

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da Estabilidade Térmica de Histamina em
Conservas de Pescado por CLAE**

Rodrigo Domingos Overa Tavares

2012



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

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE HISTAMINA EM
CONSERVAS DE PESCADO POR CLAE**

RODRIGO DOMINGOS OVERA TAVARES

Sob a Orientação da Professora
Angela Aparecida Lemos Furtado

e Co-orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

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

Seropédica, RJ
Junho de 2012

664.94
T231a
T

Tavares, Rodrigo Domingos Overa,
1986-

Avaliação da estabilidade térmica
de histamina em conservas de pescado
por CLAE / Rodrigo Domingos Overa
Tavares - 2012.

52 f.: il.

Orientador: Angela Aparecida
Lemos Furtado.

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

Bibliografia: f. 43-52.

1. Pescados - Contaminação -
Teses. 2. Pescados - Processamento -
Teses. 3. Pescados - Conservação -
Teses. 4. Histamina - Teses 5.
Tecnologia de alimentos - Teses. I.
Furtado, Angela Aparecida Lemos,
1963-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III.
Título.

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

RODRIGO DOMINGOS OVERA TAVARES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ----/----/----- (Data da defesa)

Angela Aparecida Lemos Furtado D.Sc. EMBRAPA - CTAA
(Orientadora)

Simone Pereira Mathias D.Sc. UFRRJ

Eliane Teixeira Mársico D.Sc. UFF

Renata Galhardo Borguini D.Sc. EMBRAPA - CTAA
(Suplente)

Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa D.Sc. UFRRJ
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

É de fundamental importância agradecer a Deus por toda proteção durante a realização do Mestrado, bem como a superação das dificuldades encontradas no desenvolvimento da pesquisa técnico-científica, o que me proporcionou um grande crescimento pessoal e acadêmico.

A minha família: Maria Elvira (mãe), Paulo Cesar (pai), Paulo Rogério (irmão), Geny (avó), Vera (avó) e Luiza (avó), por todo apoio em mais uma etapa da vida.

A minha namorada Josi, por todo amor e carinho investidos, além do seu conhecimento profissional na área de Química.

Aos meus amigos: Andres Vazquez, Bruno Fazio, Carina Quirino, Caroline Ferreira, Daniel da Costa, Fábio Provenzano, Marcella Matos, Marcelo Magela, Rafael Xavier, Rodrigo Hara, Thiago Marinho e Vitor Rangel, por toda amizade de sempre.

Aos novos amigos do Mestrado: Felipe Reis, Kelita Andrade, Luciana Moura e, a amiga do período de graduação e pós-graduação, Gabriela do Amaral.

À Profa. D.Sc. Angela Aparecida Lemos Furtado (orientadora) por todo auxílio investido no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (co-orientador) por todo apoio empregado na realização do Mestrado e todos os ensinamentos acerca da Cromatografia Líquida.

Ao Prof. D.Sc. Robson Maia Franco por ter viabilizado a realização de análise bacteriológica no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da UFF, além de todo carisma que lhe é característico.

Ao aluno de Doutorado Daniel Filisberto Schulz, por todo conhecimento transmitido na realização da análise de histamina.

A todos os funcionários do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos: Jeane da Rosa, Luzimar do Nascimento, Manuela Santiago, Renata Borguini e Sidney Pacheco.

A todos estagiários e alunos de pós-graduação que fazem parte da equipe de apoio do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Ao apoio financeiro fornecido pela Capes durante todo o período de realização do Mestrado.

RESUMO

TAVARES, Rodrigo Domingos Overa. **Avaliação da Estabilidade Térmica de Histamina em Conservas de Pescado por CLAE**. 2012. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A histamina [4-(2-aminoetil)imidazol] é uma amina biogênica não-volátil e sintetizada pela descarboxilação do aminoácido L-histidina livre. A presença de bactérias histidina descarboxilase, altas temperaturas e manipulação em condições higiênico-sanitárias inadequadas, são fatores que viabilizam a biossíntese de histamina. A histamina tem como característica importante a sua termorresistência pois, uma vez sintetizada, não se degrada através do processo de apertização, cozimento, congelamento ou, qualquer outro tipo de tratamento nas etapas de pós-captura. Essa amina pode estar presente no pescado e em produtos fermentados (e.g. vinho, cerveja, queijo, etc.) mas tem o pescado como principal alimento envolvido em episódios de intoxicação. A ingestão de altas concentrações de histamina pode originar sintomas como náuseas, cefaleia, diarreia, prurido e rubor facial, principalmente em indivíduos susceptíveis. Cabe destacar que os peixes com altos índices de histamina, na maioria das vezes, não possuem alterações sensoriais porém, há relatos do desenvolvimento de sabor picante ou metálico no consumo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processamento térmico na degradação de histamina em pescado. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada como método de detecção e quantificação de histamina. A metodologia de extração consistiu em utilizar metanol e para a detecção do analito, a alíquota presente em “vial” foi derivatizada com o reagente 6-aminoquinolil-*N*-hydroxisuccinimidil carbamato (AQC). As amostras analisadas apresentaram concentrações de histamina na faixa de 1,05 – 2,94mg kg⁻¹, ou seja, bem abaixo da legislação vigente, que corresponde a 100mg kg⁻¹. Houve redução na concentração de histamina em comparação ao filé *in natura* e a conserva enlatada. Tal fato pode ser justificado pela solubilidade da histamina no líquido de cobertura e de imersão dos filés. As amostras também foram submetidas a contagem de bactérias histidina descarboxilase. Os valores de 4,60 e 1,80 log UFC g⁻¹ correspondem a contagem em amostra de filé de pescado híbrido e de atum, respectivamente. O monitoramento dos teores de histamina visa ratificar a segurança alimentar para o consumidor. Além disso, medidas de ação preventiva e corretiva preconizadas pelo sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) devem ser adotadas na indústria pesqueira a fim de fornecer alimentos inócuos.

Palavras-chave: histamina, intoxicação escombróide, pescado.

ABSTRACT

TAVARES, Rodrigo Domingos Overa. **Assessment of Thermal Stability of Histamine in Canned Fish by HPLC**. 2012. 52p. Dissertation (Master's degree in Science and Food Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Histamine [4-(2-aminoethyl) imidazole] is a biogenic amine and nonvolatile synthesized by decarboxylation of free L-histidine. The presence of bacterial histidine decarboxylase, high temperatures and manipulation in inadequate sanitary conditions, are factors that enable the biosynthesis of histamine. Histamine has an important feature for its heat resistance, once synthesized, cannot be degraded through the process of sterilization, cooking, freezing, or any other type of treatment that may suffer from post-capture. This amine can be present in fish and fermented products (e.g. wine, beer, cheese, etc.) however, fish is the main food involved. Ingestion of high concentrations of histamine may cause the appearance of symptoms such as nausea, headache, diarrhea, itching and flushing, especially in susceptible individuals. It should be noted that fish with high levels of histamine, in most of cases do not have sensory changes but there are reports of development of spicy or metallic flavor. The main goal of this survey was to assess the effect of thermal processing on degradation of histamine in fish. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used as a method of detection and quantification of histamine. The extraction methodology was performed using methanol and for the detection of analyte present in the aliquot of the vial was derivatized with the reagent 6-aminoquinolyl-hydroxysuccinimidyl-*N*-carbamate (AQC). The analyzed samples showed concentrations of histamine in the range 1.05 to 2.94mg kg⁻¹, in other words below the current legislation, which corresponds to 100mg kg⁻¹. There was a reduction in the concentration of histamine in comparison to fresh and canned fish. This fact can be explained by the solubility of histamine in covering liquid and dipping of fillets. The samples were also submitted to bacterial count of histidine decarboxylase. The values of 4.60 and 1.80 log CFU g⁻¹ correspond to a sample of hybrid fish fillet and tuna, respectively. Monitoring the levels of histamine aims to ratify the food safety for consumers. In addition, preventive measures and corrective action recommended by the system of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) must be taken in the fishing industry to provide harmless food.

Keywords: histamine, scombroid poisoning, fish.

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

Aa	atividade de gua
AcN	acetonitrila
AMQ	6-aminoquinolina
ANOVA	análise de variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AQC	6-aminoquinolil- <i>N</i> -hidroxisuccinimidil carbamato
C	valor de Cochran calculado
CaCO ₃	carbonato de cálcio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	centímetro
CO ₂	dixido de carbono
CV	coeficiente de variao
<i>D</i>	tempo de reduo decimal
DAD	detector de arranjo de diodos
DAO	diaminoxidase
dc	variao da concentrao
DPR	desvio padro relativo
dx	variao da resposta
EC	Eletroforese Capilar
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
<i>F</i> ₀	Taxa de letalidade
G	valor de Grubbs calculado
g	grama
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HCl	cido clorídrico
HClO ₄	cido perclórico
HMT	histamina metiltransferase
H ₂ O	gua
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgE	Imunoglobulina E
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalizao e Qualidade Industrial
kg	quilograma
L	litro
m	metro
M	molar
MAO	monoaminoxidase
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar

mm	milímetro
MS	Mato Grosso do Sul
MΩ	megaohm
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
nm	nanômetro
OPA	<i>O</i> -ftalaldeído
pH	potencial hidrogeniônico
ppb	parte por bilhão
PCR	Polymerase Chain Reaction
RJ	Rio de Janeiro
r^2	coeficiente de correlação linear
S_1	desvio padrão do ponto da curva de calibração
S_2	sensibilidade
$\sum S^2$	soma de todas as variâncias
S_{\max}^2	maior variância
SNC	Sistema Nervoso Central
SSP	Solução Salina Peptonada
TCA	ácido tricloroacético
TOC	Total Organic Carbon
t_R	tempo de retenção
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	ultravioleta
Vis	luz visível
x_i	valor discrepante
\bar{x}	média aritmética dos valores do ponto da curva de calibração
°C	grau Celsius
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas das principais aminas biogênicas em alimentos (ÖNAL, 2007).	4
Figura 2 - Vias metabólicas de inativação da histamina (GOUVEIA, 2009).	7
Figura 3 - Descarboxilação de histidina pela histidina descarboxilase.	8
Figura 4 - Reação de derivatização e de hidrólise do reagente AQC, respectivamente (COHEN & MICHAUD, 1993).	19
Figura 5 - Fluxograma das etapas do processamento do filé de pescado.	21
Figura 6 - Esquema de metodologia aplicada em extração de histamina.	23
Figura 7 - Esquema de diluições seriadas em análise bacteriológica.	28
Figura 8 - Gráficos do processo de apertização de conservas enlatadas.	30
Figura 9 - Cromatograma do padrão de histamina na concentração de $120\mu\text{g mL}^{-1}$. A seta indica o pico referente ao padrão de histamina.	32
Figura 10 - Cromatograma do branco do reagente.	33
Figura 11 - Cromatogramas referentes à amostra de filé de pescado híbrido <i>in natura</i> . A seta evidencia o pico referente à histamina.	34
Figura 12 - Cromatograma correspondente à amostra de filé de pescado híbrido <i>in natura</i> com adição-padrão. A seta indica o pico referente à histamina com adição-padrão.	35
Figura 13 - Curva de calibração por padronização externa.	35
Figura 14 - Gráfico de resíduos dos pontos da curva de calibração.	36
Figura 15 - Representação de crescimento de bactérias histidina descarboxilase em amostra de filé de pescado <i>in natura</i> e ausência em conserva enlatada.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas aplicadas em método de eluição em gradiente.	22
Tabela 2 - Concentrações de histamina (mg kg^{-1}) em amostras de pescado pré e pós-processado.	37
Tabela 3 - Contagem de bactérias histidina descarboxilase em pescado pré e pós-processado ($\log \text{UFC g}^{-1}$).	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais espécies de atum e características morfológicas.	13
Quadro 2 - Valores correspondentes à composição química do atum e derivados.	14

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Aminas Biogênicas	2
2.2 Histamina	5
2.2.1 Vias metabólicas da histamina	6
2.3 Formação de Histamina nos Alimentos	8
2.4 Legislação	10
2.5 Cachara (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>)	11
2.6 Pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>)	11
2.7 Atum (<i>Thunnus</i> spp.)	12
2.8 Processamento Térmico	14
2.9 Métodos Analíticos	15
2.9.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	16
2.9.2 Eletroforese capilar (EC)	16
2.9.3 Cromatografia gasosa (CG)	17
2.9.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	17
2.10 Agentes de Derivatização em Análise por CLAE	18
2.11 6-aminoquinolil- <i>N</i> -hidroxisuccinimidil Carbamato (AQC)	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Matéria-prima	20
3.2 Processamento das Amostras	20
3.2.1 Filé do Pescado em Conserva	20
3.3 Análise em Laboratório	22
3.3.1 Análise de histamina por técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	22
3.3.1.1 Preparo de solução-padrão	22
3.3.1.2 Preparo de amostra	23
3.3.1.3 Reação de derivatização	23
3.3.2 Parâmetros de validação em método analítico	24
3.3.2.1 Linearidade	24
3.3.2.2 Faixa de trabalho	25
3.3.2.3 Sensibilidade	25
3.3.2.4 Limite de detecção	26
3.3.2.5 Limite de quantificação	26
3.3.2.6 Repetitividade	26
3.3.3 Análise estatística dos resultados	26
3.3.4 Análise Bacteriológica	27
3.3.4.1 Preparo de soluções	27
3.3.4.2 Preparo de amostra	27
3.3.4.3 Coloração de Gram	28

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Processamento Térmico	30
4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	32
4.3 Parâmetros de Validação	35
4.3.1 Linearidade	35
4.3.2 Sensibilidade	36
4.3.3 Limite de detecção	37
4.3.4 Limite de quantificação	37
4.3.5 Repetitividade	37
4.4 Resultados de Análise de Histamina das Amostras por CLAE	37
4.5 Contagem de Bactérias Histidina Descarboxilase	39
5 CONCLUSÕES	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O pescado corresponde, a denominação genérica regulamentada em Decreto lei, aos animais que habitam a água doce ou salgada e neste grupo encontram-se peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e alguns mamíferos utilizados na alimentação humana.

As características físico-químicas e microbiológicas, tornam o pescado o produto de origem animal mais susceptível ao processo deteriorativo, por apresentar um valor de pH próximo da neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos e alto teor de nutrientes disponíveis para a atividade microbiana.

Em função da maior possibilidade de alterações, há necessidade de melhor controle na cadeia do frio desde a captura até a comercialização. Para o processo de industrialização, a matéria-prima deve passar por uma criteriosa inspeção a fim de avaliar aspectos como: escamas brilhantes bem aderentes a pele e nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados; carne firme com consistência elástica; cor própria à espécie; vísceras íntegras perfeitamente diferenciadas. A musculatura da parede abdominal não deve apresentar sinais de autólise; odor específico lembrando o de plantas marinhas; superfície do corpo limpo com relativo brilho metálico; olhos transparentes, brilhantes e salientes ocupando completamente as órbitas; brânquias róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes; ventre roliço e firme não deixando impressão duradoura a pressão dos dedos; anus fechado (BRASIL, 1997).

A microbiota presente, com destaque para as bactérias histidina descarboxilase, são as responsáveis pela síntese dessa amina biogênica. Na intoxicação escombróide, também conhecida como envenenamento por histamina de peixe (*histamine fish poisoning*), a ingestão de alimentos contendo altos teores de histamina provenientes da atividade de degradação da L-histidina por descarboxilases microbianas e outras substâncias relacionadas, provoca o aparecimento de sinais e sintomas relacionados a hiperestimulação histaminérgica, como, dores abdominais, diarreia, “rash” cutâneo, dores de cabeça, hipotensão arterial, palpitações, etc. Apesar de raramente fatal, a intoxicação escombróide debilita bastante o paciente, requerendo cuidados médicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processamento térmico na degradação da histamina em pescado. A quantificação de histamina foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aminas Biogênicas

As aminas biogênicas são definidas de forma geral como bases orgânicas de baixo peso molecular (alifáticas ou heterocíclicas), biologicamente ativas (FADDA, 2001; HÁLASZ, 1994; LIMA; GLÓRIA, 1999; GENNARO, 2003) que atuam sobre o sistema nervoso central e vascular. Neste grupo encontram-se as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina), a serotonina, e outras aminas (BOURGEIOS & LARPENT, 1994).

São metabólitos responsáveis por regular diversas funções fisiológicas em plantas, animais e microrganismos, desempenhando papéis essenciais na manutenção da homeostasia. Por essa razão, são metabólitos secundários amplamente encontrados em alimentos (BARDÓCZ, 1995).

Na área de alimentos, o termo aminas biogênicas é usado para designar o grupo de aminas não voláteis como a histamina, cadaverina, espermina, putrescina, tiramina e triptamina (BOURGEIOS & LARPENT, 1994).

Estas são formadas e degradadas como resultado normal do processo metabólico nos animais, plantas e microrganismos geralmente produzidos pela descarboxilação de aminoácidos, mas também pela aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (BELITZ & GROSCHE, 1997; HÁLASZ et al., 1994; SILLA SANTOS, 1996; SMITH, 1981; BRINK, 1990).

