



Rui Jorge Maciel Mendes

Licenciado em Biologia Celular e Molecular

Implementação e validação do método analítico para determinação de Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientador: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto da Motta,
Técnica de Diagnóstico e Terapêutica de 1ª classe, Instituto
Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, INSA Doutor Ricardo Jorge

Vogais: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, FCT/UNL



Rui Jorge Maciel Mendes

Licenciado em Biologia Celular e Molecular

Implementação e validação do método analítico para determinação de Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientador: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto da Motta,
Técnica de Diagnóstico e Terapêutica de 1ª classe, Instituto
Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, INSA Doutor Ricardo Jorge

Vogais: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2018

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

“Implementação e validação do método analítico para determinação de Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)”
COPYRIGHT© 2018 de Rui Jorge Maciel Mendes, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Agradecimentos

Ao longo da elaboração desta dissertação, muitos foram aqueles que contribuíram para o findar desta etapa, e como tal não posso deixar de lhes agradecer.

Queria agradecer à Doutora Carla Motta, por todo o conhecimento científico transmitido ao longo destes últimos meses, pela sua disponibilidade, pelas horas perdidas comigo, pela sua amizade e acima de tudo por toda a ajuda prestada.

À Professora Ana Lúcia Leitão, por ter me aceitado como orientadora, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu ao longo deste trabalho e do meu percurso académico, pela sua disponibilidade, pelo seu incentivo constante e pela amizade.

À Professora Benilde Mendes agradeço a sua dedicação e constante preocupação pelo interesse dos alunos do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar da FCT-UNL.

À Doutora Maria Antónia Calhau, Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), por ter permitido a realização desta dissertação, pela sua simpatia e principalmente pela forma carinhosa como sempre me tratou.

À Doutora Mariana Santos, por todo o auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

À Eng.^a Cristina Belo Correia e à Doutora Silva Viegas, pela disponibilidade e por terem entrado em contacto comigo numa fase inicial, quando eu procurava tema para a dissertação.

Aos meus colegas do INSA, André, Andreia, Daniela, Fred, Inês, Mafalda, Mariana Andrade, Mariana Ribeiro, Rute, Susana e Tiago, quero agradecer a ajuda prestada, os bons momentos e alegria transmitida ao longo da minha estadia no INSA.

Aos amigos de longa data, Felipe, João, Gonçalo, Sara e Rodolfo, por me aturarem e apoiarem ao longo da realização desta dissertação, a vocês todos, muito obrigado.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à minha Avó, Mãe e Irmã, por todo o amor, força e incentivo transmitidos ao longo de uma vida.

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Resumo

A histamina é uma amina biogénica sintetizada maioritariamente por bactérias, pela via da descarboxilação do aminoácido histidina. Para além da atividade microbiana, a temperatura pode contribuir para o aumento da histamina em alimentos. A histamina pode estar presente em diversos alimentos, mas é no pescado que têm sido documentados vários surtos de intoxicação desta amina ao longo das últimas décadas. De modo a controlar os níveis de histamina em pescado, o presente trabalho teve como objetivo a validação de uma metodologia analítica para a sua quantificação por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), no laboratório de Química do Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge, em Lisboa. A metodologia de extração consistiu em utilizar TCA a 5%, e como derivatizante o reagente 6 aminoquinolil-N-hidroxisucinimidil carbamato (AQC). De modo a garantir a fiabilidade dos resultados obtidos foram validados os seguintes parâmetros: gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de deteção e quantificação, repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e incerteza. Os resultados obtidos verificaram a linearidade do método na gama de concentrações entre 9,09 e 84,1 pmol/ μ L de histamina. O método permite detetar a concentração de histamina a partir de 3,48 pmol/ μ l e a sua quantificação entre 10,6 e 84,1 pmol/ μ L. A precisão foi validada através da repetibilidade e precisão intermédia, em ambos os casos os coeficientes de variação tiveram valores aceitáveis, sendo inferiores a 15%. A exatidão foi validada através de materiais de referência, sendo o valor obtido para o z-score de 1,36. O teor de histamina nas amostras analisadas, variou entre 105 e 1794 mg/kg, pertencente a uma amostra de paté de sardinha e de atum em óleo enlatado, respetivamente, tendo sido ultrapassado em algumas amostras, o valor máximo legislado de 200 mg/kg. O método revelou-se adequado para a análise de histamina em pescado.

Palavras - Chave: Controlo de Qualidade, Histamina, Pescado, Validação, UPLC.

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Abstract

Histamine is a biogenic amine mostly synthesized mostly by bacteria via the decarboxylation pathway of the amino acid histidine. In addition to microbial activity, temperature may contribute to increased histamine in food. Histamine may be present in several foods, but it is in fish that several outbreaks of intoxication of this amine have been documented over the past decades. In order to control the levels of histamine in fish, the present work had the objective of validating an analytical methodology for its quantification by ultra performance liquid chromatography (UPLC), in the Chemistry laboratory of the National Institute Doctor Ricardo Jorge in Lisbon . The extraction methodology consisted of using 5% TCA, and the derivatizing reagent 6 aminoquinolyl-N-hydroxysucinimidyl carbamate (AQC). In order to guarantee the feasibility of the obtained results, the following parameters were validated: work range, linearity, sensitivity, limit of detection and quantification, repeatability, intermediate precision, accuracy and uncertainty. The results showed that the method is linear in the concentration range between 9.09 and 84.1 pmol/ μ L of histamine. The method allows the detection of histamine from 3.48 pmol/ μ L and its quantification between 10.6 and 84.1 pmol/ μ L. The precision was validated through the repeatability and intermediate precision, and in both cases the coefficients of variation had acceptable values, being less than 15%. The accuracy was validated using reference materials, and the value obtained for the z-score was 1.36. The histamine content in the analyzed samples ranged from 105 to 1794 mg/kg, corresponding to a sample of canned sardine and tuna in oil, respectively, in some samples the maximum legislated value of 200 mg/kg was exceeded. The method proved to be suitable for the analysis of histamine in fish.

Key Words: Histamine, Quality Assurance, Fish, Validation, UPLC.

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Índice de Matérias

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de Matérias	XI
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas	XVII
Lista de Abreviaturas e Siglas	XIX
1. Objetivo e organização do trabalho.....	1
1.1. Enquadramento e objetivo do trabalho.....	1
1.2. Estrutura.....	2
2. Caracterização do instituto.....	3
2.1. O Instituto.....	3
2.2. Enquadramento histórico.....	4
2.3. Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN).....	4
3. Aminas biogénicas.....	7
3.1. Definição.....	7
3.2. Formação de aminas biogénicas.....	9
3.3. Funções.....	10
3.4. Toxicidade.....	11
3.5. Níveis máximos legislados.....	14
3.6. Métodos cromatográficos aplicados a análise de aminas biogénicas.....	15
4. Cromatografia líquida de alta e ultra pressão (HPLC e UPLC).....	17
4.1. Fundamentos e princípios.....	17
4.2. Comparação entre HPLC e UPLC.....	18
4.3. Aplicações.....	19
4.4. Constituição de um sistema de HPLC/UPLC.....	19
4.4.1. Bomba.....	19
4.4.2. Injetor.....	20
4.4.3. Coluna.....	20

4.4.4.	Detetores.....	21
4.4.5.	Processador de dados.....	23
5.	Validação de um método analítico de UPLC.....	25
5.1.	Seletividade/especificidade.....	26
5.2.	Gama de aplicação/trabalho.....	26
5.3.	Linearidade.....	27
5.4.	Sensibilidade.....	28
5.5.	Limiares analíticos.....	29
5.5.1.	Limite de deteção.....	29
5.5.2.	Limite de quantificação.....	29
5.6.	Repetibilidade do injetor.....	30
5.7.	Precisão.....	30
5.7.1.	Repetibilidade.....	31
5.7.2.	Precisão intermédia.....	32
5.8.	Exatidão.....	34
5.9.	Recuperação.....	35
5.10.	Incerteza dos resultados.....	36
5.10.1.	Incerteza associada à precisão.....	36
5.10.2.	Incerteza associada à exatidão.....	36
5.10.3.	Incerteza da precisão e exatidão combinadas.....	37
6.	Materiais e métodos.....	39
6.1.	Reagentes e materiais.....	39
6.2.	Equipamento.....	39
6.3.	Estudos preliminares.....	40
6.4.	Soluções usadas.....	40
6.4.1.	Soluções de trabalho.....	40
6.4.2.	Soluções padrão.....	41
6.4.3.	Soluções de padrão interno.....	41
6.5.	Amostras.....	41
6.5.1.	Extração.....	42

