, 1977.

- STARUSZKIEWICZ, W.F.; WALDRON, E.M.; BOND, J.F. - Fluorometric determination of histamine in tuna: development of method. *Journal of the A.O.A.C.*, 60 (5): 1125-1130, 1977.
- STARUSZKIEWICZ, W.F. & BOND, J.F. - Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in foods. *Journal of the A.O.A.C.*, 64 (3): 584-591, 1981.
- SCHWARTZMAN, R.M. - Quantitative thin-layer chromatography of histamine and its metabolites. *Journal of Chromatography*, 86: 263-268, 1973.
- TAYLOR, S.L & LIEBER, E.R. - Specificity and sensitivity of seven histamine detection methods. *Journal of Food Science*, 42 (6): 1584-1586, 1977.
- TAYLOR, S.L. - Marine toxins of microbial origin. *Food Technology* 42 (3): 94-98, 1988.
- TAYLOR, S.L.; LIEBER, E.R.; LEATHERWOOD, M. - A simplified method for histamine analysis of foods. *Journal of Food Science*, 43: 247-250, 1978.
- TAYLOR, S.L. - Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. *Wisconsin, World Health Organization Food Research Institute*, 1985. 47p.

- UDENFRIEND, S.; STEIN, S.; BOHLEN, P.; DAIRMAN, W. - Fluorescamine a reagent for assay of amino acids, proteins and primary amines in the picomole range. *Science*, 178: 871-872, 1972.
- VOLK, K. & GEMMER, H. - Schneller nachweis von histamin in fischen und fischerzeugnissen mittels HPLC. *Fleischwirtschaft*, 62 (5): 587-589, 1982.
- WADA, S.; TAKADA, M.; KOIZUMI, C. - Quantitative analysis of histamine in marine food products by gas liquid chromatography *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48 (11): 1657-1661, 1982.
- WALTERS, M.J. - Determination of histamine in fish by liquid chromatography with post-column reaction and fluorometric detection. *Journal of the A.O.A.C.*, 67 (6): 1040-1043, 1984.
- WILLIAMS, D.W. - Histamine as a chemical index of decomposition in fish. *Journal of the A.O.A.C.*, 43 (2): 431-433, 1960.
- WILLIAMS, D.W. - Report on chemical indices of decomposition in fish (Histamine). *Journal of the A.O.A.C.*, 37 (3): 567-572, 1954.