As aminas serotonina, histamina e tiramina desempenham papéis importantes em muitas funções fisiológicas humanas e animais (HÁLASZ et al., 1994). A tiramina promove a inibição da monoaminoxidase, o que acarreta em aumento da pressão vascular, a triptamina inibe a diaminoxidase e, a β -feniletilamina tem ação inibitória sobre ambas as aminoxidases (STRATTON et al., 1991).

As aminas são essenciais para o crescimento e saúde, porém, se presentes no alimento em altas concentrações podem causar efeitos adversos, sendo acentuados em indivíduos sensíveis ou submetidos a tratamento com fármacos inibidores da monoaminoxidase (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Podem estar presentes em diversos alimentos e bebidas (e.g. vinho e cerveja), principalmente em alimentos com altos níveis de proteína e produtos fermentados (e.g. queijo, salame, etc.) (KOVÁCS, SIMON-SARKADI & GANZLER, 1999).

Os principais problemas alimentares causados por aminas biogênicas são a intoxicação por histamina, também conhecida como envenenamento escombróide (na literatura em língua inglesa o termo é “scombroid poisoning”), e a intoxicação por tiramina, normalmente causada após a ingestão de queijos (GOSETTI et al., 2007). Além disso, outras aminas formadas por processos metabólicos em alimentos estão envolvidas nessas duas síndromes, potencializando a ação da histamina e da tiramina.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação de aminas biogênicas em alimentos, de forma a prevenir que alimentos com altos índices dessas substâncias cheguem à mesa do consumidor (VALLÉ; MALLE; BOUQUELET, 1997; HERNÁNDEZ-ORTE, 2006; GOSETTI et al., 2007; SIMÓ; MORENO-ARRIBAS; CIFUENTES, 2008).

A formação de aminas biogênicas através da descarboxilação de aminoácidos precursores produz: histamina (histidina), tiramina (tirosina), triptamina (triptofano), putrescina (ornitina),

cadaverina (lisina) e também, espermina 1,4-bis-(3'-amino-propilamino)-butano e espermidina 3'-aminopropil-1,4-diamino-butano, em quantidades muito pequenas (BELITZ & GROSCH, 1997).

Um critério essencial para a qualidade dos alimentos é o aspecto higiênico-sanitário, o qual será determinado decisivamente pela presença de atividade dos microrganismos (TREVINO, 1997). De qualquer forma, a ação dos microrganismos é muito complexa envolvendo diversas reações enzimáticas (LEUSCHNER & HAMMES, 1998).

A determinação de amins biogênicas em produtos cárneos, resulta de um método apropriado para detectar uma incipiente decomposição, possibilitando a avaliação do grau de frescor da carne (VINCI & ANTONELLI, 2002). Assim, o chamado índice de amins biogênicas foi proposto por Treptow & Askar (1987) como um critério para o controle de qualidade dos alimentos. Este índice também foi proposto como indicador de frescor para peixes e produtos marinhos (MIETZ & KARMAS, 1977).

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

As amins biogênicas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química (Figura 1), da via biossintética e da função que exercem.

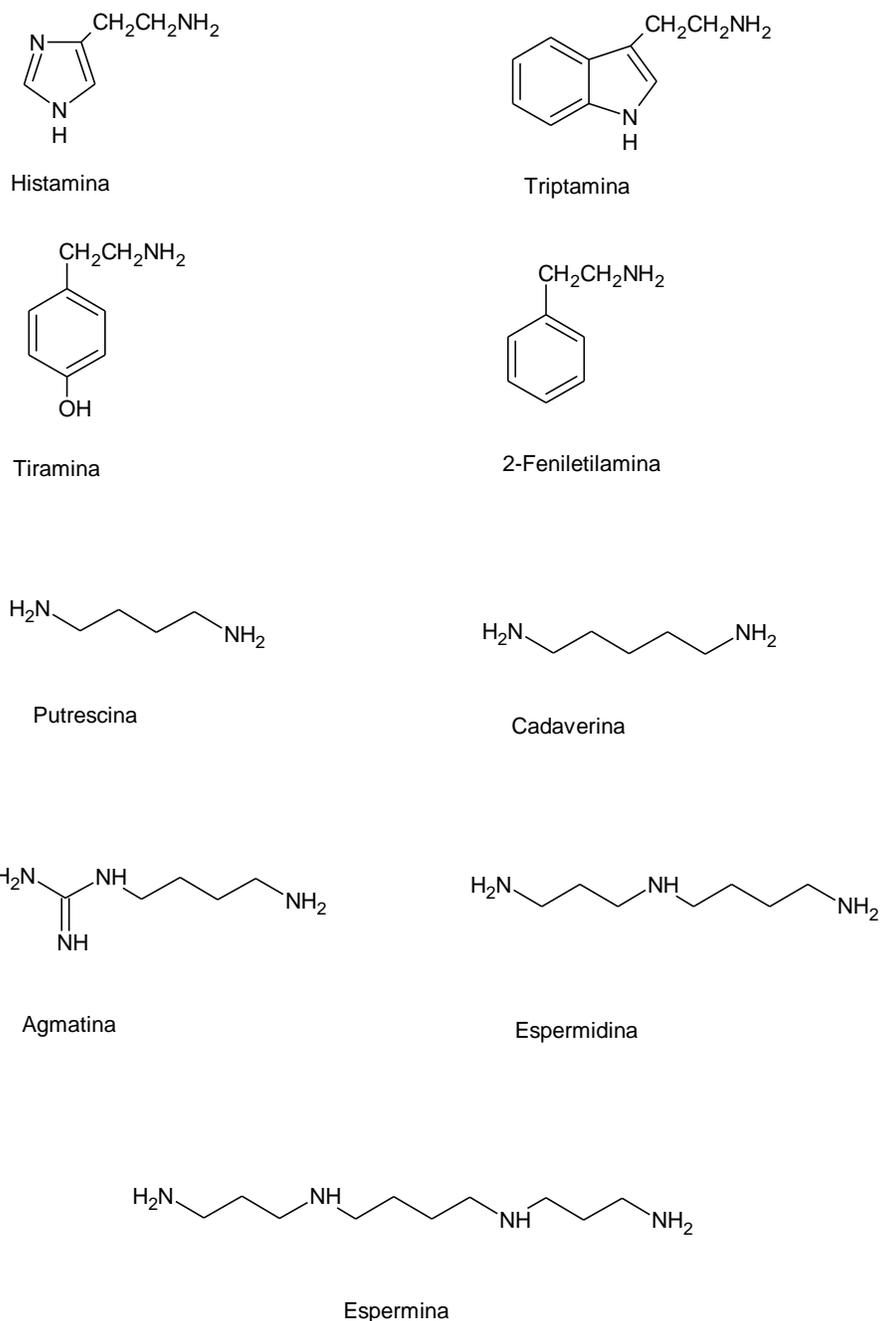


Figura 1 – Estruturas químicas das principais aminas biogênicas em alimentos (ÖNAL, 2007).

Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (GLÓRIA, 2005).

Com relação à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Ainda, em relação à estrutura química, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas

(serotonina) e imidazolaminas (histamina) (SMITH, 1981; BARDÓCZ, 1995; SILLA SANTOS, 1996).

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

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

2.2 Histamina

A histamina é uma amina biogênica que foi detectada no início do século XX como um contaminante de origem bacteriana comum nos extratos do esporão do centeio (ADAMS, 2003). A histamina foi observada nos tecidos dos mamíferos após traumatismo celular, levando à teoria da histamina como mediador endógeno da agressão celular. Essa amina está envolvida nos processos inflamatórios, na anafilaxia, nos processos alérgicos e em determinados tipos de reações à droga, além de regular a secreção gástrica (OBRINK, 1991; MORRIS, 1992; MITSUHASHI & PAYAN, 1992). Atua na contração de fibras musculares lisas, incluindo brônquios, intestino e grandes vasos. Ao contrário, pequenas arteríolas são relaxadas pela histamina de tal forma que a resistência vascular periférica e a pressão sanguínea diminuam. A permeabilidade capilar aumenta e a secreção gástrica de ácido clorídrico é estimulada, como são as atividades secretórias de outras glândulas exócrinas. Em humanos também é responsável por desencadear sensações de rubor da pele facial, “rash” cutâneo e prurido. Em casos mais severos pode ocorrer edema de glote. Com grandes doses de histamina, a pressão sanguínea diminui progressivamente, o que é acompanhado por hemoconcentração causada por extravasamento de plasma. O “choque histamínico” pode levar à morte (PEARCE, 1991).

Os sinais e sintomas ocasionados pela intoxicação escombróide podem ter a duração de alguns minutos a várias horas após a ingestão do pescado com dose tóxica de histamina. A patologia geralmente apresenta curso de duração de poucas horas, podendo estender-se por vários dias (TAYLOR, 1985; WU et al., 1997).

As respostas à histamina podem ser explicadas pela ativação de receptores específicos para a histamina nas várias células-alvo. A existência de dois tipos gerais de receptores histamínicos foi confirmada por Black et al. (1972), que conduziram um estudo farmacológico sistematizado de compostos derivados dos componentes estruturais básicos da histamina. Com base nessa pesquisa, os receptores histamínicos foram designados como tipo 1 da histamina (H1) e tipo 2 da histamina (H2). A contração induzida pela histamina da musculatura lisa brônquica e intestinal é mediada pelos receptores H1. Ao contrário, o estímulo induzido pela histamina na secreção gástrica é mediado por receptores H2. Estudos também indicaram uma terceira classe de receptores histamínicos, os H3, possivelmente relacionados à inibição da adenilato ciclase por

meio de uma proteína inibidora Gi (ARANG et al., 1987). Receptores H3 podem estar localizados no sistema nervoso central (SNC).

Nos mamíferos a histamina é a principal, e mais abundante amina biogênica. Nos humanos é produzida e armazenada em grânulos em dois tipos de células do sistema imune, mastócitos e basófilos. Sua liberação fisiológica está associada a eventos de hipersensibilidade mediados pela imunoglobulina E (IgE), porém, outros estímulos também podem ativar os mastócitos e basófilos promovendo a liberação da histamina, como por exemplo, processos inflamatórios.

2.2.1 Vias metabólicas da histamina

Uma vez liberada, a histamina é rapidamente metabolizada a metabólitos inativos, por duas vias principais: *N*-metilação pela enzima *N*-metiltransferase e oxidação, sendo convertida em aldeído pela enzima monoaminoxidase (MAO) (NELSON, 2002). Rice et al. (1976) & Taylor (1986) relatam que a histamina poder ser catabolizada por diversas vias:

- Desaminação oxidativa por ação da enzima diaminoxidase (DAO) ou histaminase, em acetaldeído e ácido imidazol-acético;
- Metilação por ação da enzima histamina metiltransferase (HMT) em metil-histamina;
- Metilação ou acetilação da cadeia lateral da histamina.

A Figura 2 representa as vias de inativação da histamina, relatada por outro autor:

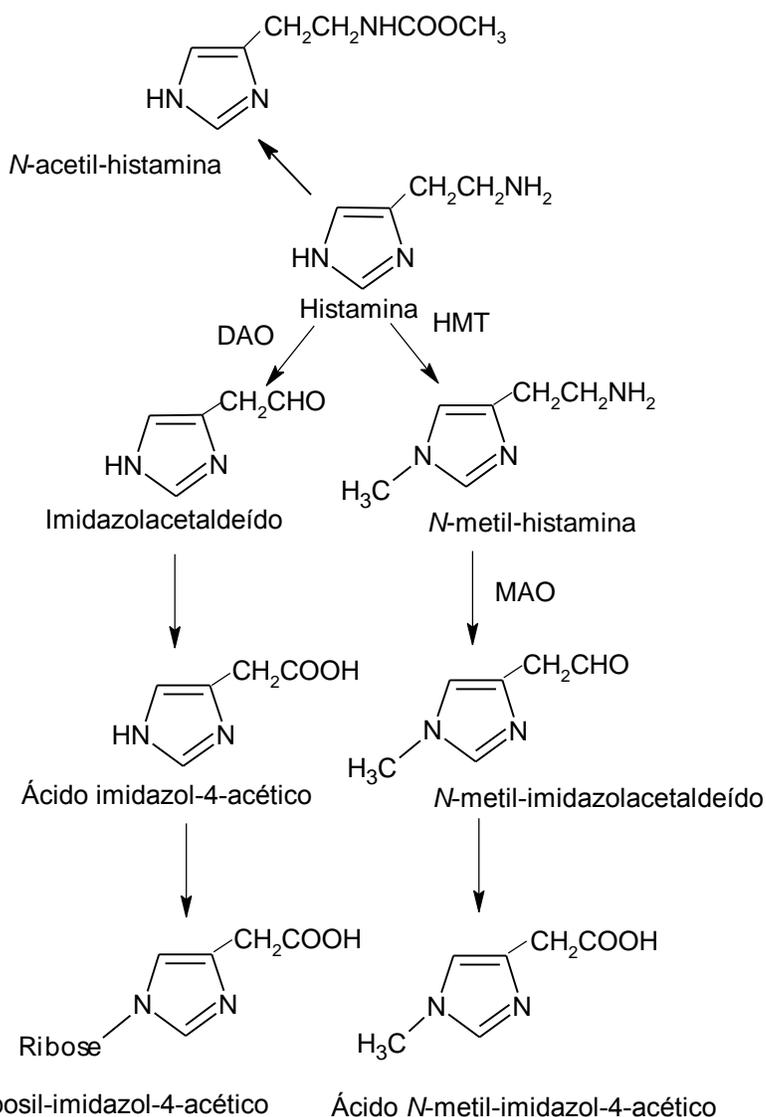


Figura 2 – Vias metabólicas de inativação da histamina (GOUVEIA, 2009).

A presença das enzimas DAO e HMT no trato intestinal e, HMT no fígado, permite justificar que a ingestão isolada de histamina por um indivíduo adulto não gera quadro de intoxicação em doses menores ou iguais a 100mg. A histamina também pode ser convertida em acetil-histamina inativada no intestino por ação de enzimas bacterianas.

2.3 Formação de Histamina nos Alimentos

A formação de histamina nos alimentos está condicionada à disponibilidade de L-histidina livre, presença de bactéria histidina descarboxilase e, também, às condições favoráveis para o crescimento bacteriano, síntese e ação de enzimas descarboxilantes (SHALABY, 1996).

Segundo Etkind et al. (1987), não existe um método de conservação incluindo o congelamento, a apertização e a defumação, que neutralize o agente causador da escombrototoxicose.

Os sintomas da intoxicação escombróide podem ser confundidos com infecção causada por *Salmonella* spp. (RUSSELL & MARETIC, 1986) e por processo alérgico de origem alimentar (TAYLOR, 1985).

A formação de níveis tóxicos de histamina nos alimentos está invariavelmente associada à ação bacteriana (JAY, 2005), por isso, os alimentos envolvidos nos casos de intoxicação escombróide são alimentos fermentados ou peixes em processo de decomposição.

Segundo Stratton et al. (1991), a maior susceptibilidade do indivíduo está relacionada a administração de fármacos, como a isoniazida utilizada no tratamento da tuberculose, que tem como mecanismo de ação a inibição de enzimas que normalmente realizam a detoxificação de histamina a nível intestinal.

A produção bacteriana de histamina ocorre em conjunto com o seu crescimento no alimento. Durante o crescimento, determinadas espécies de bactérias secretam enzimas descarboxilases. No caso da histamina, a enzima responsável pela sua produção é a histidina descarboxilase, que promove a descarboxilação de L-histidina livre no alimento, produzindo então histamina (Figura 3).

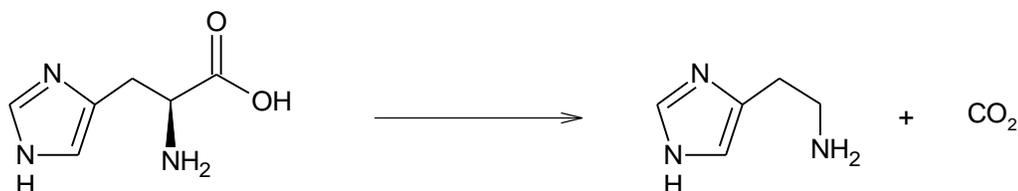


Figura 3 - Descarboxilação de histidina pela histidina descarboxilase.

A L-histidina faz parte do grupo de aminoácidos essenciais, e na maioria dos animais não pode ser armazenada, sendo encontrada basicamente na estrutura das suas proteínas. Portanto, sua liberação para a produção de histamina necessitaria da reação de hidrólise das proteínas do alimento, ou a sua decomposição. Entretanto, os peixes das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatidae* e *Scomberesocidae* possuem naturalmente altos teores de L-histidina livre em seus tecidos, favorecendo então a produção de histamina pelas descarboxilases bacterianas (SHALABY, 1996). Os peixes da família *Scombridae*, como o atum, podem apresentar um teor de histidina livre de 10g kg⁻¹ de tecido (JAY, 2005), daí o seu grande envolvimento nos casos de intoxicação escombróide. Ijomah et al. (1992), relatam que os níveis de L-histidina podem variar de 1g kg⁻¹ no arenque (*Clupea harengus* - Linnaeus, 1758) a 15g kg⁻¹ no atum.