6.5.2.	Reconstituição do derivatizante.....	43
6.5.3.	Reação de derivatização.....	43
6.6.	Análise cromatográfica.....	43
6.6.1.	Condições cromatográficas.....	43
6.6.2.	Identificação da histamina.....	45
6.6.3.	Quantificação do teor de histamina.....	45
6.7.	Etapas de validação do método.....	46
7.	Resultados e discussão.....	49
7.1.	Otimização da extração.....	49
7.1.1.	Extração com ácido tricloroacético.....	49
7.1.2.	Extração por meio de ultrassons.....	50
7.2.	Curva de calibração.....	51
7.2.1.	Gama de trabalho.....	51
7.2.2.	Linearidade.....	54
7.2.3.	Sensibilidade.....	55
7.3.	Limites analíticos.....	56
7.4.	Precisão.....	56
7.4.1.	Repetibilidade.....	56
7.4.2.	Precisão intermédia.....	58
7.5.	Exatidão.....	59
7.6.	Incerteza.....	60
7.7.	Análise das amostras.....	61
8.	Conclusão e perspectivas futuras.....	65
	Referências bibliográficas.....	67

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Logótipo do INSA	3
Figura 3.1 - Formação de aminas por descarboxilação, aaminação redutiva de aldeídos	9
Figura 4.1 - Cromatograma ilustrativo do tempo de retenção de um composto	18
Figura 4.2 - Componentes principais de um sistema de UPLC	19
Figura 7.1 - Curva de calibração da histamina na respetiva gama de concentrações de 9,09 a 84,1 pmol/ μ L	52
Figura 7.2 - Cromatograma correspondente ao padrão 9,09 pmol/ μ L	52
Figura 7.3 - Resíduos para os diferentes pontos da reta de calibração da histamina	55
Figura 7.4 - Concentração (mg/kg) de histamina para as diferentes amostras analisadas	63

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Aminoácidos precursores e aminas biogénicas formadas nos alimentos	8
Tabela 3.2 - Surtos de intoxicação histamínica após consumo de pescado	13
Tabela 4.1 - Detetores usados em HPLC e respetiva quantidade mínima detetada	23
Tabela 6.1 - Sigla, amostra e respetivos ingredientes.....	42
Tabela 6.2 - Condições cromatográficas utilizadas	44
Tabela 6.3 - Condições aplicadas na eluição por gradiente	44
Tabela 7.1 - Concentração (em mg/kg) de histamina e respetiva taxa de recuperação de uma análise ao FAPAS, com o uso de TCA	49
Tabela 7.2 - Concentração (em mg/kg) de histamina e respetiva (%) de recuperação de amostras de atum ao natural, por extração com ultrassons	50
Tabela 7.3 - Concentração (em mg/kg) de histamina e respetiva (%) de recuperação de amostras de atum ao natural, extração com recurso a agitador mecânico	51
Tabela 7.4 - Padrões da curva de calibração e respetivos sinais cromatográficos	51
Tabela 7.5 - Rácios das áreas dos picos, valor médio, desvio padrão e variância dos padrões 9,09 pmol/ μ L e 84,1 pmol/ μ L	53
Tabela 7.6 - Sensibilidade do método, desvio padrão e coeficiente de variação (%)	55
Tabela 7.7 - Valor dos limiares analíticos calculados para a determinação de histamina	56
Tabela 7.8 - concentração em (pmol/ μ l) e respetiva concentração em (mg/kg) obtida no atum para o estudo da Repetibilidade em termos de CV (%)	57
Tabela 7.9 - concentração em pmol/ μ l e respetiva concentração em mg/kg obtida no atum para o estudo da precisão intermédia em termos de CV (%)	58
Tabela 7.10 - concentração em mg/kg obtida do FAPAS e seu respetivo z-score	59
Tabela 7.11 - Valores de incerteza associada à precisão, $u'_{precisão}$ (mg/kg), com base nos resultados dos ensaios de Precisão Intermédia	60
Tabela 7.12 - Valores de incerteza padrão $u(\overline{R}_m)$ (em mg/kg) determinados a partir dos resultados do ensaio FAPAS	60
Tabela 7.13 - Incerteza combinada expandida (%) associada à quantificação da histamina ...	61

Tabela 7.14 - Concentração (em pmol/ μ l e mg/kg) de histamina, determinada nas amostras analisadas e respectivas taxas de recuperação 62

Lista de abreviaturas e siglas

ACN – Acetonitrilo

AQC - 6 Aminoquinolil-N-Hidroxisucinimidil Carbamato

CV - Coeficiente de Variação

CV_r - Coeficiente de Variação da Repetibilidade

DAN - Departamento de Segurança Alimentar e Nutrição

DAO - Diamina Oxidase

EC - Eletroforese Capilar

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EI - Ensaio Interlaboratoriais

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EU - União Europeia

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)

FAPAS - Food Analysis Performance Assessment Scheme

FDA - Food and Drug Administration

FLD - Detetor de Fluorescência

GC - Cromatografia Gasosa

HCl - Ácido Clorídico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IRMM - Institute for Reference Materials and Measurement

LC - Cromatografia Líquida

LoD - Limite de Detecção

LoQ - Limite de Quantificação

MAO - Monoamina Oxidase

MRC - Materiais de Referência Certificados

MS - Espectrometria de Massa

NIST - National Institute of Standards and Technology

OPA - o-phthalaldehyde

PDA - Photo Diode Array

PI - Padrão Interno

r – Coeficiente de correlação

r² - Coeficiente de determinação

SPE - Extração de Fase Sólida

TCA - Ácido Tricloroacético

TLC - Cromatografia de Camada Fina

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV/Vis - Ultravioleta/Visível

1. Objetivo e organização do trabalho

1.1. Enquadramento e objetivo do trabalho

Devido ao aumento da procura mundial por alimentos de origem animal, os fornecedores são obrigados a implementar métodos específicos que garantam a qualidade e segurança desses mesmos alimentos. Muitos destes géneros alimentícios de origem animal são suscetíveis à degradação proteica e a determinação destas substâncias que são originadas por este processo podem ser usadas como fator de qualidade (Silva *et al.*, 2013).

No pescado e seus derivados a presença de amins biogénicas é utilizada como índice de atividade microbiana e indicador de boas práticas de fabrico. Uma das amins que mais contribui para a perda de qualidade neste tipo de alimentos e também a principal causadora de toxinfecções alimentares é a histamina. A contaminação do pescado por estes compostos pode ocorrer durante as etapas de transporte e armazenamento de produto, pelo que devem ser tomadas medidas para reduzir o risco de contaminação. O processo térmico é uma das medidas usadas, sendo que a temperaturas inferiores a 5 °C a formação de histamina é nula ou bastante reduzida (Souza *et al.*, 2015). Por outro lado, a histamina é termoestável, pelo que quando presente no alimento, mesmo que este seja processado a elevadas temperaturas, não será eliminada. Por este motivo é imposto pela União Europeia (EU) limites máximos aceitáveis de histamina no pescado e seus derivados para consumo, pelo que existe necessidade de se realizarem análises de rotina para verificar o cumprimento da legislação neste tipo de géneros alimentícios (Regulamento nº 1441, 2007).