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

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

As concentrações de histamina podem variar amplamente de uma parte a outra do peixe. A histamina no peixe cru geralmente apresenta altos níveis no tecido adjacente às brânquias ou ao intestino, os quais são os principais reservatórios de bactérias histidina descarboxilase (LERKE et al., 1978; TAYLOR, 1986). Em estudo realizado por Lerk et al. (1978), a distribuição de histamina em amostra de atum deteriorado foi bastante desigual, variando mais de quatro vezes ao longo de 3 centímetros e, sua maior concentração foi determinada próxima a cavidade intestinal em comparação a outras regiões anatômicas do peixe. Hardy & Smith (1976) demonstraram que o conteúdo de histamina em cavala inteira foi dez vezes maior em comparação à eviscerada, onde ambas foram armazenadas sob temperatura ambiente durante 140 horas.

A produção de histidina descarboxilase está diretamente relacionada com a microbiota presente no peixe. Taylor et al. (1978) identificaram 112 espécies de bactérias histidina descarboxilase, sendo os maiores representantes, membros da família *Enterobacteriaceae* e, dos gêneros *Clostridium* e *Lactobacillus*. Bactérias entéricas, especificamente *Morganella morganii*, determinadas cepas de *Klebsiella pneumoniae* e algumas variantes de *Hafnia alvei*, são as espécies mais relacionadas a produção de histamina em pescado armazenado sob temperaturas superiores a 4°C (STRATTON & TAYLOR, 1991). Algumas cepas do gênero *Lactobacillus* produzem histamina em peixes fermentados (TAYLOR, 1986).

Em estudo realizado por López-Sabater et al. (1996), *Morganella morganii* e *Klebsiella oxytoca* foram as espécies bacterianas que sintetizaram, sob condições experimentais, em média 2765 e 1415mg kg⁻¹ de histamina, respectivamente, após incubação a 37°C por 18 horas. *Plesiomonas shigelloides*, que é uma bactéria frequentemente associada ao meio aquático, foi responsável pela produção de histamina na faixa de concentração de 8 – 340mg kg⁻¹ por cepas analisadas em ensaios laboratoriais.

A degradação dos peixes, tanto por autólise quanto por microrganismos, e a formação de histamina são aceleradas quando em temperatura ambiente (ÖZOGUL; ÖZOGUL; KULEY, 2008; ROSSANO et al., 2006). Segundo os mesmos autores quando o peixe é mantido a temperaturas abaixo de 20°C, reduz-se significativamente a formação de histamina. Entretanto, segundo Paleologos, Savvaidis & Kontominas (2004), o armazenamento em gelo do peixe, numa proporção de 3:1, não foi suficiente para impedir o aumento do teor de histamina após nove dias. Mesmo os teores estando bem abaixo dos limites legais, 3mg kg⁻¹, no artigo é descrito que o armazenamento do peixe é bastante limitado, mesmo quando diretamente em gelo. A partir de uma grande população bacteriana estabelecida no pescado, a atividade enzimática residual

permanece lentamente sob temperatura de refrigeração, embora o crescimento bacteriano não ocorra (KLAUSEN & HUSS, 1987; STRATTON & TAYLOR, 1991).

A presença de bactérias psicrotróficas e halofílicas no ambiente marinho contribui para a formação de histamina em peixe armazenado. Kanki et al. (2004) mostraram que a presença de *Photobacterium phosphoreum* em sardinha salgada (iwashi maruboshi) causou a intoxicação de um indivíduo em Osaka, Japão. Segundo Kanki et al. (2004) essa bactéria é capaz de produzir mais de 500mg kg⁻¹ de histamina em apenas 12 horas.

A contagem e o tipo de bactérias histidina descarboxilase presentes no peixe, podem ser influenciados por fatores como: hábitos alimentares, localização geográfica, temperatura do ambiente aquático, salinidade da água, método de pesca e qualidade da água no momento da captura, manipulação no período de pós-captura e, condições de comercialização do peixe (SUBBURAJ, KARUNASAGAR & KARUNASAGAR, 1984).

Diferentemente de outras aminas biogênicas, como a putrescina e a cadaverina, níveis tóxicos de histamina nos alimentos não são sensorialmente percebidos (SHALABY, 1996), o que pode levar a intoxicação escombróide mesmo quando da ingestão de peixe adequadamente armazenado, mas por um período relativamente longo. A proteólise ocorrida no período *post mortem*, libera maior quantidade de histidina a partir da proteína muscular, o que justifica a biossíntese de altas concentrações de histamina sem a formação de alterações sensoriais (ROSSANO et al., 2006). Esses fatores têm levado as organizações sanitárias de vários países a intensificarem a fiscalização da qualidade dos peixes comercializados, principalmente quando pertencem às famílias já citadas. Segundo Etkind et al. (1987), altas concentrações de histamina podem transmitir um sabor suavemente apimentado ao atum enlatado mas, a sua degustação de forma rotineira não é um meio viável de assegurar a sua qualidade.

A histamina tem como característica importante a sua termorresistência pois, uma vez sintetizada, não pode ser degradada através do processamento térmico (GLÓRIA et al., 1999), cozimento ou congelamento (BREMER et al. 1998). McCARTHY & BURKHARDT III (2012) ratificaram que a histamina não pode ser eliminada por nenhum tipo de tratamento no período de pós-captura.

2.4 Legislação

De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 1997), o limite estabelecido de histamina na musculatura dos peixes pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae* e *Coryphaenidae* é de 100mg kg⁻¹, avaliado por espectrofluorimetria como método oficial de análise. A Portaria nº25 (BRASIL, 2011) descreve a análise de histamina e de outras aminas biogênicas através de derivatização pré-coluna com cloreto de dansila e, separação e detecção por CLAE.

Segundo FDA (2011), todos os peixes analisados em 1 lote devem apresentar limites inferiores a 50mg kg⁻¹. A União Europeia estabelece que nenhuma amostra deve exceder 200mg kg⁻¹ e, até duas a partir de nove amostras coletadas de um mesmo lote, podem apresentar concentrações superiores a 100mg.kg⁻¹ e inferiores a 200mg kg⁻¹ (CE, 1991). As análises devem ser realizadas por CLAE.

2.5 Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*)

O gênero *Pseudoplatystoma* compreende as espécies de peixes conhecidas popularmente por surubim e são os maiores peixes da família *Pimelodidae* (Siluriformes). Pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica, do Prata e do São Francisco. De hábito alimentar carnívoro, principalmente piscívoro, são espécies de peixes apreciados por apresentarem poucas espinhas em sua carne, podendo alcançar de 100 a 120kg na natureza, embora o cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) somente atinja até 70kg.

Os surubins, por apresentarem hábito alimentar carnívoro, somente são criados com dietas artificiais contendo altos teores de proteína bruta. No entanto, existe a necessidade de utilização de dietas eficientes, de baixo custo, que atendam às habilidades digestivas das espécies e, ainda, que causem pouca poluição ambiental. Coelho & Cyrino (2006) observaram custos de produção elevados para os surubins. Desta forma, estudos que visem viabilizar, técnica e economicamente, sua produção são de extrema importância.

O cachara vem destacando-se entre os surubins. Segundo Queiroz et al. (2002), nos últimos anos, várias empresas têm investido no cultivo intensivo dessa espécie com resultados satisfatórios em função da otimização dos sistemas, e também do avanço tecnológico baseado no aumento do conhecimento sobre a biologia desta espécie, o que tem diminuído o esforço pesqueiro e possibilitado a manutenção dos estoques naturais.

2.6 Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)

Segundo estudo de Liranço, Romagosa & Scorvo-Filho (2011), o *Pseudoplatystoma corruscans*, conhecido regionalmente no Estado do Mato Grosso do Sul como pintado ou surubim (ordem *Siluriformes*, subordem *Siluroidei*, família *Pimelodidae*), pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas. Recentemente vem se adaptando à região Sudeste do país. Essa espécie apresenta carne de alta qualidade, de coloração clara e textura firme, com ausência de espinhos intramusculares, possibilitando oferta ao consumidor em filés, inteiro ou eviscerado, sendo considerado um peixe nobre e apreciado no mercado nacional e internacional. Em função da excelente qualidade de sua carne e esportividade para pesca, o surubim vem sendo considerado um dos peixes mais nobres e de maior valor comercial no Brasil.

Os mercados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste consomem a maior parte do pintado comercializado no país. Praticamente todos são oriundos da pesca extrativista da região do Pantanal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Nos últimos anos, a oferta foi menor que a demanda, sendo necessária a importação de países vizinhos. Essas características apontam o grande potencial de expansão de mercado e abrem grandes perspectivas para os empreendimentos voltados a sua criação.

Como características morfológicas, o pintado pode apresentar mais de 1,5m de comprimento e 100kg de peso (EIRAS, TAKEMOTO & PAVANELLI, 2009). Em sistema de criação em cativeiro, o pintado pode atingir até 2kg no primeiro ano de desenvolvimento. Trata-se de um peixe de hábito noturno e piscívoro (FAGUNDES & URBINATI, 2008).

A pesca do pintado é explorada de forma intensa, o que gera redução nos estoques naturais e, por conseqüência, aumento na criação em sistemas intensivo e semi-intensivo (EIRAS, TAKEMOTO & PAVANELLI, 2009).

2.7 Atum (*Thunnus spp.*)

Os atuns são peixes marinhos e pelágicos pertencentes à Superordem *Acanthopterygii*, Ordem *Perciformes*, Subordem *Scombroidei*, Família *Scombridae*, que habitam a superfície dos oceanos tropicais, subtropicais e temperados. Também possuem a capacidade de alcançar centenas de metros de profundidade. Todos os atuns movem-se constantemente à procura de alimentos, com a finalidade de manter a passagem de água através das guelras e fins reprodutivos (FAO, 2010a).

O atum (Quadro 1) apresenta alta relevância econômica e comercial além de ser uma completa fonte de alimento. Inclui aproximadamente 40 espécies distribuídas nos Oceanos Atlântico, Índico e Pacífico e, no Mar Mediterrâneo.

Quadro 1 - Principais espécies de atum e características morfológicas.

Espécies de atum	Comprimento normal (cm)	Comprimento máximo (cm)	Peso máximo (kg)
<i>Auxis rochei</i>	15-35	50	-
<i>Auxis thazard</i>	25-40	58	-
<i>Euthynnus lineatus</i>	30-65	70	9
<i>Euthynnus alleteratus</i>	30-80	100	12
<i>Euthynnus affinis</i>	30-60	100	13
<i>Katsuwonus pelamis</i>	40-80	108	33
<i>Thunnus atlanticus</i>	40-70	100	19
<i>Thunnus alalunga</i>	40-100	127	40
<i>Thunnus tonggol</i>	40-70	130	35
<i>Thunnus albacares</i>	60-150	200	175
<i>Thunnus maccoyii</i>	160-200	225	160
<i>Thunnus obesus</i>	70-180	230	200
<i>Thunnus thynnus</i>	80-200	300	650

Fonte: FAO,2010a.

A produção anual do atum tem aumentado continuamente em todo o mundo, com dados registrados a partir de 0,6 milhões de toneladas no ano de 1950, para quase 9,5 milhões de toneladas nos dias de hoje (FAO, 2010b). No Brasil, nos anos de 2008, 2009 e 2010 a pesca extrativa do atum (*Thunnus obesus*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus albacares*, *Thunnus atlanticus*) correspondeu a 5.161 (1,12%), 5.902 (1,16%) e 6.735 (1,45%) toneladas, respectivamente. Como principal produto exportado da pesca, as conservas de atum inteiro e em pedaços, representaram nos anos de 2009 e 2010 respectivamente, um volume de exportação de 5.112 e 2.811 toneladas para a Argentina (BRASIL, 2012).

A composição química e valor calórico do atum estão descritos no Quadro 2:

Quadro 2 – Valores correspondentes à composição química do atum e derivados.

Alimento	Umidade*	Proteína*	Lipídios*	Colesterol**	CHO**²	Cinzas*	Energia***
Atum, fresco, cru	73,10	25,70	0,90	48,00	-	1,30	118
Atum, ralado em conserva	63,93	23,60	9,80	n.a. ¹	1,23	1,44	188
Atum, com salada, com maionese e vegetais em conserva	71,61	9,16	4,30	n.a. ¹	12,87	2,06	120
Atum, sólido em conserva	66,96	26,20	4,10	n.a. ¹	1,37	1,37	147
Atum em conserva em óleo	64,50	26,20	6,00	53	-	1,50	166
Atum, sólido em conserva, light	70,77	25,80	0,60	n.a. ¹	1,68	1,15	115

Adaptado de GONÇALVES (2011).

Onde:

¹ não avaliado; ² carboidratos totais; *g 100g⁻¹; **mg 100g⁻¹; ***kcal.

2.8 Processamento Térmico

A esterilização pelo calor é a operação unitária na qual o alimento é aquecido a uma temperatura alta o suficiente por um tempo adequadamente longo para destruir a atividade microbiana e enzimática. Como resultado, os alimentos esterilizados alcançam uma validade comercial superior a seis meses em temperatura ambiente (FELLOWS, 2006).

A determinação do tempo necessário para esterilizar um alimento depende dos seguintes fatores: termorresistência dos microrganismos ou enzimas que podem estar presentes, condições do aquecimento, pH do alimento, tamanho do recipiente e estado físico do alimento (FELLOWS, 2006).

De acordo com Brasil (2002), para que um produto possa ser armazenado por maior tempo sem ter comprometimento da qualidade microbiológica e físico-química, deve ser submetido à esterilidade comercial que é obtida aplicando-se calor suficiente, só ou em combinação com outros processos de conservação de alimentos, assegurando assim a destruição das formas viáveis de microrganismos patogênicos e de outros capazes de alterar o produto e que possam multiplicar-se em condições normais de armazenamento e distribuição. É importante ressaltar que não se trata de esterilidade absoluta, uma vez que, segundo Canada et al. (1976) citado por Germer et al. (1995), microrganismos podem ser recuperados de alimentos comercialmente estéreis sem que haja comprometimento das características físico-químicas e da qualidade microbiológica dos mesmos, ou seja, mantém-se estáveis à temperatura ambiente quando embalados hermeticamente.

Germer et al. (1995) ressaltam que os processos de esterilização comercial são aplicáveis à alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$; atividade de água $[\text{Aa}] > 0,85$) e armazenados à temperatura ambiente, visando assegurar a completa destruição de bactérias patogênicas ou microrganismos capazes de deteriorar os produtos nas condições normais de armazenamento (geralmente temperaturas abaixo de 40°C). Uma vez que muitos destes microrganismos deterioradores ou patogênicos são esporogênicos, o tratamento térmico deverá assegurar a destruição de esporos bacterianos, os quais são formas altamente resistentes à ação de agentes físicos e químicos, sendo, portanto, necessário o emprego de altas temperaturas (geralmente na faixa de 110°C a 120°C) somente conseguidas em autoclaves, sob pressão.

Stephen et al. (2010) avaliaram diferentes tipos de processamentos térmicos (cocção, fritura, esterilização comercial e aquecimento em forno microondas) através de alterações nos índices de ácidos graxos saturados e insaturados geradas em amostras de atum (*Katsuwonus pelamis*). Os ácidos graxos ω -3, eicosapentaneóico e docosahexaenóico benéficos para a saúde, em todas as conservas enlatadas submetidas aos binômios temperatura/tempo de 110, 115 e 121°C por 90, 70 e 40 minutos, sofreram total degradação.

Shakila et al. (2005) produziram conservas de atum (*Katsuwonus pelamis*), sardinha (*Sardinella gibbosa*) e “seer fish” (*Scomberomorus commersonii*), submetidas a 121°C por 40 minutos. Tal binômio gerou a redução na contagem de bactérias heterotróficas, aeróbias e mesófilas de 10^6 para 10^1UFC g^{-1} . Os autores (SHAKILA et al., 2005) concluíram que o tratamento térmico empregado foi capaz de destruir grande parte das células vegetativas bacterianas.

Pfeil et al. (1999) ao avaliarem a qualidade da conserva de sardinha sem pré-cozimento, observaram que o tempo e a temperatura utilizados no tratamento térmico (80 minutos a 118°C) foram suficientes para conferir esterilidade comercial e características sensoriais desejáveis ao produto tradicional assim como ao produto testado.

Batista (2005) realizou, no processamento de “charutos” de Tilápias, esterilização por 15, 20 e 30 minutos em temperatura constante de 121°C e, ao avaliar sensorialmente os produtos, não observou diferenças significativas entre os mesmos.

De acordo com Sgarbieri (1996), o tratamento térmico pode causar reações de desnaturação e de complexação com carboidratos, lipídios, substâncias fenólicas e pigmentos. O autor relata ainda que a desnaturação de enzimas pode contribuir para a conservação de alimentos uma vez que estas aceleram reações bioquímicas que diminuem a validade comercial dos produtos; mas por outro lado, a proteína desnaturada perde solubilidade e funcionalidade, o que torna a busca pelo binômio temperatura/tempo ideal ainda mais complexa. No entanto, Frazão (2001) observou estabilidade do perfil polipeptídico durante os 90 dias de estudo de vida útil do manto de lula processada termicamente.

2.9 Métodos Analíticos

Existem duas razões para a determinação de aminas biogênicas nos alimentos: potencial tóxico e possibilidade de utilizá-las como indicador de qualidade.

Vários métodos vêm sendo utilizados, onde são destacados: cromatografia em camada delgada, eletroforese capilar, cromatografia gasosa e, cromatografia líquida de alta eficiência.