Portugal é o terceiro país a nível mundial que mais pescado consome *per capita*, segundo um estudo levado a cabo pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) em 2013, (FAO, 2017). Deste modo, torna-se importante e relevante o tema deste trabalho que têm como objetivo a implementação e validação de um método analítico para a quantificação de histamina, nesses mesmos produtos, no laboratório de química do departamento de alimentação e nutrição (DAN) no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) em Lisboa.

Recorreu-se à cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) como metodologia utilizada para identificar e quantificar a histamina em matrizes de pescado. O método de UPLC deriva da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tendo como principais vantagens face a este último, o tempo necessário para quantificar os diferentes analitos, sendo mais rápido que o HPLC, é capaz de operar a altas pressões, é mais sensível e apresenta um cromatograma com melhor resolução (Porto, 2014).

Respetivamente à validação, os resultados servem para avaliar a fiabilidade, qualidade e precisão dos resultados analíticos obtidos. Para que o método pudesse ser validado, houve a necessidade de satisfazer alguns requisitos de análise quantitativa. Assim, segundo o guia

Relacre nº13 (Relacre, 2000), os requisitos mínimos a serem considerados são a curva de calibração (linearidade e gama de trabalho), os limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), a precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e a exatidão, que pode ser validada através de materiais de referência certificados (MRC) ou através de ensaios de recuperação.

1.2. Estrutura

No **capítulo 1** são descritos os objetivos da dissertação bem como a sua estrutura.

No **capítulo 2** é caracterizada a instituição onde foi desenvolvida a componente prática da dissertação. São apresentadas as diversas áreas onde o instituto atua bem como as diversas áreas de atuação dentro do departamento onde incidiu o desenvolvimento desta dissertação.

No **capítulo 3** é feita uma revisão bibliográfica, que aborda quais as principais aminas biogénicas, o seu processo de formação e quais os microrganismos produtores. Finalmente será dado mais ênfase à amina biogénica histamina, às matrizes onde esta se encontra, com mais ênfase no pescado, ao seu processo de formação, as vantagens e efeitos de toxicidade que esta apresenta no organismo humano.

No **capítulo 4** será abordada a técnica de UPLC e as principais diferenças entre UPLC e HPLC que é a metodologia mais usada para quantificar a Histamina.

No **capítulo 5** vão ser referidos os parâmetros necessários para a validação do método analítico.

No **capítulo 6** serão descritos os reagentes, materiais e equipamentos utilizados bem como todo o procedimento experimental que foi posteriormente validado para amostras de pescado.

No **capítulo 7** estão apresentados os resultados do processo de otimização da extração e os dados analisados para o processo de validação em conjunto com uma breve discussão.

Por último, no **capítulo 8** é apresentada a conclusão de todo o trabalho onde serão abrangidos os aspetos fundamentais desta dissertação, bem como algumas perspetivas futuras.

2. Caracterização do instituto

2.1. O Instituto

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Instituto Ricardo Jorge, ou mais abreviadamente designado de INSA) é um organismo público integrado na administração indireta do Estado, sob a tutela do Ministério da Saúde, dotado de autonomia científica, técnica, administrativa, financeira e património próprio.

Geograficamente, o Instituto Ricardo Jorge dispõe de unidades operativas na sua sede em Lisboa, no Porto (Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira) e em Águas de Moura (Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac).

A organização do INSA, está dividida em seis grandes departamentos:

- Departamento da Alimentação e Nutrição;
- Departamento de Doenças Infeciosas;
- Departamento de Epidemiologia;
- Departamento de Genética Humana;
- Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção das Doenças Não Transmissíveis;
- Departamento de Saúde Ambiental.

Como organismo público e laboratório nacional de referência, o INSA oferece diversos serviços, entre eles, análises laboratoriais, testes genéticos, formação, avaliação externa de qualidade, licenciamento e cedência de espaços (INSA, 2017).

Na figura 2.1 está exibido o logótipo atual do INSA.



Figura 2.1 – Logótipo do INSA.

2.2. Enquadramento histórico

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) foi fundado em 1899, pelo médico e humanista Ricardo Jorge (1858 – 1939), com a designação de Instituto Central de Higiene, com o objetivo de conceder a habilitação técnica e profissional do exercício sanitário, no sentido de estruturar e pôr em funcionamento um mecanismo de defesa da saúde da população.

A decisão de criar o Instituto surge como necessidade de combater um surto de peste bubónica que no ano da sua fundação, atingiu a cidade do Porto.

Em 1929, em homenagem ao seu fundador, o Instituto Ricardo Jorge passou a chamar-se Instituto Central de Higiene Dr. Ricardo Jorge, tendo este nome permanecido até à reorganização dos serviços de assistência social, em 1945, altura em que passou a ser designado por Instituto Superior de Higiene.

Em 1971, após a reforma global dos Serviços de Saúde, o Instituto Ricardo Jorge recebeu a sua designação atual, onde ostenta múltiplas competências e novas atribuições, destacando-se a investigação aplicada, a formação pós-graduada e os serviços à comunidade, como laboratório nacional de referência (INSA, 2017).

2.3. Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN)

O INSA, através do seu Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), desenvolve inúmeras atividades, entre elas a área da segurança alimentar, toxicologia e avaliação do risco, composição de alimentos, alimentação e nutrição, estilos de vida e impacto na saúde, através de investigação e desenvolvimento, vigilância, referência, prestação de serviços diferenciados, formação, informação e consultoria.

Entre as diversas competências geridas pelo DAN estão a promoção, a coordenação e a realização de investigação e desenvolvimento em alimentação e nutrição, identificando as necessidades e estabelecendo as respetivas prioridades de acordo com as estratégias nacionais e internacionais, nomeadamente as fixadas pelo Ministério da Saúde, que reforcem os programas nacionais e a internacionalização.

Para além das competências referidas anteriormente, o DAN também promove, coordena e implementa programas de observação em saúde associados à alimentação e avalia o risco e benefício para fins do desenvolvimento de planos de prevenção e controlo da doença, assim como assegura a recolha, compilação e transmissão à Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, para efeitos de comunicação à Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, dos dados analíticos nacionais relativos à composição, incluindo contaminantes e outras substâncias químicas, dos géneros alimentícios e alimentos para animais.

O Instituto Ricardo Jorge assegura ainda a função de laboratório de referência para a

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

saúde, nos domínios da segurança alimentar e nutrição, através da implementação de novas metodologias, do estudo epidemiológico laboratorial de doenças de origem alimentar, da prestação de serviços diferenciados, incluindo ensaios analíticos, produção de materiais de referência, e da organização de programas de avaliação externa da qualidade laboratorial (INSA, 2017).

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

3. Aminas biogénicas

3.1. Definição

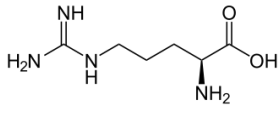
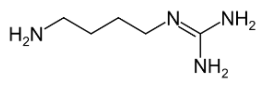
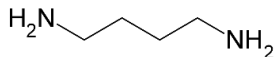
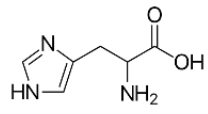
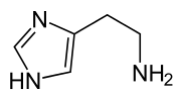
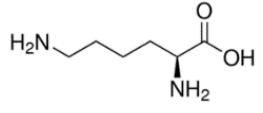
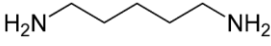
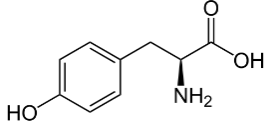
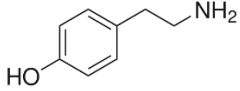
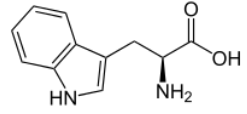
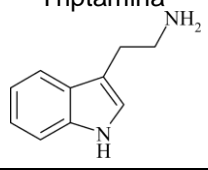
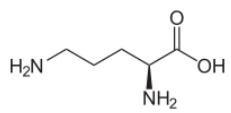
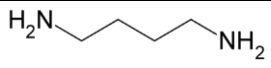
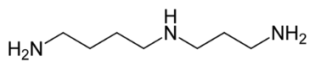
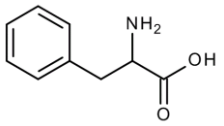
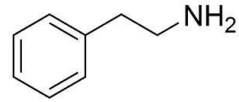
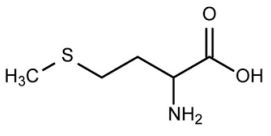
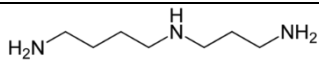
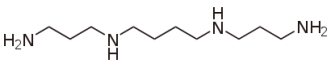
As aminas biogénicas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular. São também definidas como compostos azotados, em que um, dois ou três átomos de hidrogénio de amónia foram substituídos por grupos alquila, como é o caso da histamina, que é uma molécula hidrofílica, que apresenta um anel imidazólico e um grupo amina ligados por dois grupos metilo. As aminas são formadas por processos bioquímicos e participam em funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas, tais como, a proliferação e diferenciação celular, vasoconstrição e vasodilatação. São encontradas em alimentos de origem vegetal e animal e podem ser sintetizadas pelo metabolismo de microrganismos, plantas e animais (Brink *et al.* 1990; Gloria, 2005).

Grande parte das aminas foram designadas através do seu aminoácido precursor, como é o exemplo da histamina que deriva do seu aminoácido precursor histidina, bem como a tiramina deriva da tirosina, entre tantos outros (Stadnik e Dolatowski, 2010). Contudo, existem aminas cujo o nome deriva do local onde foram detetadas pela primeira vez, como é o caso das aminas cadaverina e putrescina que estão associadas à decomposição e putrefação, e da espermina e espermidina, tendo estas sido detetadas no sémen (Gloria, 2005). Alguns dos aminoácidos precursores, que originam a respetiva amina biogénica por descarboxilação estão representados na tabela 3.1.

A formação das aminas biogénicas é desencadeada através da descarboxilação do seu respetivo aminoácido formador e ainda pela aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (Maijala *et al.*, 1993; Santos, 1996). O processo de descarboxilação pode ocorrer por duas vias bioquímicas: pela descarboxilação endógena que ocorre naturalmente por ação de enzimas descarboxilases ou pela decomposição exógena através de enzimas que são libertadas pela flora microbiana. A produção de aminas através da via exógena é mais significativa do que a obtida por via endógena (Sullivan, 2000).

Embora alguns alimentos sejam naturalmente ricos em aminoácidos livres, o seu teor aumenta *post mortem*, devido à elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes no trato intestinal, combinado com o rápido processo autolítico (Flick e Granata, 2005; Saaid *et al.*, 2009). Geralmente, as aminas biogénicas estão ausentes ou encontram-se em concentrações mínimas (< 10 ppm) em alimentos frescos. Contudo em alimentos como peixe, queijos, carnes, ovos e alimentos fermentados (Shalaby, 1996; Flick e Granata, 2005; Brinker *et al.*, 2002), podem estar presentes em concentrações significativas (> 50 ppm), podendo desencadear uma intoxicação alimentar.

Tabela 3.1 – Aminoácidos precursores e aminas biogênicas formadas nos alimentos (adaptado de Glória, 2005).

Aminoácido Precursor	Amina Biogénica
<p>Arginina</p> 	<p>Agmatina </p> <p>Putrescina </p>
<p>Histidina</p> 	<p>Histamina </p>
<p>Lisina</p> 	<p>Cadaverina </p>
<p>Tirosina</p> 	<p>Tiramina </p>
<p>Triptofano</p> 	<p>Triptamina </p>
<p>Ornitina</p> 	<p>Putrescina </p> <p>Espermidina </p>
<p>Fenilalanina</p> 	<p>Feniletilamina </p>
<p>Metionina</p> 	<p>Espermidina </p> <p>Espermina </p>

3.2. Formação de amins biogénicas

Existem diversas vias para a formação de amins biogénicas entre as quais, a hidrólise de compostos azotados, decomposição térmica, aminação redutiva dos aldeídos e a descarboxilação dos aminoácidos (figura 3.1), sendo esta última a principal via de formação de amins biogénicas em géneros alimentícios (Glória, 2005; Silva, 2008).



Figura 3.1 - Formação de amins por descarboxilação (1), aminação redutiva de aldeídos (2) (Glória, 2005).

São necessários diversos pré-requisitos para a formação de amins biogénicas nos alimentos tais como, a disponibilidade de aminoácidos livres, temperaturas altas de processamento, ou a presença de microrganismos (>7 log ufc/g) com enzimas com atividade descarboxilase. A presença de condições favoráveis ao crescimento microbiano e a atividade das enzimas descarboxilantes são outros dois fatores importantes para a formação de amins biogénicas (Glória, 2005; Gardini *et al.*, 2016).

A atividade das descarboxilases está dependente da fase de crescimento dos microrganismos, sendo que quando as bactérias se encontram em fase estacionária verifica-se uma maior actividade destas enzimas. Por outro lado, a temperatura também afeta a atividade das descarboxilases, sendo estas mais ativas a temperaturas inferiores a 30 °C e inativadas a temperaturas acima dos 40 °C (Glória, 2005).

No pescado, existe uma grande diversidade de microrganismos capazes de produzir histamina e outras amins biogénicas, tais como *Enterobacteriaceae* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Morganella* spp., *Proteus morganii* spp., *Pseudomonas* spp., *Hafnia alvei* spp., *Raoultella* spp. e *Klebsiella* spp. (Halász *et al.*, 1994; Shalaby, 1996; Flick e Granata, 2005; Gouveia, 2009; Lin *et al.*, 2016).

As espécies mais proeminentes na produção de histamina são a *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei*, pelo que desempenham um papel no controlo microbiológico e de qualidade nos produtos de pesca e seus derivados (Glória, 2005; Emborg e Paw, 2008). Estas bactérias podem ser encontradas naturalmente em diversas espécies de peixe, inclusive as espécies pertencentes à família Scombridae, de onde faz parte o atum, a cavala e a sarda (Özogul, 2004; Emborg e Paw, 2008). No entanto, estas bactérias também podem surgir em outras espécies de pescado, como resultado de uma contaminação após captura devido ao seu manuseamento inadequado (Jaysekaran *et al.*, 2003; Gouveia, 2009). Em atum fresco não é encontrada histamina, no entanto, se não existir manuseamento adequado

desde o momento de captura no mar, a histamina tenderá a formar-se e a acumular-se (Adams *et al.*, 2018).

No caso da histamina, a sua produção em alimentos é reduzida à temperatura de 10 °C e quase não se verifica produção de histamina a 5 °C devido à inibição das bactérias produtoras de histamina a baixas temperaturas. Segundo Halász e os seus colaboradores (1994), que conduziram um estudo com microrganismos produtores de histamina, concluíram que após 1 mês de incubação a 1 °C, não houve produção de histamina pelas estirpes de *Pseudomonas morganis*, *Pseudomonas vulgaris* e *Hafnia*.

A produção de aminas pelas bactérias pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles, a temperatura e pH do meio, bem como a presença de oxigénio, vitaminas, coenzimas e aminoácidos livres (Glória, 2005). A produção de aminas, através das enzimas descarboxilases, é estimulada como mecanismo de proteção das bactérias em meios ácidos (pH 2,5 a 6,5), devido às elevadas concentrações do ião H_3O^+ serem prejudiciais a estas (Santos, 1996).

Os estudos em carpas realizados por Kordiovská *et al.* (2006), analisaram a variação da concentração de aminas biogénicas, ao longo do tempo e da temperatura de conservação. Os resultados deste estudo mostraram que existe uma relação direta entre a cadaverina e a putrescina com a quantidade de microrganismos presentes, o que tornou estas duas aminas biogénicas indicadores por excelência da qualidade do pescado.