2.9.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na técnica de CCD, Lieber & Taylor (1978a) estabeleceram ensaios analíticos entre os agentes cromogênicos ninhidrina, *o*-ftalaldeído, fluorescamina e *o*-diacetilbenzeno, para a detecção de histamina em várias amostras (e.g. atum, sardinha, salame, pepperoni, etc.). A ninhidrina apresentou a maior sensibilidade, com limite de detecção de 4nmols; *o*-ftalaldeído demonstrou resultado insatisfatório devido a formação de “spots” instáveis; fluorescamina e *o*-diacetilbenzeno apresentaram maior especificidade para a visualização do “spot” referente à histamina. A composição de fase móvel que exibiu melhor separação dentre outras aminas testadas no estudo, foi acetona:amônia (95:5). O método selecionado como ótimo para a análise semi-quantitativa, utilizou *o*-diacetilbenzeno como agente cromogênico.

Em outro estudo realizado por Lieber & Taylor (1978b) para a detecção de histamina em amostras de atum, foi utilizado o agente cromogênico ninhidrina e as fases móveis metanol:amônia (20:1) e clorofórmio:metanol:amônia (2:2:1), apresentaram rápida e melhor visualização dos “spots”.

Tao et al. (2011a) desenvolveram um método rápido para análise de histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por CCD. A histamina foi extraída com etanol a 80% e visualizada com o reagente de Pauly. A fase móvel utilizada foi composta por amônia:etanol (1:3). Como resultado, a histamina pôde ser detectada e separada de histidina, 4-metil-imidazol e outros compostos positivos após revelação com reagente de Pauly. Em ensaios de recuperação, obtiveram-se resultados satisfatórios de 93%, 96% e 98% após adição de padrão de histamina nas concentrações de 200, 400 e 600mg kg⁻¹, respectivamente. A baixa sensibilidade da técnica de CCD a torna limitada para a detecção de pequenas concentrações de histamina.

2.9.2 Eletroforese capilar (EC)

A técnica instrumental de EC em análise de alimentos foi descrita em artigo de revisão por Lindeberg (1996). Foram relatados altos limites de detecção que restringem o uso para análises quantitativas. A fim de otimizar a sensibilidade do método analítico, pesquisas foram realizadas com o propósito de desenvolver novos meios de detecção e modificar a geometria dos capilares.

Em estudo realizado por Liao et al. (1999) para a determinação de histamina em amostras de peixe por EC com detecção por UV, a metodologia de extração consistiu nas seguintes etapas: amostra adicionada de metanol com posterior direcionamento para banho-maria a 60°C por 15 minutos, filtração do sobrenadante e diluição do mesmo com 0,1M de tampão fosfato a pH 2,5 (1:1). Os autores relataram que mesmo sem a realização de purificação prévia do extrato, a histamina foi bem separada de outros componentes co-extraídos. Além disso, o tempo de análise para cada replicata transcorreu em apenas 4 minutos. A recuperação média obtida em todas as amostras foi de 96% e o limite de detecção estabelecido foi de 25mg kg⁻¹, o que demonstra baixa sensibilidade na técnica instrumental aplicada para o método desenvolvido.

Zhang & Sun (2004) desenvolveram um método de determinação simultânea de histamina e histidina em amostras de cerveja e células oriundas de mastocitoma, por EC com detecção por fluorescência. O agente de derivatização naftaleno-2,3-dicarboxialdeído foi utilizado, com a

obtenção de compostos derivatizados estáveis. A separação de histamina e do respectivo aminoácido precursor ocorreu em menos de 200 segundos. Os limites de detecção estabelecidos para histamina e histidina foram, respectivamente, de $5,5 \times 10^{-9}$ e $3,8 \times 10^{-9}$ M. Em ensaios de recuperação de histamina, obtiveram-se 96,8% (cerveja) e 98,1% (células de mastocitoma).

Rossano et al. (2006) determinaram a concentração de histamina em amostras de anchova (*Engraulis encrasicolus*) por EC através da extração com ácido tricloroacético (TCA) a 5%. A recuperação obtida do analito foi de 87%, mostrando-se satisfatória. Os autores concluíram que trata-se de um método analítico simples (não requer modificação preliminar das moléculas a serem separadas), rápido (a análise ocorre em menos de 15 minutos, incluído a extração por TCA) altamente confiável e com boa sensibilidade (limite de detecção estabelecido na análise de $0,6 \text{mg kg}^{-1}$).

Jager & Tavares (2001) relatam como principal vantagem da eletroforese capilar em relação às outras técnicas de separação, a maior eficiência e resolução obtidas em um tempo menor de análise e, a utilização de volumes pequenos da amostra (1 – 10nL por injeção) e do eletrólito de trabalho (10 – 100mL diários).

2.9.3 Cromatografia gasosa (CG)

Antoine et al. (2002) relataram a dificuldade de outros autores na determinação de histamina por CG devido a formação de picos de baixa resolução e com formação lateral de cauda. Para solucionar essa questão, foi sugerida a extração em fase sólida. A recuperação média obtida foi de 67%. Com finalidade de comparação, as amostras também foram analisadas por fluorimetria, o que gerou um índice de 90% na recuperação do analito. Os autores concluíram que o método desenvolvido é simples porém, necessita da realização de etapa de limpeza prévia da amostra a fim de evitar interferência de outros compostos da matriz. Os picos cromatográficos apresentaram boa simetria e ausência de formação lateral de cauda.

Hwang, Wang & Choong (2003) desenvolveram um método rápido para determinação de histamina em amostras de atum (*Thunnus thynnus*) e camarão (*Penaeus monodon*) por CG em detector de ionização em chama. Na extração foi utilizado metanol alcalinizado com NaOH 0,1N. Para a detecção de histamina, a mesma não sofreu derivatização, o que reduziu o tempo de preparo da amostra e o custo da análise. O pico obtido de histamina foi confirmado por CG acoplado a um detector de massas. O limite de detecção do analito foi correspondente a 5mg kg^{-1} . A faixa de recuperação média de histamina em amostras de atum e camarão foi, respectivamente, de 97,5 – 110,9% e 98,5 – 102,4%.

2.9.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Vários métodos vêm sendo desenvolvidos por CLAE para a determinação de histamina e outras aminas biogênicas em alimentos. Embora os métodos sejam geralmente baseados em derivatização pré ou pós-coluna com o uso de diversos agentes derivatizantes, metodologias de detecção que não requerem derivatização tornam a análise mais simples e conveniente (DRAISCI et al., 1998).

Frattini & Lionetti (1998) estabeleceram comparação entre dois métodos na determinação de histamina em amostras de atum. Em um dos métodos foi utilizado HClO_4 para extração do composto de interesse e posterior detecção por UV a 210nm. No outro método proposto, TCA foi utilizado como solvente de extração e as amostras derivatizadas com *o*-ftalaldeído, foram analisadas por CLAE e detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}}=315\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=415\text{nm}$). O método que empregou a detecção por UV apresentou baixa sensibilidade em comparação a detecção por fluorescência. Em ambos os métodos, os índices de recuperação foram satisfatórios (97,8% - UV e 97% - fluorescência). Os autores (FRATTINI & LIONETTI, 1998) concluíram que a derivatização pré-coluna melhora comportamento do analito a nível cromatográfico.

Em estudo realizado por Cinquina et al. (2004), a quantificação de histamina em conservas de atum por CLAE em detector de arranjo de diodos (DAD) a 214nm, gerou resultados satisfatórios mesmo sem a limpeza prévia e derivatização da amostra. Para a extração do analito, foi utilizado HClO_4 0,1M. Os limites de detecção e quantificação determinados na validação do método foram de 1 e 2mg kg^{-1} , respectivamente. A recuperação média obtida na análise foi superior a 92% e, a robustez do método foi comprovada através do teste com diferentes colunas e lotes de reagentes grau HPLC.

Em recente estudo realizado por Tahmouzi, Khaksar & Ghasemlou (2011), dois métodos para a determinação de histamina por CLAE em amostras de atum (*Katsuwonus pelamis*), foram comparados e validados. Em ambos os métodos, o solvente de extração empregado foi TCA 5%.

Em um dos métodos, foi utilizada a detecção por UV/Vis a 254nm e derivatização pré-coluna com cloreto de benzoíla. A recuperação média obtida não foi superior a 55% e, na tentativa de otimizar a eficiência do método, foi aplicada extração líquido-líquido e extração em fase sólida a fim de remover compostos interferentes da matriz, no entanto, sem sucesso. Os autores concluíram que a técnica de detecção por UV/Vis não deve ser utilizada pelas limitações apresentadas.

Em relação a detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}}=315\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=415\text{nm}$), foi utilizado o agente de derivatização *o*-ftalaldeído e, a faixa de recuperação média obtida foi de 95,73-104,78%.

2.10 Agentes de Derivatização em Análise por CLAE

Considerando que a maioria das aminas biogênicas não possui grupos cromóforos ou fluoróforos na estrutura química, há a necessidade de realizar a reação de derivatização (ÖZDESTAN & ÜREN, 2009) pois, a formação de compostos fluorescentes aumenta a sensibilidade e especificidade da análise (FRATTINI & LIONETTI, 1998).

Diversos reagentes são utilizados na reação de derivatização pré e pós-coluna de histamina porém, os mais usados por pesquisadores são: cloreto de dansila, fluorescamina, cloreto de benzoíla e *o*-ftalaldeído (OPA) (OGURI & YONEYA, 2002).

O cloreto de dansila tem como desvantagens formar derivativos com limitada estabilidade, sensíveis a luz e, trata-se de uma reação demorada mesmo sob aquecimento (TAHMOUZI, KHAKSAR & GHASEMLOU, 2011).

A reação entre fluorescamina e histamina não é recomendada devido à instabilidade e complexidade do produto, no entanto, a reação ocorre em poucos minutos (PENG et al., 2008).

Em relação ao cloreto de benzoíla, o mesmo possui a vantagem de ser um composto estável e de produzir derivativos não sensíveis à luz, de baixo custo, eluição em curto período de

tempo e, capacidade de reagir com aminas primárias e secundárias (ÖZDESTAN & ÜREN, 2009).

O agente de derivatização OPA exerce reação de forma rápida com aminas biogênicas mas, tem como desvantagem o fato de reagir somente com aminas primárias e gerar compostos instáveis (ÖZDESTAN & ÜREN, 2009). Frattini & Lionetti (1998), em estudo realizado na determinação de histamina em amostras de atum por CLAE e detecção por fluorescência, obtiveram melhores resultados na injeção do composto derivatizado após 30-40 minutos da reação de derivatização.

2.11 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil Carbamato (AQC)

O desenvolvimento de um novo composto químico heterocíclico por Cohen & Michaud (1993), para derivatização pré-coluna de aminoácidos e posteriormente utilizado em aminas biogênicas, foi realizado com o propósito de diminuir ou eliminar as desvantagens dos demais agentes como, instabilidade, baixo rendimento e longo tempo de reação.

O reagente AQC permitiu a derivatização de aminoácidos e aminas biogênicas com a síntese de produtos estáveis por até uma semana sob temperatura ambiente, alta sensibilidade na detecção e no rendimento do produto derivatizado, bem como simples e rápida (1-2 segundos) realização da reação, como pode ser observado na Figura 4:

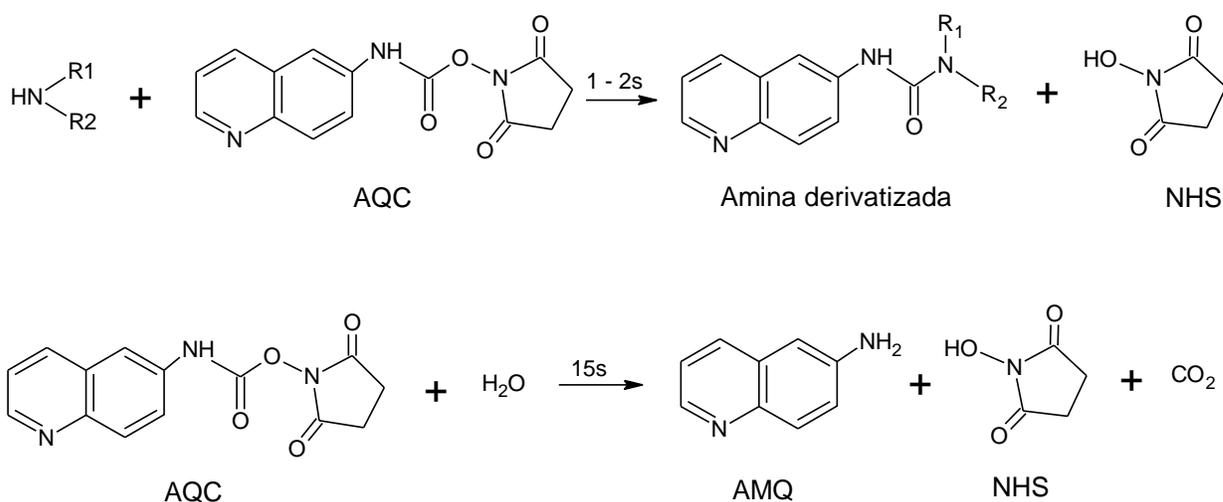


Figura 4 – Reação de derivatização e de hidrólise do reagente AQC, respectivamente (COHEN & MICHAUD, 1993).

Todo reagente em excesso é rapidamente hidrolisado em até 15 segundos, com a formação dos produtos: 6-aminoquinolina (AMQ), *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e CO₂. A rápida hidrólise impede a ocorrência de reações indesejáveis. Em uma faixa de pH de 8,2-9,7 o rendimento da amina derivatizada sofre pouca influência porém, em condições mais ácidas há perda significativa no rendimento (COHEN & MICHAUD, 1993).

A partir das vantagens descritas do AQC, e da eficiência comprovada na reação com aminas primárias e secundárias, o mesmo foi utilizado para a derivatização de histamina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

Foram utilizadas como matéria-prima as seguintes espécies de peixe: Atum (*Thunnus* spp.), Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum* – Linnaeus, 1766) e Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* - Spix and Agassiz, 1829). O atum foi adquirido no mercado varejista localizado na Avenida Ayrton Senna 1791, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro – RJ na forma de filé resfriado. Foi também direcionado ao processamento térmico, o filé sem pele e congelado de um híbrido de cachara e pintado adquirido do entreposto de pescado Mar & Terra Ind. e Com. de Pescado LTDA localizado na rodovia MS-157, km 63,2, Itaporã – MS.

3.2 Processamento das Amostras

3.2.1 Filé do Pescado em Conserva

Para a obtenção dos filés em conserva, foram realizadas as seguintes etapas de processamento:

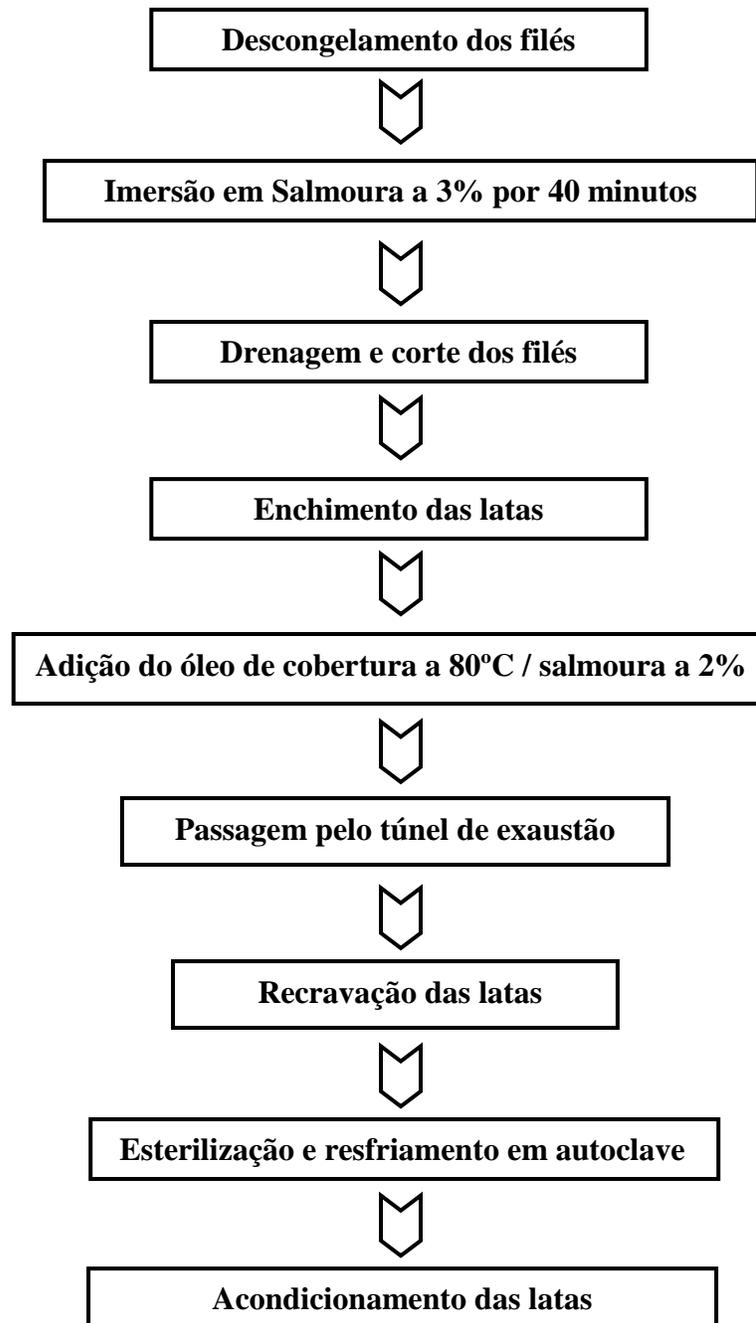


Figura 5 – Fluxograma das etapas do processamento do filé de pescado.