A variação da concentração de aminas biogénicas foi estudada em queijos ao longo do tempo e à temperatura de 21 °C por El-Zahar. Segundo este investigador a principal característica que influencia a formação de aminas biogénicas é o crescimento microbiano, devido à atividade da descarboxilase (El-Zahar, 2014).

Os efeitos da pré-confeção como controlo na formação de histamina a nível industrial foram estudados por Adams e colaboradores no atum. Os resultados obtidos sugerem que a pré-confeção a 60 °C é suficiente para inibir a formação de histamina durante as 12-18 horas seguintes (Adams *et al.*, 2018).

De forma geral, a quantidade de bactérias presente no pescado armazenado depende da contaminação inicial da matéria-prima, assim como da temperatura e período de armazenamento, estando o aumento da carga microbiana relacionado com o aumento da produção das aminas biogénicas (Kordiovská *et al.*, 2006; Gouveia, 2009).

3.3. Funções

As aminas biogénicas são essenciais para a proliferação e diferenciação celular, desde que, estejam presentes em baixas concentrações no organismo (Lopes, 2014).

A histamina é uma das aminas mais abundantes e tem uma poderosa ação vasodilatadora nos processos de resposta imunológica, uma vez que esta amina é responsável pela regulação de vários recetores de membrana em vários tecidos tais como o respiratório, cardiovascular, gastrointestinal e a pele. A histamina pode estimular o coração diretamente

causando a contração e a relaxação do músculo liso, estimular ambos os neurónios sensoriais e motores, bem como controlar a secreção do ácido gástrico (Glória, 2005).

A tiramina, feniletilamina e triptamina têm propriedades vasoconstritoras, podendo provocar o aumento de pressão no sistema vascular e sobrecarregar o músculo cardíaco (Cardozo *et al.*, 2013).

As aminas espermidina e espermina, são interessantes do ponto de vista fisiológico por estarem ligadas à estabilização da membrana celular e proliferação celular, uma vez que estão envolvidas na síntese de ácidos nucleicos, proteínas, hormonas e alcalóides (Önal, 2007; Linares *et al.*, 2011).

3.4. Toxicidade

A determinação das aminas na alimentação é de extrema importância devido a duas razões: a primeira razão é devido ao seu potencial de toxicidade, a segunda razão é a possibilidade de serem usadas como indicadores de qualidade. A toxicidade das aminas depende fortemente da eficiência dos sistemas fisiológicos de desintoxicação, os quais diferem de indivíduo para indivíduo (Shalaby, 1996). Durante o processo digestivo no intestino humano, baixas concentrações de aminas biogénicas são metabolizadas por enzimas em compostos menos ativos fisiologicamente. Este sistema de desintoxicação inclui enzimas específicas como a diamina oxidase (DAO) e a moamina oxidase (MAO), que podem metabolizar a histamina, putrescina e outras aminas. Estas enzimas metabolizam primariamente as aminas biogénicas por desaminação, resultando na produção de NH_3 e H_2O_2 . Alguns microrganismos são capazes de produzir amino oxidases, como é o caso do *Bacillus subtilis*. Contudo, quando grandes concentrações de aminas biogénicas são ingeridas, os sistemas fisiológicos de desintoxicação são incapazes de eliminá-las com eficiência (Dadáková *et al.*, 2009; Gardini *et al.*, 2016).

O consumo de histamina na dieta, têm sido implicada na patogénese da enxaqueca em indivíduos suscetíveis, que sofrem de deficiências na sintetização de DAO. Os alimentos ricos em histamina têm sido reportados, por pacientes que sofrem de enxaquecas, como sendo responsáveis pelo desencadear da enxaqueca (Collins *et al.*, 2011). Além disso, o uso de medicamentos pode ter efeito de inibição das enzimas diamina oxidase e monoamina oxidase (MAO), ajudando a potencializar a ação das aminas (Souza *et al.*, 2015).

A elevada ingestão de aminas biogénicas pode provocar alterações no sistema digestivo, dificuldades respiratórias, dores de cabeça, hipertensão e em casos mais graves a morte (Cardozo *et al.*, 2013). Algumas aminas biogénicas estão implicadas no aparecimento de tumores como é o caso da putrescina e cadaverina, estas podem reagir com o nitrito e formar nitrosaminas que se sabe ter efeito cancerígeno (Guimarães, 2005).

Um problema adicional devido à ingestão de aminas, é o seu efeito de potenciação. A atividade tóxica da histamina é potencializada pela presença de outras aminas biogénicas, tais como a tiramina, a cadaverina e a putrescina (Souza *et al.*, 2015). A putrescina e a cadaverina são capazes de inibir as enzimas (DAO), aumentando o transporte da histamina através da

parede gastrointestinal. O efeito tóxico da histamina também pode ser potenciado pela presença de etanol, que inibe a MAO (Innocente *et al.*, 2007).

Um estudo efetuado por Myslek e Leszczynska detetou a presença de histamina, putrescina, tiramina, cadaverina, espermidina e espermina em refeições para bebês. Neste caso em particular a presença de aminas biogénicas deve-se à atividade endógena das descarboxilases e do aminoácido específico que é usado como substrato para a produção da respetiva amina (como observado na tabela 3.1). Os autores ainda sugerem a remoção de alguns ingredientes presente nas refeições para bebês, tais como, o atum, espinafre, bife, ervilhas e banana, porque estes contêm naturalmente uma elevada concentração de aminas (Myslek e Leszczynska, 2017).

As intoxicações alimentares mais frequentes são provocadas pela ingestão da histamina, também conhecida historicamente por envenenamento scombrídeo, devido à associação da família Scombridae. O envenenamento scombrídeo ou histamínico, é o principal causador de doenças transmitidas através de pescado (Adams *et al.*, 2018). O envenenamento scombrídeo ocorre quando o pescado não é congelado a uma temperatura adequada, o que permite à carga bacteriana presente na carne do peixe prosperar, convertendo a histidina em histamina (Feng *et al.*, 2016). Além disso, a histamina é resistente ao calor pelo que não é eliminada durante a confeção do alimento (Zarei *et al.*, 2014). Os sintomas ocorrem entre alguns minutos a algumas horas após a ingestão desta amina. Geralmente os efeitos tóxicos desencadeados pela histamina são de curta duração, mas pode haver casos com duração de alguns dias. Quando existe excesso de histamina no organismo, vai haver a libertação do líquidos causando edemas, prurido e rubor (Prester, 2011). Outros sintomas típicos da intoxicação por histamina incluem, sensação de calor intenso, desconforto, diarreia, tonturas, desmaios, vômitos, dor de cabeça intensa e pulsátil (Souza *et al.*, 2015). Estes sintomas são muito semelhantes aos sintomas típicos de uma reação alérgica, por esse motivo a intoxicação por histamina é frequentemente confundida por uma alergia, sendo os anti-histaminicos eficazes no tratamento de ambas as doenças. (Feng *et al.*, 2016). No entanto, é possível diferenciar uma intoxicação por histamina de uma alergia, devido à falta de um histórico de reações alérgicas, e porque a intoxicação em geral, ocorre em mais de uma pessoa ao mesmo tempo (Souza *et al.*, 2015).

A ingestão de 5-10 mg de histamina pode ser o suficiente para induzir efeitos tóxicos em pessoas sensíveis, 10 mg é considerado o limite tolerável na população em geral, 100 mg induz uma toxicidade média e 1000 mg é altamente tóxico (Karovičová e Kohajdová, 2005). Relativamente aos níveis totais de aminas biogénicas, quando presentes em concentrações iguais ou superiores a 1000 mg/kg, apresentam um risco para a saúde humana (Kim *et al.*, 2009).

A intoxicação histamínica foi descrita pela primeira vez em 1799 no Reino Unido, mas apenas emergiu na literatura na década de 50 do século XX, quando foram reportados surtos no Japão (Feng *et al.*, 2016). A distribuição geográfica da intoxicação histamínica é de carácter mundial. Ocorre ocasionalmente em forma de surtos, mais frequentemente em países onde é elevado o consumo de espécies de pescado com altos teores de histamina. Desde 1970, os países que registam mais casos são os Estados Unidos, Reino Unido e o Japão (Souza *et al.*,

2015). Nos Estados Unidos entre 1998 e 2008, foram reportados 333 surtos que envolveram 1383 pessoas, resultando em 59 hospitalizações. Alguns casos também foram documentados na África do Sul, Alemanha, Canadá, China, Coreia do Sul, Croácia, Egito, Espanha, França, Indonésia, Itália, Noruega, Nova Guiné, Omã, Polónia, República Checa e Roménia. O maior surto de intoxicação histamínica alguma vez registado, envolveu 2656 pessoas e ocorreu em 1973 no Japão. Apesar dos inúmeros surtos registados a nível mundial, apenas 1 morte foi documentada (Feng *et al.*, 2016). Relativamente à União Europeia em 2011, o peixe e seus derivados foram responsáveis por 71 surtos em vários países: França, Espanha, Suécia, Dinamarca, Alemanha, Reino Unido, Polónia e Bélgica. Dos 71 casos documentados, a intoxicação por histamina foi responsável por 56 casos. Em Portugal os registos disponíveis são escassos, sendo que os que existem encontram-se dispersos entre hospitais, centros de saúde e alguns laboratórios estatais (Maia, 2015). A tabela 3.2 resume alguns surtos de intoxicação histamínica que foram documentados a nível mundial.

Tabela 3.2 – Surtos de intoxicação histamínica após consumo de pescado [adaptado de Maia, 2015; Souza *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016; EFSA, 2017 e Whitworth, 2017].

País	Período	Número de surtos	Número de casos
Estados Unidos	1973 - 1987	202	1216
	1987 - 1998	32	155
	1998 - 2008	333	1383
Japão	1970 - 1980	42	4122
	1998 - 2008	> 1500	-
Reino Unido	1976 - 1982	136	439
	1987 - 1996	105	405
Suíça	1966 - 1991	76	-
França	1980 - 1983	10	> 500
	1993 - 1997	38	-
Suécia	1993 - 1998	4	12
Finlândia	1993 - 1998	9	> 722
Israel	2005 - 2007	21	46
Nova Zelândia	2002 - 2004	12	73
Austrália	1988 - 2010	38	148
União Europeia	2013	42	231
	2014	75	-
	2015	80	437

Dados da EFSA relativamente a 2015, indicam a ocorrência de 80 surtos por intoxicação histamínica em 7 estados membros, envolvendo 437 casos e 43 hospitalizações. Relativamente a 2016, a presença de histamina em peixe ou produtos de pesca, têm sido reportada por diferentes parceiros de retalho em 9 estados membros: Áustria, Bélgica, Bulgária, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Portugal, República Checa e Roménia (EFSA, 2017; EFSA e ECDC, 2017).

A síndrome de Kounis também conhecida como síndrome coronária aguda alérgica é definida como uma reação alérgica ou uma forte reação imunológica a um medicamento ou outra substância. Esta patologia foi inicialmente descrita por Kounis como um espasmo da artéria coronária, induzida pela ação da histamina e definida como angina alérgica. Em 2017 Gennaro e colaboradores, reportaram o primeiro caso de síndrome de *Kounis* relacionado ao consumo de atum enlatado, estando este, associado ao envenenamento scombroides (Gennaro *et al.*, 2017).

3.5. Níveis máximos legislados

Atualmente, na legislação em vigor, a histamina é a única amina biogénica com os limites máximos legais estabelecidos em produtos de peixe e marisco. Em Portugal, os teores de histamina são afixados de acordo com o regulamento (CE) nº 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, que estabelece a recolha de 9 amostras por lote e determina que o teor médio de histamina não deve ultrapassar 100 mg/kg em peixe fresco com elevado teor de histidina. Para que nenhum lote seja rejeitado nenhuma amostra deverá apresentar um teor superior de 200 mg/kg e apenas 2 amostras por lote podem apresentar um teor entre 100 mg/kg e 200 mg/kg. Estes limites aplicam-se às espécies de peixe associadas a um elevado teor de histidina, como é o caso das famílias Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryphaenidae, Pomatomidae e Scombrosidae. O regulamento (CE) nº 1441/2007 também define um limite máximo entre 200 e 400 mg/kg para produtos de pesca provenientes de peixe com elevado teor de histidina, que tenham sido submetidos a um tratamento enzimático em salmoura.

Por sua vez a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) impõe um limite máximo de 200 mg/kg de histidina em produtos de pesca e um limite de 400 mg/kg no caso dos produtos de pesca que tenham sido submetidos a um tratamento enzimático em salmoura (EFSA e ECDC, 2017).

Por outro lado, a *Food and Drug Administration* (FDA, 2011) aponta um limite máximo de histamina de 50 ppm, o que corresponde a 50 mg/kg no peixe fresco.

3.6. Métodos cromatográficos aplicados a análise de aminas biogénicas

Atualmente, na literatura são encontradas várias metodologias para a análise de aminas biogénicas em alimentos. O método varia com a matriz a analisar, mas essencialmente, é empregue a cromatografia de camada fina (TLC), eletroforese capilar (EC), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O HPLC é o método instrumental de eleição para identificar e quantificar aminas biogénicas, sendo este método o mais comumente utilizado por se tratar de uma técnica com elevada sensibilidade e permitir a identificação e quantificação de compostos em concentrações vestigiais (Innocente *et al.*, 2007; Mahmoudi e Mardani, 2015).

No estudo realizado por Zhang *et al.*, (2002) a histamina em amostras de cerveja foi determinada por eletroforese capilar (EC) utilizando deteção amperimétrica com microelétrodos de fibra de carbono, com potencial constante. A metodologia de extração consistiu na remoção do gás, seguida de centrifugação, sendo a amostra injetada eletrocineticamente. As condições de separação e deteção foram de 10 mmol/L de tampão fosfato a pH 5,6 (1:1), 15 kV como separação de voltagem e 1,35 V como potencial de deteção.

A cromatografia gasosa (GC) foi utilizada para análise de putrescina e cadaverina em camarão (Rogers *et al.*, 2003). No método desenvolvido por Rogers e colaboradores foi comparada a extração metanol:água 75:25 com a extração metanol:HCl 75:25. Em seguida as amostras foram centrifugadas e filtradas para posterior derivatização com anidrido pentafluoropropiônico. As amostras derivatizadas foram previamente purificadas em cartuchos de extração de fase sólida (SPE). Segundo os autores a extração com HCl aumentou a percentagem de recuperação.

No estudo efetuado por Xie *et al.*, (2017), a cromatografia de camada fina foi utilizada para analisar a histamina em pescado. O método consistiu no uso de 0,5 MPa de azoto como transportador, 2-4 µL de padrão histamina, tendo sido as amostras de peixe pulverizadas com precisão sobre as placas de TLC. A fase móvel era composta por 10 mL de metanol/acetona/amoníaco (25%) 3/7/0,5 (v/v/v), respetivamente. A deteção foi realizada por fluorescência a 366 nm, após o aquecimento a 80 °C durante 3 minutos.

Um estudo realizado por Moret e Conte (1996), comparou o uso de ácido tricloroacético 5% (TCA) e ácido clorídico (HCl) como reagente de extração de aminas biogénicas em diversas matrizes. Segundo estes investigadores o TCA é mais eficiente na extração de aminas em pescado devido à capacidade de precipitar proteínas.

O investigador Lavizzari e colaboradores em 2006, desenvolveram um método para a determinação de aminas biogénicas em vegetais recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A extração foi realizada com ácido perclórico e como derivatizante utilizou-se *o-phthalaldehyde* (OPA). Segundo os investigadores, o método descrito revelou-se preciso para a determinação de 12 aminas em alimentos de origem vegetal.