O tratamento térmico foi realizado em autoclave a vapor, fixa, vertical, com capacidade de 120L, adaptada sob pressão, marca Tecnifood[®]. O monitoramento da temperatura foi realizado através de termopares de liga de cobre acoplados ao centro geométrico da lata e conectado ao registrador Testo[®], acoplado a um computador com o aplicativo Testo Comfort – Software Basic[®]. Foi instalado um termopar em uma lata selecionada aleatoriamente de cada tipo de conserva e outro foi utilizado para monitoramento da temperatura interna da autoclave.

O binômio temperatura/tempo utilizado no processamento térmico, correspondeu a 115°C por 20 minutos. Foi realizado o cálculo de F_0 a partir dos dados das temperaturas internas da lata e da autoclave registradas durante o processamento.

3.3 Análise em Laboratório

3.3.1 Análise de histamina por técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O método cromatográfico e a derivatização pré-coluna com o uso do reagente AQC, foram desenvolvidos por Cohen & Michaud (1993) para análise de aminoácidos, portanto, o método foi adaptado para a detecção e quantificação de histamina.

As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, onde o sistema utilizado consistiu no cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695, com coluna BDS Hypersil C18, 2,4µm, 100 x 4,6mm Thermo® em forno a 37°C, eluição em gradiente (Tabela 1) com fase móvel acetonitrila (AcN) : eluente A (AccQ•Tag™ – pH 5,5) : H₂O. O volume de injeção aplicado na análise foi de 5µL. Detector de fluorescência modelo Waters® 2475, comprimento de onda de excitação 254nm e emissão 395nm.

Tabela 1 – Condições cromatográficas aplicadas em método de eluição em gradiente.

Tempo (min)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Eluente A (%)	Acetonitrila (%)	H ₂ O (%)
0,00	1,00	100,0	0,0	0,0
0,50	1,00	99,0	1,0	0,0
18,00	1,00	95,0	5,0	0,0
19,00	1,00	91,0	9,0	0,0
29,50	1,00	83,0	17,0	0,0
33,00	1,00	0,0	60,0	40,0
36,00	1,00	100,0	0,0	0,0
45,00	1,00	100,0	0,0	0,0

3.3.1.1 Preparo de solução-padrão

Na análise, foi utilizado padrão USP® de dicloridrato de histamina. Foi preparada uma solução-padrão em balão volumétrico de 25mL através da solubilização de 13,8mg de dicloridrato de histamina em HCl 0,1M. Obteve-se a concentração de 552µg mL⁻¹. No rótulo do padrão havia uma correlação para aplicações quantitativas (1mg de dicloridrato de histamina = 603,8µg de histamina), portanto, a concentração de histamina na solução-padrão correspondeu a 333,2976µg mL⁻¹.

Toda a água utilizada nos experimentos foi ultra-pura, recém coletada em equipamento Milli-Q®, com resistividade mínima de 18MΩ cm⁻¹ e carbono orgânico total (TOC) máximo de 7ppb. Todos os solventes utilizados, foram grau HPLC do fabricante Tedia®.

3.3.1.2 Preparo de amostra

A metodologia (Figura 6) adotada na análise seguiu as etapas descritas pela AOAC (2000), as quais consistem na extração de histamina a partir de 10g de amostra, devidamente homogeneizada, com metanol em banho-maria sob leve agitação a 60°C, por 15 minutos. Em seguida o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo com gramatura de 80g m⁻² e avolumado com metanol em balão volumétrico de 100mL. Para a análise por CLAE, a etapa de purificação do extrato descrita na metodologia não foi necessária. As alíquotas do extrato foram submetidas a filtração em filtro Millex[®] 0,22µm.

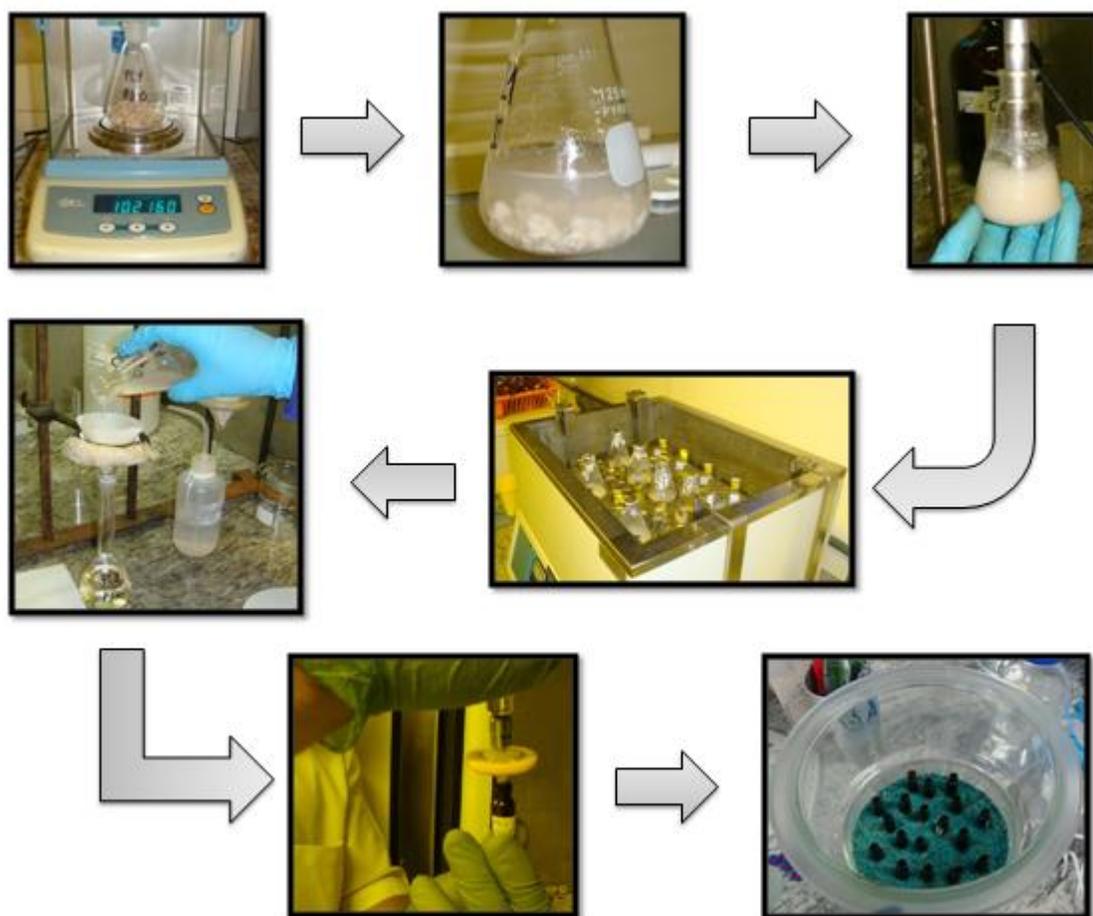


Figura 6 – Esquema de metodologia aplicada em extração de histamina.

3.3.1.3 Reação de derivatização

Foi utilizado o kit para aminoácidos da Waters[®] AccQ•Tag[®], constituído do reagente AQC (Millipore, Milford, MA, EUA), a ser ressuspensionado em 1mL de acetonitrila (que acompanha o kit) e tampão borato (ácido bórico 200mM, EDTA 5,0mM, pH 8,8) para a reação.

A derivatização foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Schulz (2009), que consiste na secagem de uma alíquota do extrato em dessecador sob vácuo, contendo sílica gel previamente seca em estufa a 105°C e posterior ressuspensão em 20µL de HCl 20mM, seguida de adição de 60µL do tampão borato e agitação por 5 segundos e adição de 20µL do AQC, seguida de agitação por 10 segundos. A solução derivatizada foi então transferida para “vials” com redutor de volume.

3.3.2 Parâmetros de validação em método analítico

A análise de histamina em pescado foi submetida a determinação de alguns parâmetros de validação dispostos no documento DOQ-CGCRE-008 de caráter orientativo do INMETRO.

Os parâmetros avaliados foram: linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e repetitividade.

3.3.2.1 Linearidade

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Para que seja feita a quantificação, é necessário o conhecimento da dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (INMETRO, 2010).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, antes de fazer a regressão linear (INMETRO, 2010).

Para determinar a ausência de valores discrepantes, foi realizado o teste de Grubbs através da equação:

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{S_1}$$

Onde:

G = valor de Grubbs calculado

x_i = valor discrepante

\bar{x} = média aritmética dos valores do ponto da curva de calibração

S_1 = desvio padrão do ponto da curva de calibração

A partir do valor de Grubbs calculado, deve-se estabelecer comparação com o valor tabelado.

Foi realizado também o teste de Cochran para cálculo da homogeneidade das variâncias, através da equação:

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum S^2}$$

Onde:

C = valor de Cochran calculado

S_{\max}^2 = maior variância

$\sum S^2$ = soma de todas as variâncias

O valor de Cochran calculado deve ser comparado ao valor crítico obtido na tabela.

3.3.2.2 Faixa de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito em que o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

A faixa de trabalho aplicada constituiu-se nas concentrações da solução-padrão de histamina derivatizada de 0,045 a 0,315 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (INMETRO, 2007), podendo ser expressa pelo coeficiente angular da reta de regressão da curva de calibração, conforme a equação abaixo:

$$S_2 = \frac{dx}{dc}$$

Onde:

S_2 = sensibilidade

dx = variação da resposta

dc = variação da concentração

A sensibilidade foi determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (INMETRO, 2010).

3.3.2.4 Limite de detecção

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito é relevante ter o conhecimento acerca do menor valor de concentração que pode ser detectado pelo método. A importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável (INMETRO, 2010).

O limite de detecção foi determinado experimentalmente através da análise de diluições sucessivas do padrão de histamina de menor concentração da curva de calibração. Chegou-se a concentração mínima do padrão que gerou sinal de 3 a 5 vezes maior que o ruído da linha de base.

3.3.2.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde ao valor da média do branco somando-se cinco, seis ou dez desvios-padrão. Na prática, corresponde ao ponto de menor concentração da curva de calibração (INMETRO, 2010).

3.3.2.6 Repetitividade

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, ou de material de referência ou da adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

O parâmetro de validação foi avaliado através da repetitividade obtida com as injeções das sete concentrações dos pontos da curva de calibração e foi expressa através do coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR).

3.3.3 Análise estatística dos resultados

As concentrações de histamina foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (XLSTAT-Pro 7.5).

3.3.4 Análise bacteriológica

As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, localizado na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde foi procedida a contagem de bactérias histidina descarboxilase.

3.3.4.1 Preparo de soluções

O meio de Niven (1981) utilizado para o crescimento da microbiota de interesse, foi preparado em solução de 1000mL com os seguintes componentes e respectivas concentrações:

- 0,5% de triptona;
- 0,5% de NaCl;
- 0,5% de extrato de levedura;
- 0,1% de CaCO₃;
- 2,7% de padrão de dicloridrato de L-histidina;
- 2,0% de ágar;
- 0,006% de púrpura de bromocresol.

As substâncias mencionadas acima foram solubilizadas em água deionizada e o meio foi direcionado para o aquecimento até a geleificação do ágar. O indicador púrpura de bromocresol foi adicionado após a verificação do pH do meio apresentar-se em torno de 5,3. O meio preparado em Erlenmeyer foi direcionado para tubos de ensaio com posterior esterilização em autoclave vertical de Chamberland a 121°C por 10 minutos.

Foi efetuado o preparo de Solução Salina Peptonada (SSP) 0,1% através da adição de 1g de peptona, 8,5g de NaCl e 1000mL de água deionizada. A utilização de SSP tem como objetivo promover a viabilidade celular da microbiota presente na amostra. Volumes de 9mL foram direcionados para tubos de ensaio, os quais também foram esterilizados juntamente ao meio de Niven (1981).

3.3.4.2 Preparo de amostra

Os filés do pescado híbrido da cachara e do pintado e, de atum, foram descongelados sob refrigeração e mantidos em sua embalagem original. As latas dos filés processados termicamente, foram adequadamente higienizadas com detergente neutro e água corrente. As conservas enlatadas foram submetidas a pré-incubação, a qual baseia-se na incubação das amostras nas temperaturas de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ pelo período de 10 dias e a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ pelo período de 5 a 7 dias, objetivando a detecção de crescimento bacteriano com formação de gás, evidenciado pelo estufamento da embalagem e, a verificação de possíveis microfugas (BRASIL, 2003).

Em câmara asséptica, foi feito a desinfecção de bancada e utensílios com etanol 70%. A realização da análise procedeu-se em zona de segurança estabelecida pelo bico de Bunsen.

De cada filé de pescado, foram retiradas partes da porção muscular a fim de obter a massa estimada de 25,0g em balança semi-analítica.

As amostras foram pesadas em sacos para homogeneização do tipo Stomacher e foram adicionados 225mL de SSP 0,1%. A amostra em solução foi direcionada ao homogeneizador Stomacher 80, sob velocidade normal durante 120 segundos. Foi removida a alíquota de 1mL para tubos de ensaio previamente identificados com SSP 0,1% (Figura 7) em diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-5} . Cada tubo de ensaio foi homogeneizado e retirou-se a alíquota de 1mL para placas de Petri com as respectivas diluições.

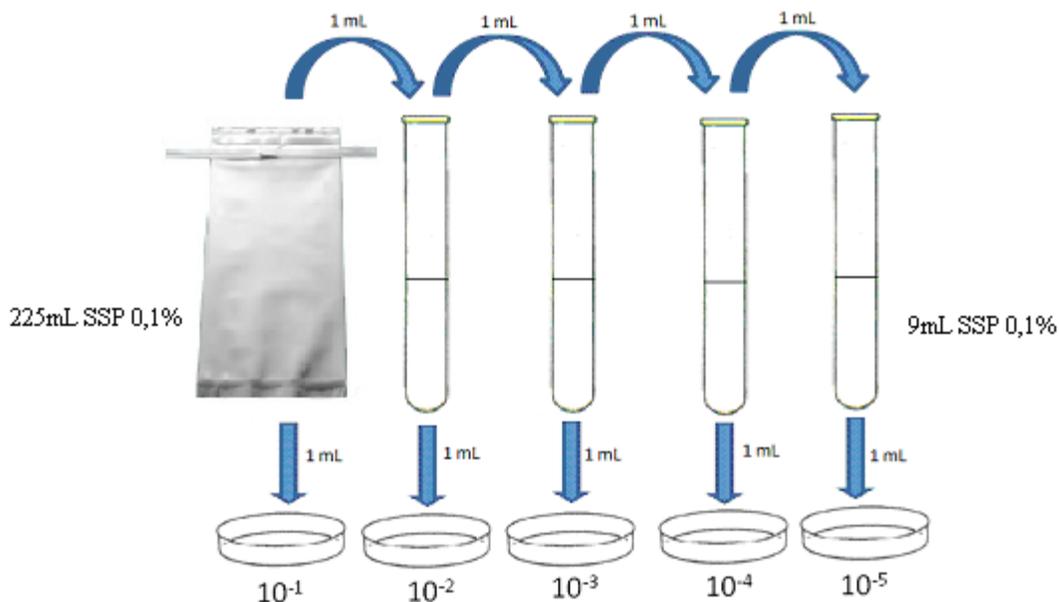


Figura 7 – Esquema de diluições seriadas em análise bacteriológica.

O meio de Niven (1981) foi fundido e mantido em banho-maria a 45°C para ser então, vazado 10mL em placas. Após este procedimento, foram realizados movimentos circulares nos sentidos horário e anti-horário, para a obtenção de distribuição uniforme dos microrganismos nas placas. Com a geleificação do ágar, acrescentou-se uma sobrecamada do meio. As placas foram incubadas a 35°C de 36 – 72 horas para posterior contagem.

3.3.4.3 Coloração de Gram

As etapas da coloração de Gram foram reproduzidas segundo Brasil (2003).

A partir da captação de colônias características, foi realizado o esfregaço em lâmina de microscopia. Foram utilizados os reagentes cristal violeta, solução de lugol, solução de álcool 95% e fucsina.