Posteriormente, Dadáková e colaboradores desenvolveram um método de cromatografia de ultra eficiência (UPLC) para a determinação de várias amins em diversos alimentos. Na extração foi utilizado 0,6 M de ácido perclórico, seguida de centrifugação e filtração, como derivatizante foi usado cloreto de dansilo. Posteriormente as amins foram detetadas por detetor UV a 225 mn (Dadáková *et al.*, 2009).

Na atualidade, devido ao aumento do número de surtos de intoxicação histmínica conhecidos a nível global, existe a necessidade de implementar e validar métodos para a sua quantificação. Recentemente, Jinadasa e colaboradores validaram um método de HPLC para análise quantitativa de histamina em pescado. Foi utilizado TCA 5% como reagente de extração e *o-phthalaldehyde* (OPA) como derivatizante. As taxas de recuperação oscilaram entre os 78 - 106%. O método mostrou-se válido para os critérios de especificidade, seletividade, precisão, exatidão, linearidade, limite de deteção e limite de quantificação (Jinadasa *et al.*, 2016).

4. Cromatografia líquida de alta e ultra pressão (HPLC e UPLC)

A cromatografia líquida (LC) surgiu no início do século XX, através do trabalho do botânico russo Mikhail Tswett que desenvolveu uma coluna de cromatografia clássica e demonstrou a sua capacidade para separar os pigmentos de diferentes extratos de plantas através do uso de solvente. Tswett observou a separação dos pigmentos através da formação de bandas coloridas na coluna, razão pela qual resolveu denominar esta técnica por cromatografia, junção das palavras gregas *chroma* (cor) e *graphein* (escrita) (Costa, 2015; Waters, 2017).

Foi na década de 60 do século XX, graças aos trabalhos desenvolvidos por dois grupos de estudo, um nos Estados Unidos sob a liderança de Csaba Horváth e outro na Europa pelas mãos de Josef Huber, que surgiram os primeiros equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados imediatos destes dois grupos foram descritos entre 1966 e 1968, o que levou à posterior comercialização dos equipamentos de HPLC (Greibrokk, 2004).

O HPLC representa o culminar da modernização no que se refere à LC, sendo esta, uma das técnicas de separação mais usadas na química analítica, devido à sua sensibilidade, precisão em análises quantitativas e à sua aplicação numa grande variedade de amostras que apresentam matrizes extremamente complexas, sendo o uso do HPLC bastante importante quer para a indústria quer para o desenvolvimento das diversas áreas científicas (Costa, 2015). No entanto em 2004, com os avanços tecnológicos na instrumentação e nas colunas foi possível conceber a cromatografia líquida de ultra eficiência ou UPLC (Waters, 2017).

4.1. Fundamentos e princípios

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), é uma poderosa técnica com capacidade para separar, identificar e quantificar os compostos que estão presentes em matrizes complexas, sendo indispensável em qualquer laboratório analítico (Claessens e Straten, 2004; Waters, 2017).

O tempo necessário que um determinado analito demora desde a injeção na fase móvel a percorrer toda a coluna até atingir o detetor, é designado por tempo de retenção. Assim sendo, o tempo de retenção corresponde à medida em função do tempo, entre o ponto de injeção da amostra e o pico de um componente que emerge da coluna (figura 4.1). Existem alguns fatores que comprometem o tempo de retenção fazendo com que o tempo de retenção seja variável, nomeadamente o fluxo, o comprimento e o diâmetro da coluna (Porto, 2014).

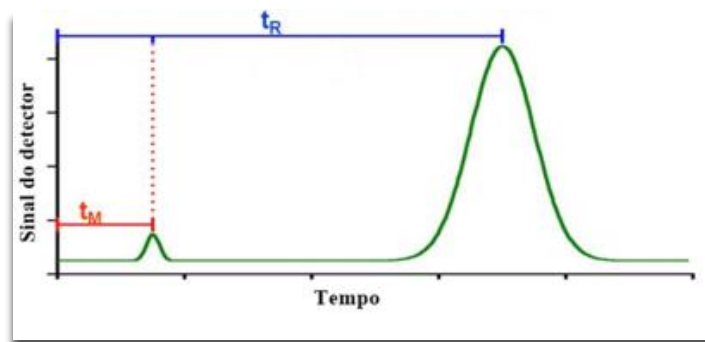


Figura 4.1 - Cromatograma ilustrativo do tempo de retenção de um composto [adaptado de Skoog, 2001].

A técnica envolve uma fase estacionária, que se encontra numa coluna de aço inoxidável, e uma fase móvel líquida (WHO, 2016). O diâmetro interno das colunas é variável (2-5 mm), empacotadas com partículas porosas de formato esférico de tamanho muito reduzido que constituem a fase estacionária. O tamanho das partículas porosas variou entre 10 μm nos primeiros equipamentos de HPLC, até 3 μm nos equipamentos de HPLC atuais. Em relação aos UPLC, o tamanho destas partículas é de 1,7 μm (Lanças, 2011).

A fase móvel passa pela coluna, a uma pressão elevada e com um fluxo controlado. A combinação de pressões elevadas com o uso de micropartículas presentes na fase estacionária permite uma maior eficiência na separação dos compostos. Na grande maioria dos casos, um sistema de HPLC está acoplado a um computador, onde é feita a conversão da leitura dos analitos que foram identificados pelo detetor sob a forma de um cromatograma (Guimarães, 1997).

4.2. Comparação entre HPLC e UPLC

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) surgiu em 2004 de forma a obter uma maior eficiência na separação dos compostos comparativamente ao HPLC convencional. Os princípios de UPLC são idênticos aos do HPLC, a diferença está nas partículas do material que compõem a coluna, que são menores de 2 μm . O desenvolvimento desta técnica veio trazer vantagens à separação cromatográfica de analitos, permitindo o uso de colunas com um comprimento menor, bem como a aplicação de pressões mais elevadas, podendo ser superiores a 14 000 psi. Outras vantagens associadas a esta técnica é o reduzido consumo de solvente e o aumento do fluxo aplicado para a passagem das amostras pela fase estacionária. Para além disso, o cromatograma obtido apresenta uma maior resolução e sensibilidade de deteção dos compostos. Inerente a estas vantagens foi possível reduzir os custos e o tempo de análise, que é uma das principais dificuldades encontradas na cromatografia líquida de alta pressão (Nováková *et al.*, 2006; Porto, 2014; Taleuzzaman *et al.*, 2015)

4.3. Aplicações

Por se tratar de uma técnica com elevada sensibilidade e permitir a identificação e quantificação de compostos numa ampla gama de concentrações, o HPLC/UPLC é indispensável num laboratório de investigação atual. Pode ser aplicado em diversas áreas, tais como, a indústria agroalimentar, farmacêutica, cosmética, indústria química, entre outros, bem como em universidades e centros de investigação (Claessens e Straten, 2004; Fernandes, 2016).

4.4. Constituição de um sistema de HPLC/UPLC

Um sistema de cromatografia líquida de alta ou ultra resolução é caracterizado como o conjunto de componentes que permite a identificação e a quantificação dos compostos que estão presentes numa amostra. Um sistema de HPLC e UPLC é, então, constituído por quatro componentes principais: uma bomba, um sistema de injeção, coluna de separação e detetor. Necessita também de um computador para processamento de dados. A Figura 4.2 exemplifica os componentes essenciais para o funcionamento do UPLC, esta figura pertence ao UPLC usado na parte prática da presente dissertação.