As etapas da coloração de Gram consistiram em:

- Adicionar cristal violeta na totalidade da lâmina de microscopia e aguardar por 1 minuto;
- Retirar o excesso de cristal violeta com água deionizada;

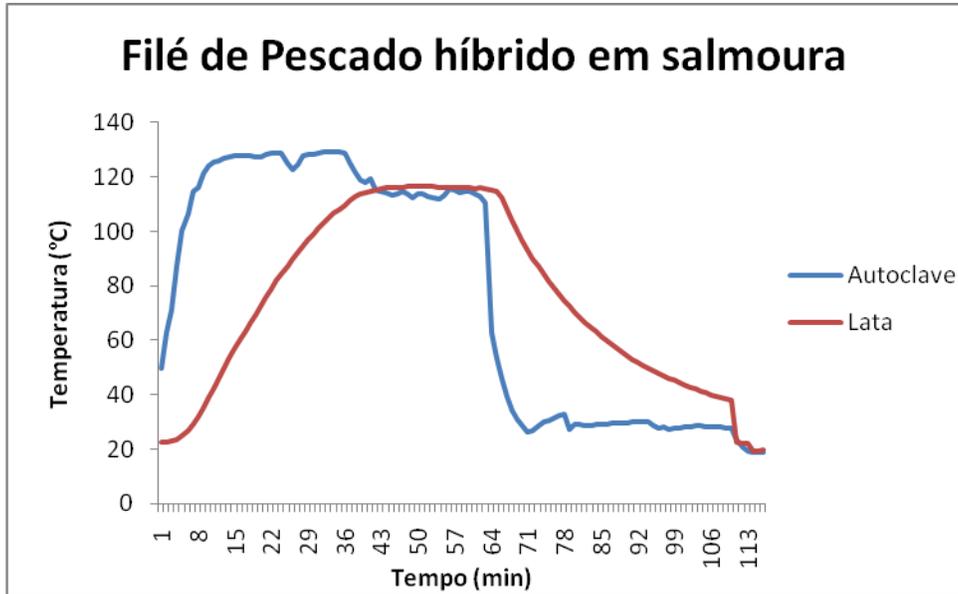
- Adicionar solução de lugol e aguardar por 1 minuto;
- Remover a solução de lugol com água deionizada;
- Adicionar solução de álcool 95% e aguardar por até 30 segundos;
- Remover a solução de álcool 95% com água deionizada;
- Adicionar fucsina e aguardar por 30 segundos;
- Remover a fucsina com água deionizada;
- Deixar secar no ambiente.

A visualização das colônias foi realizada em microscópio óptico com adição prévia de óleo de imersão e a partir das características morfo-tintoriais das colônias, as mesmas foram classificadas em Gram positivas ou Gram negativas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processamento Térmico

A partir do monitoramento de temperatura da autoclave e de uma conserva enlatada aleatoriamente selecionada, foram obtidos os gráficos da Figura 8:



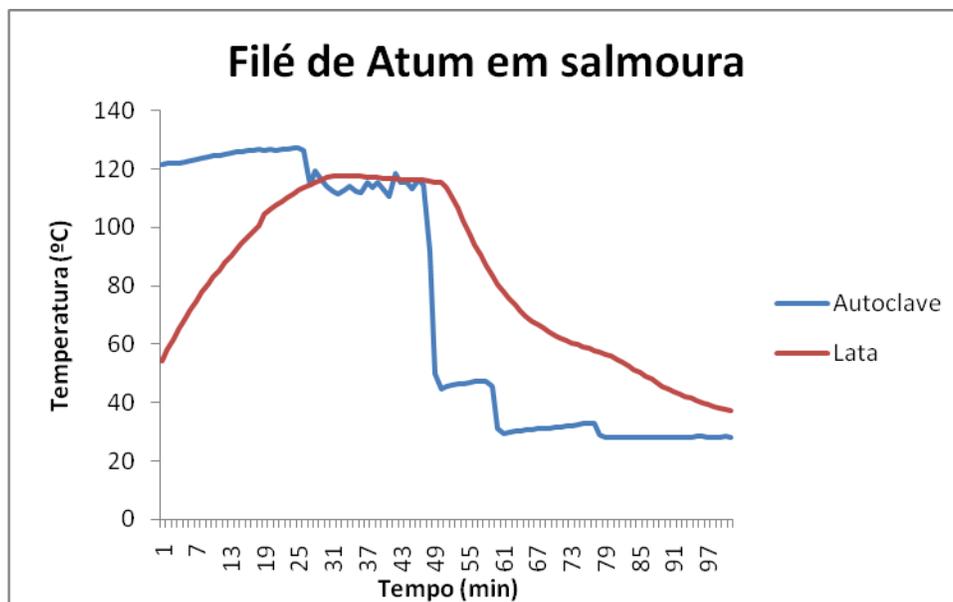
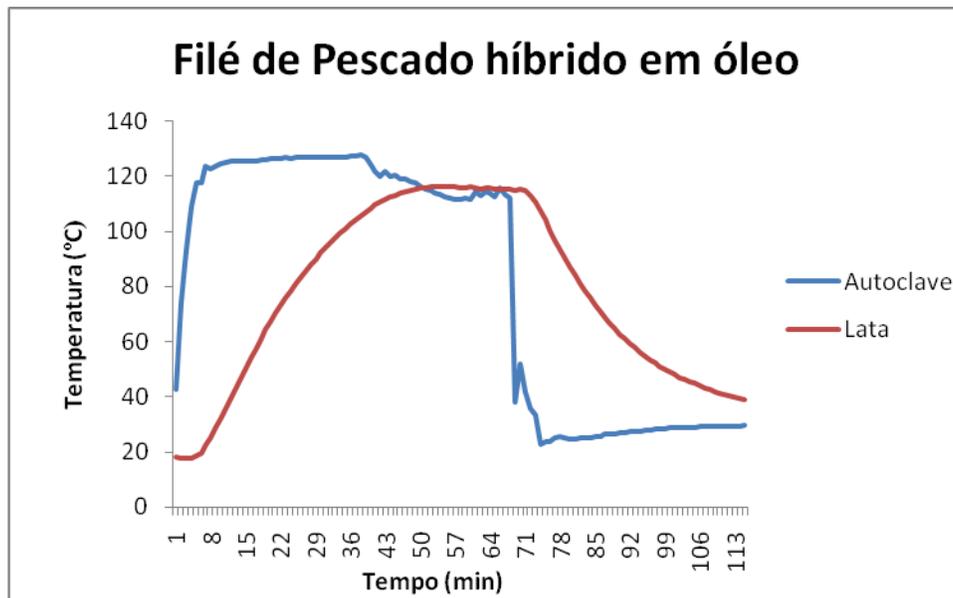


Figura 8 – Gráficos do processo de apertização de conservas enlatadas.

Com os dados gerados nas etapas de aquecimento, esterilização e resfriamento *versus* tempo de processamento, obtiveram-se as taxas de letalidade (F_0) do filé de pescado híbrido em salmoura a 2% e em óleo de girassol e do filé de atum, os quais corresponderam a 8,4min, 8,6min e 9,8min, respectivamente. A taxa de letalidade corresponde ao tempo necessário para reduzir a população microbiana por um múltiplo do valor de D (FELLOWS, 2006).

4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A solução-padrão de dicloridrato de histamina foi preparada a fim de determinar o tempo de retenção (t_R) do analito (Figura 9), para ser utilizado como parâmetro comparativo no perfil cromatográfico da matriz. A partir da solução estoque do padrão na concentração de $333,2976\mu\text{g mL}^{-1}$, o mesmo foi diluído para a concentração de $120\mu\text{g mL}^{-1}$ e então, foi removida a alíquota de $50\mu\text{L}$ para posterior derivatização.

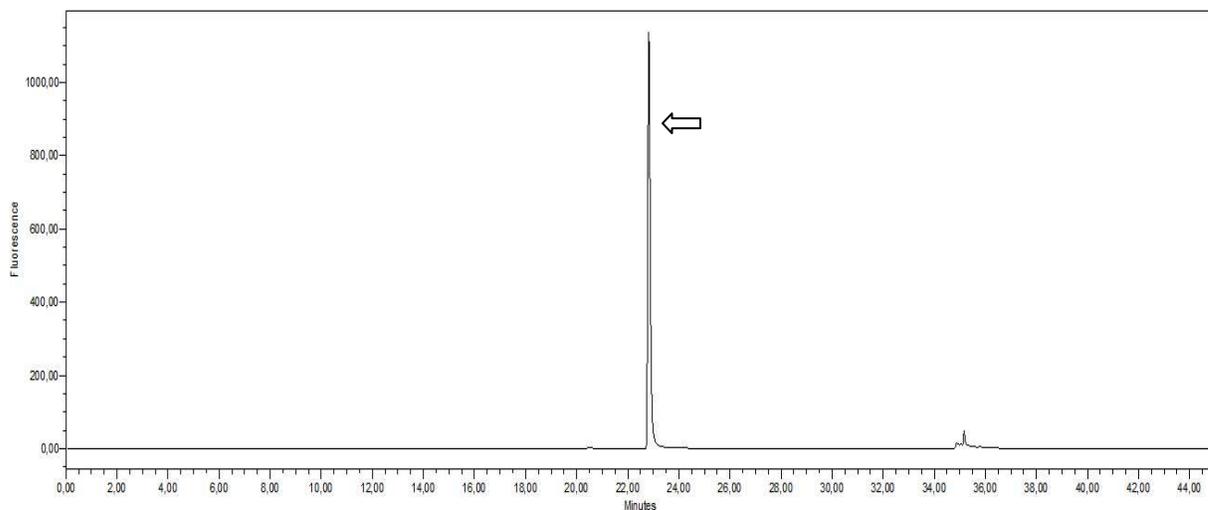


Figura 9 – Cromatograma do padrão de histamina na concentração de $120\mu\text{g mL}^{-1}$. A seta indica o pico referente ao padrão de histamina.

Como pôde ser observado na Figura 9, há a presença de um pico no t_R de aproximadamente 22,823min. O pico gerou a área correspondente a $0,06\mu\text{g}$ de histamina. A formação de outro pico no t_R de 34,786min, corresponde a etapa de limpeza da coluna na proporção das fases móveis de 60 AcN : 40 H_2O . Tal fato foi confirmado através do preparo e injeção do branco do reagente (Figura 10), ou seja, sem adição-padrão.

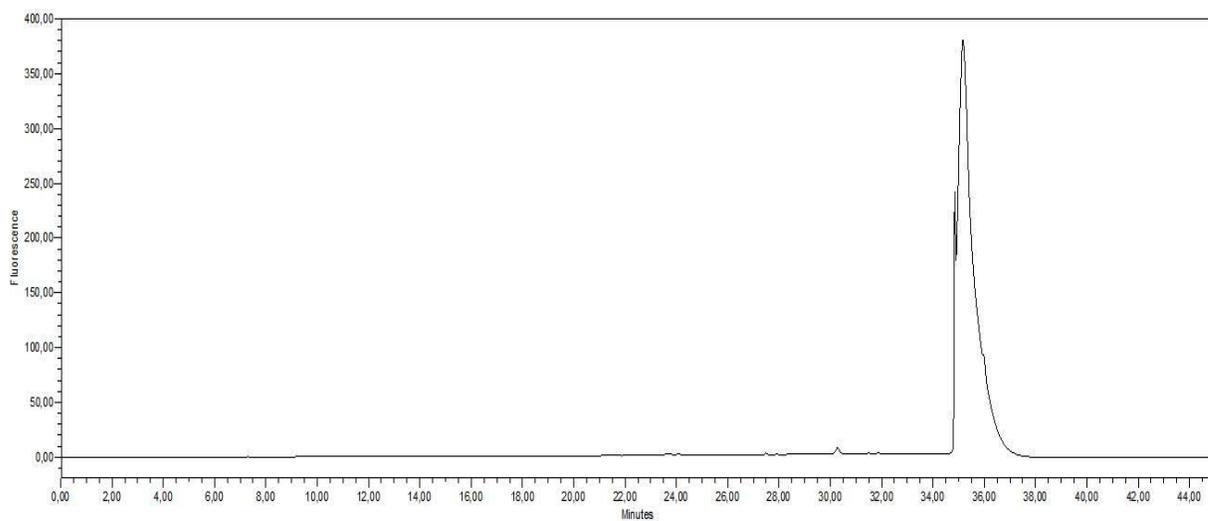


Figura 10 – Cromatograma do branco do reagente.

Uma alíquota de extrato da amostra de filé de pescado híbrido *in natura* foi injetada com o objetivo de observar o perfil cromatográfico da matriz (Figura 11) e comparar o t_R do analito com o padrão.

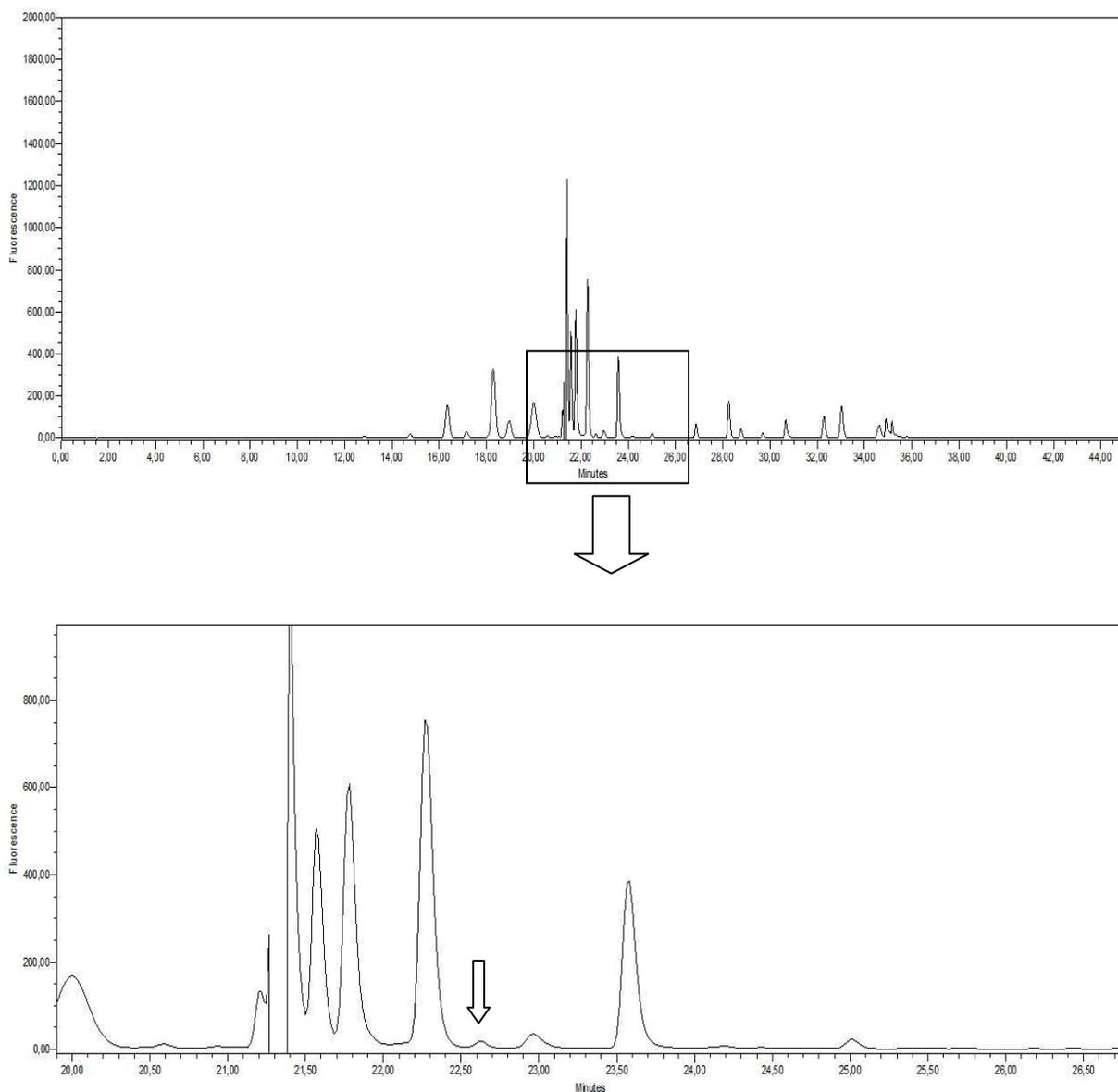


Figura 11 – Cromatogramas referentes à amostra de filé de pescado híbrido *in natura*. A seta evidencia o pico referente à histamina.

Para ratificar a correlação entre os t_R , foram adicionados 20 μ L de padrão na amostra (Figura 12) em concentração de 33,32976 μ g mL⁻¹, o que representou o aumento da área do pico do analito.

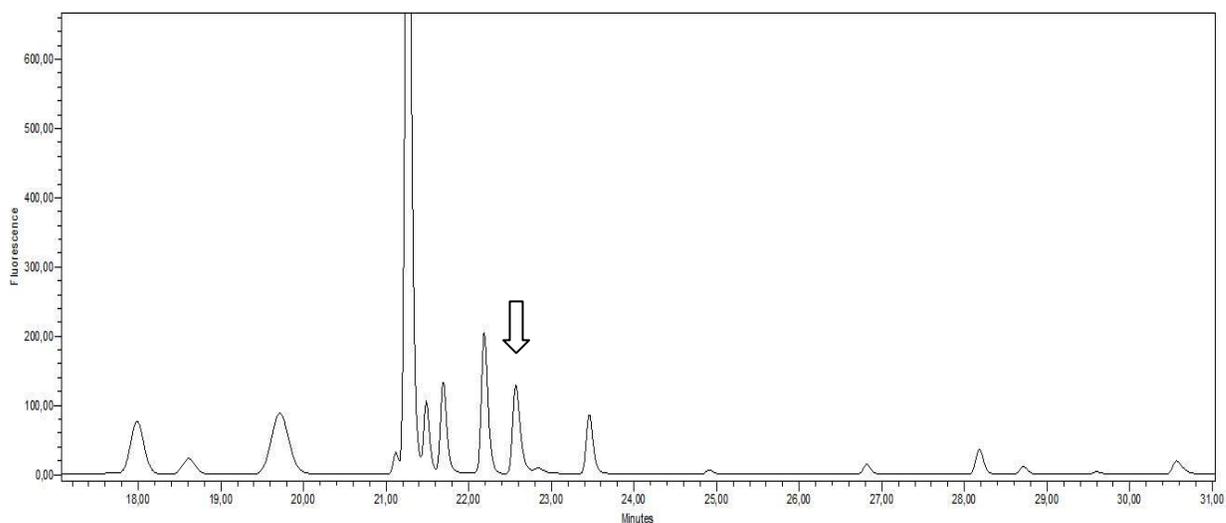


Figura 12 – Cromatograma correspondente à amostra de filé de pescado híbrido *in natura* com adição-padrão. A seta indica o pico referente à histamina com adição-padrão.

4.3 Parâmetros de Validação

4.3.1 Linearidade

A partir da confirmação do pico referente à histamina em amostra, foi realizada a curva de calibração (Figura 13) com sete pontos em triplicata, na faixa de concentração de $0,045 - 0,315 \mu\text{g mL}^{-1}$ do padrão de histamina.

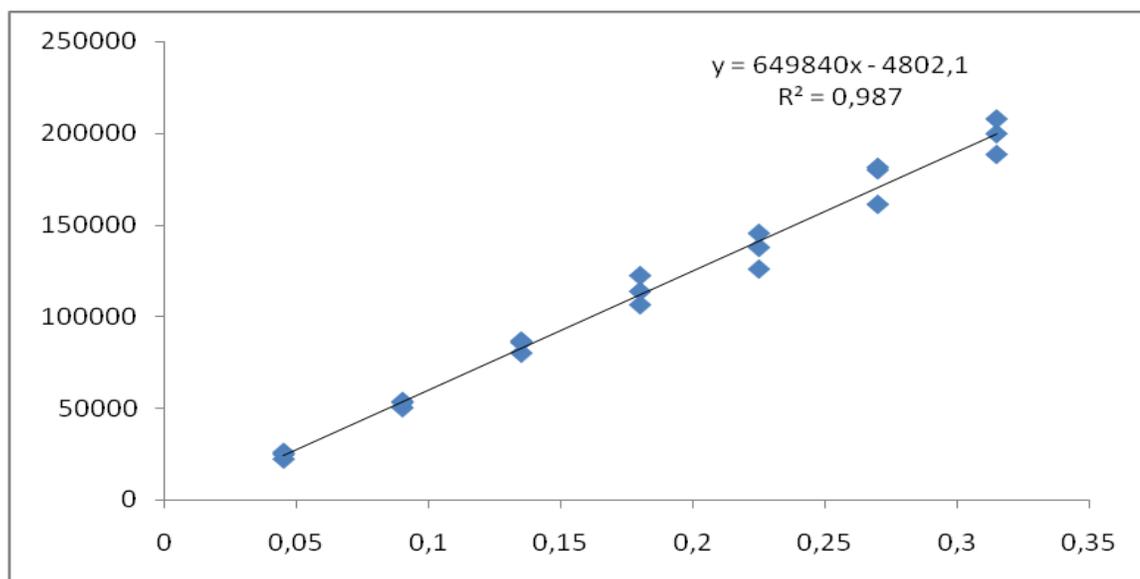


Figura 13 – Curva de calibração por padronização externa.

O coeficiente de correlação linear (r^2) superior a 0,98 apresentou resultado satisfatório.

A partir da execução do teste de Grubbs na busca de valores discrepantes, nenhum valor da curva foi descartado em um intervalo de confiança de 95%. Também foi realizada análise dos resíduos das variâncias através do teste de Cochran. O gráfico obtido está representado na Figura 14:

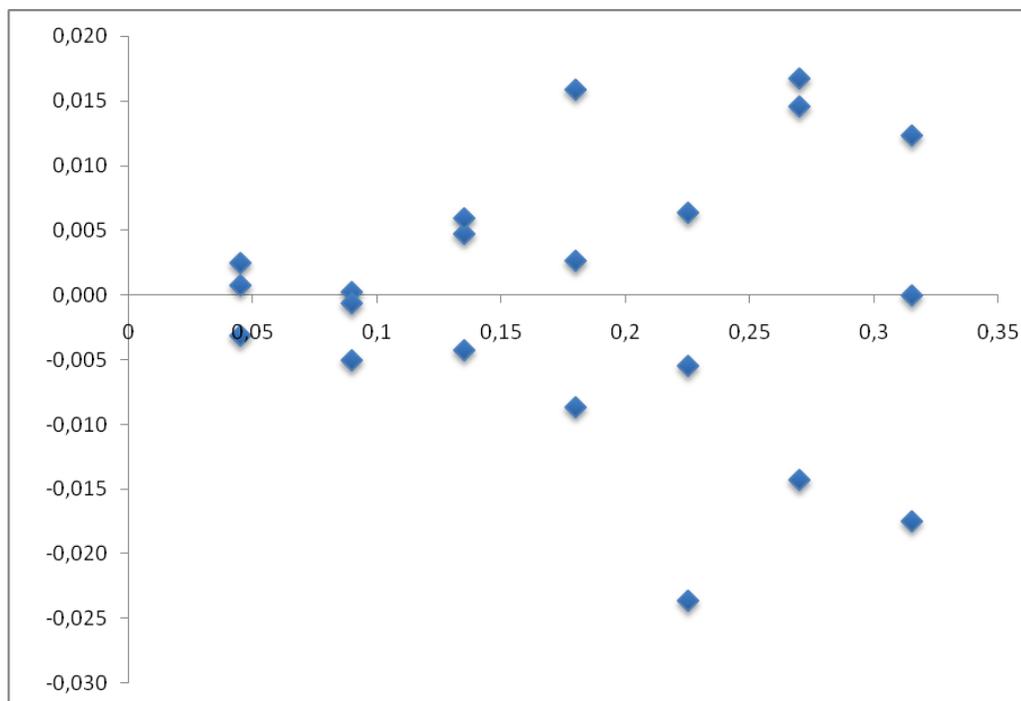


Figura 14 – Gráfico de resíduos dos pontos da curva de calibração.

O valor de Cochran calculado foi inferior ao valor crítico ($\alpha = 0,05$), o que caracteriza a homogeneidade das variâncias. O gráfico de resíduos representa a ausência de tendências, ou seja, os pontos estão distribuídos de forma aleatória ao redor do eixo x. Pode-se concluir que os resultados obtidos a partir da curva de calibração apresentam linearidade em toda a faixa de trabalho aplicada.

4.3.2 Sensibilidade

A partir da equação para o cálculo de sensibilidade, foi obtido o valor de 687093, que demonstra boa sensibilidade. No caso de uma baixa sensibilidade do método, a curva de calibração apresentaria pequenas variações na resposta do equipamento (área do pico) a partir de baixas concentrações da solução injetada.

4.3.3 Limite de detecção

Através de diluições sucessivas da solução-padrão e avaliação da relação sinal/ruído, o limite de detecção estabelecido para o método foi de $0,015\mu\text{g mL}^{-1}$, o que representa $0,3\text{mg kg}^{-1}$ em relação à amostra. Tal concentração definida, mostrou-se bem abaixo do limite proposto pela legislação vigente (BRASIL, 1997) que corresponde a 100mg kg^{-1} .

4.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação definido foi de $0,045\mu\text{g mL}^{-1}$, que corresponde ao primeiro ponto da curva de calibração. Em relação à amostra, a concentração mínima para obter quantificação, foi de $0,9\text{mg kg}^{-1}$.

4.3.5 Repetitividade

O coeficiente de variação obtido nas injeções dos sete pontos das triplicatas da curva de calibração, correspondeu a 5,86%, o que demonstrou a precisão do método.

4.4 Resultados de Análise de Histamina das Amostras por CLAE

As amostras de filé de pescado híbrido *in natura*, filé de pescado híbrido em salmoura, filé de pescado híbrido em óleo de girassol, filé de atum *in natura* e filé de atum em salmoura foram analisadas conforme o método analítico já descrito. Os resultados dos níveis de histamina das amostras estão representados na Tabela 2:

Tabela 2 – Concentrações de histamina (mg kg^{-1}) em amostras de pescado pré e pós-processado.

	FPHIN*	FPHS*	FPHOG*	FAIN*	FAS*
Semana 1	$2,41 \pm 0,58^a$	$1,15 \pm 0,20^a$	$1,40 \pm 0,50^a$	$2,19 \pm 0,07^a$	$1,39 \pm 0,24^a$
Semana 2	$2,27 \pm 0,44^a$	$1,20 \pm 0,24^a$	$1,65 \pm 0,07^a$	$1,62 \pm 0,02^b$	$1,32 \pm 0,07^a$
Semana 3	$2,94 \pm 0,88^a$	$1,36 \pm 0,48^a$	$1,25 \pm 0,30^a$	$1,65 \pm 0,17^b$	$1,05 \pm 0,01^a$
Semana 4	$2,02 \pm 0,18^a$	$1,16 \pm 0,15^a$	$1,48 \pm 0,14^a$	$2,54 \pm 0,07^a$	$1,52 \pm 0,09^a$

Média \pm desvio padrão

Médias seguidas de mesma letra sobrescrita, não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*FPHIN - Filé de pescado híbrido *in natura*; FPHS - Filé de pescado híbrido em salmoura; FPHOG - Filé de pescado híbrido em óleo de girassol; FAIN - Filé de atum *in natura*; FAS - Filé de atum em salmoura.

A partir de análise estatística das concentrações de histamina em cada amostra (Tabela 2), verificou-se que não houve diferença significativa entre as semanas ($p > 0,05$) exceto, em amostra de filé de atum *in natura*. Portanto, as médias foram submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

É notória a redução na concentração de histamina nas conservas enlatadas mas, a sua termorresistência não pode ser refutada, pois a histamina apresenta alta solubilidade em água e moderada solubilidade em óleo, o que sugere a migração parcial da histamina para o líquido de cobertura. Outra hipótese a ser investigada em trabalhos subsequentes é a migração parcial de histamina na etapa de imersão dos filés em salmoura a 3% durante 40 minutos.

Em amostras de filé de pescado híbrido em salmoura e em óleo de girassol, os níveis de histamina foram superiores em óleo, exceto na semana 3, o que permite inferir a maior solubilidade da histamina em água.

O estudo desenvolvido por Shakila et al. (2005) corrobora a diminuição nos índices de histamina em conservas enlatadas. Foram avaliadas amostras de atum (*Katsuwonus pelamis*), sardinha (*Sardinella gibbosa*) e “seer fish” (*Scomberomorus commersonii*), *in natura*, pré-cozidas e em conservas à base de óleo. As amostras pré-cozidas apresentaram menores concentrações de histamina, com destaque para o atum. Nas conservas enlatadas também ocorreu redução na quantidade de histamina. Os autores citaram que as condições de pré-cozimento e subsequente processo de esterilização comercial, reduzem significativamente os níveis de histamina e, a perda de histamina durante o pré-cozimento pode estar presente na água drenada. Shakila et al. (2005) relataram a redução nos níveis de histamina de $8,7 \text{ mg kg}^{-1}$ para $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ em trabalho realizado por López-Sabater et al. (1994), em amostras de atum após a etapa de pré-cozimento.

Com base na matriz utilizada no presente estudo e pesquisas bibliográficas, apenas Schulz (2009) utilizou o reagente AQC como agente de derivatização pré-coluna em análise de histamina. O autor analisou 9 amostras de atum enlatado e todas apresentaram índices de histamina abaixo do limite de detecção ($1,6 \text{ mg kg}^{-1}$) estabelecido no método.

Em trabalho realizado por Silva et al. (2011), amostras de atum *in natura* (*Thunnus obesus* e *Thunnus albacares*) e conservas em salmoura, em óleo, em molho de tomate e, em ervas, foram avaliadas em relação a concentração de histamina por CLAE com detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) e, derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído. A faixa de concentração determinada para o atum *in natura* foi de $0,71$ a $5,30 \text{ mg kg}^{-1}$, com média de $1,30 \text{ mg kg}^{-1}$. Em relação as conservas enlatadas, os teores de histamina determinados variaram de $0,45$ a $83,73 \text{ mg kg}^{-1}$ e a média determinada correspondeu a $4,41 \text{ mg kg}^{-1}$. Assim, como observado no presente estudo, os índices de histamina em conservas a base de óleo foram superiores às aquelas enlatadas com salmoura. As médias das concentrações determinadas em análise por Silva et al. (2011) também corroboram os baixos teores obtidos nesse estudo.

Em recente estudo realizado por Tao et al. (2011b), amostras de conservas enlatadas de atum e pescado fresco *in natura* do mesmo, apresentaram 19 mg kg^{-1} e 1439 mg kg^{-1} de histamina, respectivamente. O consumo de altas concentrações de histamina torna o quadro de intoxicação escombróide mais severo. A fim de corroborar com tal afirmação, no ano de 2001, três indivíduos ingeriram o conteúdo de conservas enlatadas de cavala, peixe da família *Scombridae*, o qual foi analisado por CLAE com derivatização pré-coluna com cloreto de benzoíla e, determinada a concentração de 1539 mg kg^{-1} de histamina (TSAI et al., 2005). A sintomatologia desenvolvida permaneceu até 12 horas após o consumo. Com a finalidade de investigar as causas do ocorrido, foram coletadas três amostras do mesmo lote para determinação

de histamina e outras aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, triptamina, 2-feniletilamina, espermidina, espermina, tiramina e agmatina), onde se obtiveram índices na faixa de 612 – 941mg kg⁻¹ de histamina e teor de aminas biogênicas inferior a 100mg kg⁻¹, portanto, a partir da amostragem, foi concluído pelos autores que as conservas do mesmo lote foram formuladas a partir de matéria-prima de baixa qualidade físico-química e bacteriológica e, foi questionada com base em dados obtidos na literatura, a participação de outras aminas biogênicas na potencialização dos efeitos causados pela histamina.

Mercogliano et al. (2008) determinaram a concentração de histamina (5,24 – 8,23mg kg⁻¹) em amostra de atum fresco (*Thunnus thynnus*) por CLAE com derivatização pré-coluna com cloreto de dansila, o que permite comparar com os baixos teores de histamina determinados no presente estudo. Vale ressaltar que baixas concentrações de histamina não eliminam o potencial risco à saúde do indivíduo, pois uma constante exposição do peixe a temperatura ambiente viabiliza o crescimento de bactérias histidina descarboxilase, que por sua vez, sintetizam histamina.

4.5 Contagem de bactérias histidina descarboxilase

As amostras de pescado híbrido, atum e respectivas conservas enlatadas, obtiveram os seguintes resultados descritos na Tabela 3:

Tabela 3 – Contagem de bactérias histidina descarboxilase em pescado pré e pós-processado (log UFC g⁻¹).

Amostras	Contagem (log UFC g⁻¹)
FPHIN	4,60 ± 0,42
FPHS	ausência
FPHOG	ausência
FAIN	1,80 ± 0,14
FAS	ausência

FPHIN - Filé de pescado híbrido *in natura*; FPHS - Filé de pescado híbrido em salmoura; FPHOG - Filé de pescado híbrido em óleo de girassol; FAIN - Filé de atum *in natura*; FAS - Filé de atum em salmoura.

Como pôde ser observado na Tabela 3 nenhuma das conservas enlatadas apresentou crescimento de bactérias histidina descarboxilase, o que permite afirmar que não houve condições necessárias para a biossíntese de histamina após o processamento térmico, exceto no caso de manipulação inadequada após a abertura das conservas.

Foi realizado um esfregaço pelo método de Gram com a finalidade de identificar as características morfo-tintoriais das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) típicas, presentes no meio de Niven (1981), onde foram caracterizados bastonetes Gram negativos, que são característicos da família *Enterobacteriaceae*.

O meio de Niven (1981) não é seletivo para bactérias histidina descarboxilase, portanto, houve o crescimento de colônias não-características. Com a finalidade de ratificar tal fato, as amostras também foram semeadas em meio controle de Niven sem a adição do padrão de L-histidina, o que resultou no crescimento de colônias não-características.

O crescimento de bactérias histidina descarboxilase (Figura 15) caracteriza-se por formação de colônias púrpuras, com halo púrpuro e plano de fundo amarelo. A biossíntese de histamina, torna o pH do meio alcalino, o que promove alteração na coloração do indicador púrpura de bromocresol.

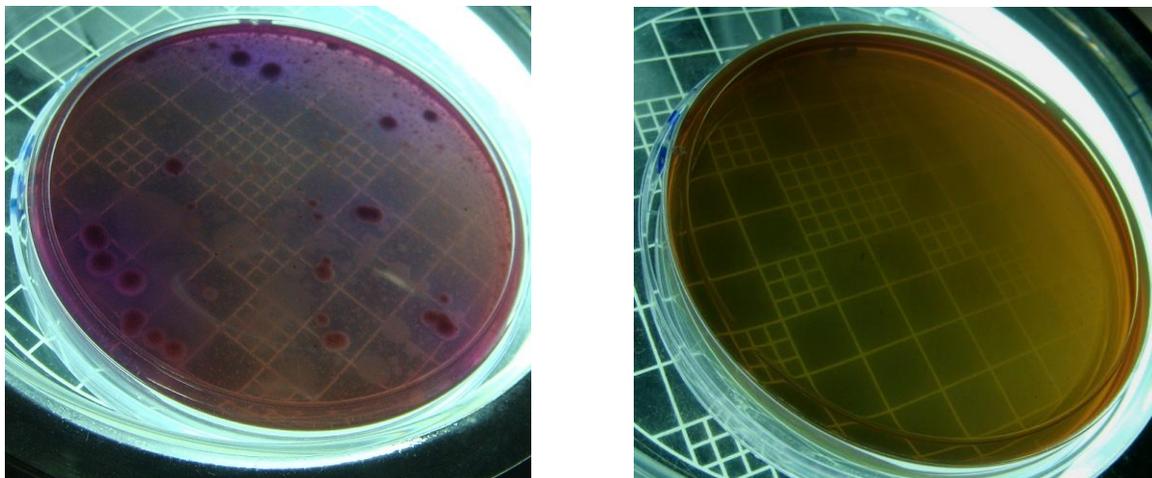


Figura 15 – Representação de crescimento de bactérias histidina descarboxilase em amostra de filé de pescado *in natura* e ausência em conserva enlatada.

O crescimento de bactérias histidina descarboxilase foi menor em amostra de filé de atum *in natura* em comparação a amostra de filé de pescado híbrido *in natura*. Isto sugere que a amostra de filé de pescado híbrido *in natura* forneceu melhores condições para a biossíntese de histamina. Alguns fatores como época de captura, método e área de pesca, lavagem dos peixes com água do mar, rápido resfriamento na embarcação e manutenção da cadeia do frio e, manipulação do pescado em condições higiênico-sanitárias adequadas, podem justificar as variações de crescimento bacteriano nas matérias-primas.

Embora o meio de Niven (1981) seja considerado uma forma de seleção de colônias bacterianas características, alguns autores (BARANOWSKI et al., 1985; CHEN et al., 1989; LÓPEZ-SABATER et al., 1996) relataram a ocorrência de reações falso positivas devido algumas cepas de bactérias não produtoras de histidina descarboxilase, elevarem o pH do meio através da síntese de metabólitos alcalinos, o que justifica a baixa especificidade do meio de cultura. Baranowski (1985) mencionou a limitação de outra técnica bacteriológica baseada na produção de gás por atividade de histidina descarboxilase devido ao aparecimento de resultados falso positivos. Também foram descritos na literatura (ACTIS et al., 1999; YOSHINAGA & FRANK, 1982) casos de falsos negativos na análise bacteriológica pois, o pH utilizado no meio (5,3) pode inibir no crescimento das bactérias de interesse. As desvantagens descritas anteriormente também foram relatadas no desenvolvimento de um novo meio de cultura sem adição de ágar (YAMANI & UNTERMANN, 1985). Alguns autores (CHEN et al., 1989; MAVROMATIS & QUANTICK, 2002) desenvolveram pesquisas a fim de otimizar a utilização

do meio de Niven (1981), através da modificação do pH do meio, tempo e temperatura de incubação.

Björnsdóttir-Butler et al. (2010) destacaram a possibilidade da utilização de outros métodos a fim de ratificar a presença de colônias bacterianas presuntivamente positivas em meio de Niven (1981). Métodos moleculares baseados na amplificação do ácido nucléico presente nos genes de histidina descarboxilase e outros tipos de PCR são utilizados de forma complementar.

5 CONCLUSÕES

A metodologia aplicada na análise de histamina em conservas de pescado demonstrou confiabilidade através da avaliação dos parâmetros de validação (linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e repetitividade).

As amostras analisadas apresentaram uma faixa de concentração correspondente a 1,05 - 2,94mg kg⁻¹, portanto, bem abaixo da legislação vigente (BRASIL, 1997).

A redução nos níveis de histamina nas amostras de pescado em conserva em comparação ao filé *in natura*, pode estar associada a migração parcial de histamina no líquido de cobertura e de imersão dos filés.

Sugere-se o desenvolvimento de metodologia analítica para extração de histamina e outras aminas biogênicas em líquido de cobertura e de imersão dos filés, a fim de ratificar a redução nos níveis de histamina das conservas enlatadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTIS, L. A. et al. Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, p. 79-90, 1999.

ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1034p.

ANTOINE, F. R. et al. Gas Chromatographic Analysis of Histamine in Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4754-4759, 2002.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA. 17 ed., 2000.

ARANG, J. M. et al. Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. **Nature**, v. 327, p. 117-123, 1987.

BARANOWSKI, J. D.; 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**, v. 9, p. 349-360, 1985.

BARANOWSKI, J. Assay for histidine decarboxylase activity. In: Histamine in marine products: Production by bacteria, measurement and prediction of formation, PAN, B. S.; JAMES, D. FAO Fisheries Technical Paper, 252, p. 10-13, 1985.

BARDÓCZ, S. et al. Polyamines in food: implications for growth and health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 66-71, 1993.

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

BATISTA, L. X. **Tecnologia de produção de conserva de Tilápia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758 – Linhagem chitralada)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1997. 1087p.

BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER, K. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 161-167, 2010.

BLACK, J. W. et al. Definition and antagonism of histamine H2-receptors. **Nature**, v. 236, p. 385-390, 1972.

BOURGEIOS, C.; LARPENT, J. P. **Microbiología** Alimentar. Zaragoza: Acribia, 1994. 366p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 de maio de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instruções para a Autorização de Uso de Produtos. **Portaria nº 63, de 13 de novembro de 2002**. Projeto de Instrução Normativa que trata dos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Conserva de Peixes, Conservas de Sardinhas, Conserva de Atum e Bonito. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 de novembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011**. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Pescado e seus Derivados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 3 de junho de 2011.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília, fevereiro de 2012. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf. Acesso em: 16 de abril de 2012.

BREMER, P. J. et al. The thermal death times of *Hafnia alvei* in a model suspension and in artificially contaminated hot smoked kahawai (*Arripis trutta*). **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1047-1051, 1998.

BRINK, B. T. et al. Occurrence and formation of biologically activities amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 73-84, 1990.

CANELLAKIS, Z. N.; MARSH, L. L.; BONDY, P. K. Polyamines and their derivatives as modulators in growth and differentiation. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 62, p. 481-491, 1989.

CE (Conformité Européenne). Directiva de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas aplicables a la producción y puesta en el mercado de lós productos pesqueros (91/439/EEC). **Diario Oficial de la Comunidad Europea**, v. 286, p. 15-34, 1991.

CHEN, C. M. et al. Comparison of four agar media for detection of histamine-producing bacteria in tuna. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 808-813, 1989.

CINQUINA, A. L. et al. Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 79-85, 2004.

COELHO, S. R. C.; CYRINO, J. E. P. Custos na produção intensiva de surubins em gaiolas. **Informações Econômicas**, SP, v. 36, n. 4, 2006.

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

DRAISCI, R et al. Improved ion chromatography–integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented foods. **Journal of Chromatography A**, v. 798, p. 109-116, 1998.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO R. M.; PAVANELLI, G. C. *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: A morphological and morphometric study. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 154-158, 2009.

ETKIND, P. et al. Bluefish-associated scombroid poisoning. An example of the expanding spectrum of food poisoning from seafood. **Journal of American Medical Association**, v. 258, n. 23, p. 3409-3410, 1987.

FADDA, S.; VIGNOLO, G.; OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 2015-2019, 2001.

FAGUNDES, M; URBINATI, E. C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 276, p. 112-119, 2008.

FAO. 2010a. **Biological characteristics of tuna**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/16082/en>. Acesso em: 09 de abril de 2012.

FAO. 2010b. **Tuna resources**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/12251/en>. Acesso em: 11 de abril de 2012.

FDA. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance**. Washington, DC: Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Safety, Food and Drug Administration, 2011. 468p.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FRAZÃO, A. S. **Efeito do tratamento térmico e do manto de lula do período de armazenamento na modificação do perfil eletroforético das proteínas (*Doryteuthis plei Blainville, 1823*)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

FRATTINI, V.; LIONETTI, C. Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography: Derivatization with *o*-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of “free” species. **Journal of Chromatography A**, v. 809, p. 241-245, 1998.

GENNARO, M. C. et al. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in semi-hard Italian cheese (Toma). **Food Chemistry**, v. 82, p. 545-551, 2003.

GERMER, S. P. M. et al. **Princípio de Esterilização de alimentos**. Manual técnico, 10. 2ª edição. Campinas: ITAL, 1995. 123p.

GLÓRIA, M. B. A. et al. Histamine and other biogenic amines in *Albacore tuna*. **Journal of Aquatic Food Products and Technology**, v. 8, n. 4, p. 55-69, 1999.

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

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. 608p.

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

GOUVEIA, N. N. F. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de aminas biogênicas em tunídeos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade da Madeira, Funchal, 2009.

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

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

HEBY, O. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. **Differentiation**, v. 19, p. 1-20, 1981.

HEBY, O. et al. Polyamines: regulators of mammalian cell growth and differentiation. In: DOWLING, R. H; FÖLSCH, U. R; LÖSER, C. Polyamines in the gastrointestinal tract. **Falk Symposium**, v. 62, p. 19-28, 1992.

HERNÁNDEZ-ORTE, P. et al. Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 160-164, 2006.

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

IJOMAH, P. et al. Further volunteer studies on scombrototoxicosis. In: BURT, J. R.; HARDY, R.; WHITTLE, K. J. **Pelagic Fish: The Resource and its Exploitation**. Oxford: Fishing News Books, p. 194-199, Chapter 17, 1992.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ-CGCRE-008)**, 2007, 24p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008)**, 2010, 20p.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JÄNNE, J.; PÖSÖ, H.; RAINA, A. Polyamines in rapid growth and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 473, p. 241-293, 1978.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Artmed, 2005. 712p.

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

KLAUSEN, N. K.; HUSS, H. H. Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology** v. 5, p. 147-156, 1987.

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

LERKE, P. A. et al. Scombroid poisoning. Report of an outbreak. **Western Journal of Medicine**, v. 129, p. 381-386, 1978.

LEUSCHNER, R. G. K.; HAMMES W. P. Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. **Meat Science**, v. 49, p. 289-298, 1998.

LIAO, W. et al. Use of capillary electrophoresis with UV detection as a screening method to determine histamine in fish samples. **Journal of Chromatography A**, v. 853, p. 541-544, 1999.

LIEBER, E. R.; TAYLOR, S. L. Comparison of thin-layer chromatographic detection methods for histamine from food extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 160, p. 227-237, 1978a.

LIEBER, E. R.; TAYLOR, S. L. Thin-layer chromatographic screening methods for histamine in tuna fish. **Journal of Chromatography A**, v. 153, p. 143-152, 1978b.

LIMA, A.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas Bioativas em Alimentos. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

LINDEBERG, J. Capillary electrophoresis in food analysis. **Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 73-94, 1996.

LIRANÇO, A. D. S.; ROMAGOSA, E.; SCORVO-FILHO, J. D. Desempenho produtivo de *Pseudoplatystoma corruscans* estocados em sistemas de criação: semi-intensivo (viveiro escavado) e intensivo (tanque-rede). **Ciência Rural**, v. 41, n. 3, p. 524-530, 2011.

LÓPEZ-SABATER, E. I. et al. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 318-323, 1994.

LÓPEZ-SABATER, E. I. et al. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 411-418, 1996.

MAVROMATIS, P.; QUANTICK, P. C. Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 546-551, 2002.

McCARTHY, S.; BURKHARDT III, W. Efficacy of electrolyzed oxidizing water against *Listeria monocytogenes* and *Morganella morganii* on conveyor belt and raw fish surfaces. **Food Control**, v. 24, p. 214-219, 2012.

MERCOGLIANO, R. et al. Evaluation of histamine profile in *Thunnus thynnus* processed seafoods. **Veterinary Research Communications**, v. 32, Suppl. 1, p. 331-333, 2008.

MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical Quality index of Canned Tuna as Determined by High-Pressure Liquid Chromatography. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 155-158, 1977.

MITSUHASHI, M.; PAYAN, D. G. Functional diversity of histamine and histamine receptors. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, Suppl. 6, p. 8-11, 1992.

MORRIS, A. I. The success of histamine-2 receptor antagonists. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 27, Suppl. 194, p. 71-75, 1992.

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

NIVEN, C. F.; JEFFREY, M. B.; CORLETT, D. A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 321-322, 1981.

OBRINK, K. J. Histamine and gastric acid secretion. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 26, Suppl. 180, p. 4-8, 1991.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca**. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430p.

OGURI, S.; YONEYA, Y. Assay and biological relevance of endogenous histamine and its metabolites: Application of microseparation techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 781, p. 165-179, 2002.

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

ÖZDESTAN, O; ÜREN, A. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 78, p. 1321-1326, 2009.

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

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

PEARCE, F. L. Biological effects of histamine: an overview. **Agent Actions**, v. 33, p. 4-7, 1991.

PEGG, A. E.; McCANN, P. P. Polyamine metabolism and function. **American Journal of Physiology**, v. 243, n. 5, p. 212-221, 1982.

PEÑA, C. V. M. **Histamina e Tiramina em Embutidos Cárneos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

PENG, J. et al. Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1209, p. 70-75, 2008.

PFEIL, E. C. et al. Avaliação da qualidade da conserva de Sardinha sem pré-cozimento. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 60, p. 63-67, 1999.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. **A Embrapa e a aqüicultura: demandas e prioridades de pesquisa**. (ed. Embrapa informações tecnológicas) Brasília, p. 40, 2002.

RESENDE, A. L. S. S. **Viabilidade Técnica, Qualidade Nutricional e Sensorial de Produtos à Base de Carne de Tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

RICE, S. L.; EITENMILLER, R. R.; KOEHLER, P. E. Biologically active amines in food: a review. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 39, n. 5, p. 353-358, 1976.

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

RUSSELL, F. E.; MARETIC, Z. Scombroid poisoning: mini-review with case histories. **Journal of the International Society on Toxinology**, v. 24, n. 10, p. 967-973, 1986.

SCHULZ, D. F. **Desenvolvimento de Método Rápido de Análise de Histamina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Atum**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

SEILER, N. et al. Endogenous and exogenous polyamines in support of tumor growth. **Cancer Research**, v. 50, n. 16, p. 5077-5083, 1990.

SEILER, N.; ATANASSOV, C. L.; RAUL, F. Polyamine metabolism as target for cancer chemoprevention (review). **International Journal of Oncology**, v. 13, p. 993-1006, 1998.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.

SHAKILA, R. J. et al. Effect of delayed processing on changes in histamine and other quality characteristics of 3 commercially canned fishes. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, 2005.

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

SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213-231, 1996.

SILVA, T. M. et al. Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. **Food Control**, v. 22, p. 323-327, 2011.

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

SMITH, T. Amines in Food. **Food Chemistry**, v. 6, p. 169-200, 1981.

STECH, M. R. **Enzimas Exógenas na Alimentação de Cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*)**. 2009. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

STEPHEN, N. M. et al. Effect of different types of heat processing on chemical changes in tuna. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 174-181, 2010.

STRATTON, J. E.; TAYLOR, S. L. Scombroid poisoning. In: WARD, D., HACKNEY, C. **Microbiology of Marine Food Products**. New York: Spectrum, p. 331-351, Chapter 13, 1991.

SUBBURAJ, M.; KARUNASAGAR, I; KARUNASAGAR, I. Incidence of histidine decarboxylating bacteria in fish and market environs. **Food Microbiology**, v. 1, p. 263-267, 1984.

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

TAO, Z. et al. A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination. **Food Control**, v. 22, p. 1154-1157, 2011a.

TAO, Z. et al. A survey of histamine content in seafood sold in markets of nine countries. **Food Control**, v. 22, p. 430-432, 2011b.

TAYLOR, S. L. et al. Histamine production by food-borne bacterial species. **Journal of Food Safety**, v. 1, p. 173-187, 1978.

TAYLOR, S. L. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. **World Health Organization**, Geneva, 1985.

TAYLOR, S. L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 91-128, 1986.

TREPTOW, H; ASKAR, A. Biogene amine erkennen und in grenzen halten. In: TREVIÑO, E.; BEIL, D.; STEINHART, H. **Food Chemistry**, v. 58, p. 385-390, 1997.

TREVIÑO, E.; BEIL, D.; STEINHART, H. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. **Food Chemistry**, v. 60, p. 521-526, 1997.

TSAI, Y. –H. et al. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. **Food Control**, v. 16, p. 579-585, 2005.

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

VINCI, G.; ANTONELLI, M. L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. **Food Control**, v. 13, p. 519-524, 2002.

WU, M. L. et al. Scombroid fish poisoning: an overlooked marine food poisoning. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 236-241, 1997.

YAMANI, M. I.; UNTERMANN, F. Development of a histidine decarboxylase medium and its application to detect other amino acid decarboxylases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, p. 273-278, 1985.

YOSHINAGA, D. H.; FRANK, H. A. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 447–452, 1982.

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