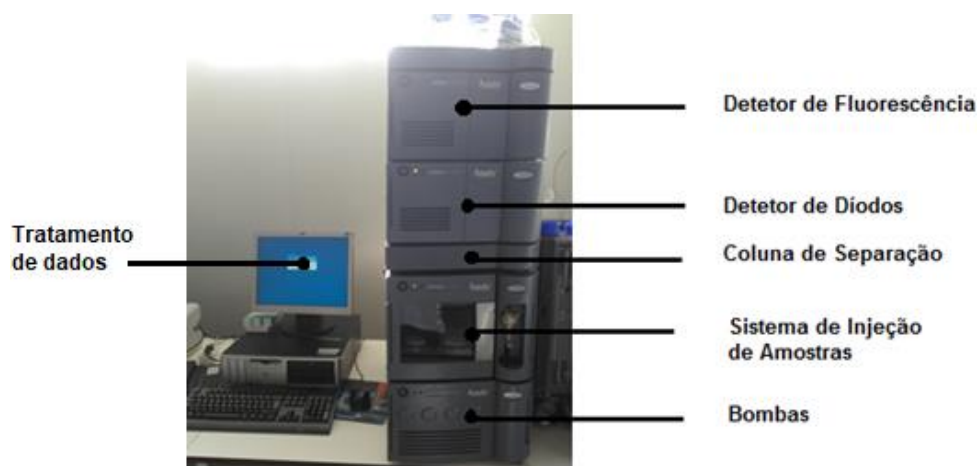


Figura 4.2 – Componentes principais de um sistema de UPLC.

4.4.1. Bomba

A bomba, um dos componentes mais importantes do sistema de HPLC é responsável por fazer passar a fase móvel continuamente pela coluna com fluxo controlado, a uma pressão elevada entre os 5000-6000 psi no caso dos HPLC ou pressões superiores a 14000 psi, no caso dos UPLC (Lembke, 2001). É o uso de pressões elevadas que vai aumentar a eficiência das análises e em conjunto com colunas compostas por micropartículas vai permitir uma elevada

eficiência na separação dos compostos presentes nas amostras (Porto, 2014).

O sistema de bombas é igualmente responsável por permitir fixar ou variar a proporção dos componentes da fase móvel no decorrer do processo cromatográfico (Reuhs e Ann, 2010). Assim, no caso em que a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a análise, ou seja, quando a percentagem de A e de B são exatamente iguais durante toda a separação, diz-se que o sistema está a operar no modo isocrático. Por sua vez, quando existe uma variação gradual da composição da fase móvel ao longo do processo cromatográfico, quer seja por aumento e posterior diminuição de percentagem de solvente orgânico móvel, diz-se que o sistema está a operar no modo de gradiente. Neste caso, a percentagem de fase móvel A e fase móvel B não é a mesma ao longo de todo o processo (Waters, 2017).

4.4.2. Injetor

O processo de separação cromatográfica tem início no momento em que a amostra é injetada na coluna em conjunto com a fase móvel. A amostra é bombeada e percorre a coluna, onde vai ocorrer a separação dos analitos (Waters, 2017).

O injetor é responsável por introduzir uma quantidade exata da amostra na fase móvel, que vai ser introduzida na coluna cromatográfica. Apesar de ainda existir aparelhos de HPLC de injetor manual, os equipamentos mais recentes na sua grande maioria operam com *autosampler*, o que permite a injeção contínua de forma automática das amostras sem necessidade da ação do operador (Waters, 2017). A maioria dos aparelhos de UPLC atuais usam o sistema de injetores por válvulas, que separam a introdução da amostra no sistema eluente de alta pressão (Reuhs e Ann, 2010).

4.4.3. Coluna

Na cromatografia líquida, são utilizadas colunas de separação com comprimento e diâmetro interno variável. A coluna é constituída por um material de empacotamento específico, designado por fase estacionária formado por pequenas partículas porosas esféricas, que aumentam a eficiência e a área superficial, levando a uma maior retenção dos analitos. Este material de empacotamento da fase estacionária pode suportar pressões que podem ser superiores a 14 000 psi e vai contribuir para um comportamento cromatográfico específico (Waters, 2017). O tamanho das partículas nas separações analíticas varia entre os 3-10 μm , podendo ser inferior a 2 μm para o caso de operações em UPLC. Outro fator que afeta a eficiência e o tempo de separação, é a temperatura da coluna. De modo a diminuir o tempo de corrida a temperatura da coluna é aumentada. Os equipamentos de UPLC possuem um forno onde é colocada a coluna, permitindo assim, operar à temperatura desejada. No entanto, as colunas funcionam a temperaturas específicas de trabalho, para que não ocorra degradação da fase

estacionária (Heidorn, 2016).

Relativamente à coluna de separação, esta pode ser caracterizada de acordo com a sua polaridade ou de acordo com a composição das partículas. Quando estamos perante uma fase estacionária mais polar que a fase móvel, dizemos que é de fase normal. Neste caso, numa solução contendo dois compostos, o composto mais polar vai ter uma maior afinidade para a fase estacionária, pelo que vai sair mais tarde da coluna em relação ao composto menos polar. Na fase normal, os adsorventes da fase estacionária mais utilizados são a alumina e a sílica. Por outro lado, quando a fase estacionária é menos polar que a fase móvel dizemos que a cromatografia é de fase reversa. Na cromatografia de fase reversa os compostos apolares são mais fortemente retidos na fase estacionária, enquanto os compostos polares são mais rapidamente eluídos. Na cromatografia de fase reversa os adsorventes empregues na fase estacionária são substâncias quimicamente modificadas com ligações de grupos funcionais (Porto, 2014). O tipo de colunas mais conhecidas pela maioria das separações de fase reversa são a C8 e C18, onde o tempo de retenção aumenta à medida que o número de átomos de carbono aumenta, uma vez que aumenta a área de contato entre a molécula da amostra e a fase estacionária.

Na fase reversa, os eluentes (fase móvel) mais utilizados são a água, o acetonitrilo e o metanol (Meyer, 2004). Estes eluentes devem ter um alto grau de pureza, para que se possa fazer análises de alta sensibilidade, uma vez que as impurezas podem interferir na deteção do analito, pelo que é recomendável o uso de solventes de grau de HPLC (Valat, 2007).

4.4.4. Detetores

Os compostos à medida que são eluídos da coluna passam pelo detetor, que tem a sensibilidade para responder a alterações na concentração de todos os compostos de interesse, sendo possível a sua identificação e quantificação. Existem diversos detetores, mas a escolha do detetor a utilizar, depende das características e concentrações dos analitos que são separados e analisados (Reuhs e Ann, 2010). Para que um detetor seja ideal para a análise que se destina, este deve seguir alguns requisitos, entre os quais se destacam:

- Boa sensibilidade de modo a detetar pequenas quantidades de analito;
- Boa estabilidade e reprodutibilidade do sinal;
- Ser estável e insensível a variações de temperatura e de fluxo, no caso de eluições com gradiente;
- Limite de deteção suficientemente baixo;
- Resposta rápida do sensor;
- Detetor com menor volume possível;
- Resposta com aumento linear face à quantidade de soluto.

Não existe um detetor capaz de exibir todas estas propriedades, a escolha vai depender essencialmente das características estruturais ou químicas dos analitos a detetar (Guimarães, 1997).

De seguida segue-se os detetores mais amplamente utilizados em cromatografia líquida, nomeadamente os detetores de:

- Ultravioleta - Visível (UV-Vis) e de díodos: Também conhecidos como detetores fotométricos, são baseados na absorvância do UV-Vis e representam aproximadamente 75% das análises em HPLC. A resposta deste tipo de detetores é seletiva, uma vez que, apenas os compostos que absorvem no comprimento de onda, onde este detetor opera, são detetados. Em relação aos demais detetores, são económicos e insensíveis a pequenas variações de temperatura e de fluxo. Relativamente ao detetor de díodos, estes têm a vantagem de permitir obter informação a partir de vários espectros de UV (Guimarães, 1997; Skroog *et al.*, 2001; Swartz, 2010).

- Fluorescência: Em alguns casos, quando a luz é absorvida pela molécula, pode levar alguns eletrões ao estado excitado. Quando estes eletrões retornam ao seu estado normal, emitem luz, sendo este processo referido como fluorescência. Os detetores de fluorescência (FLD) dependem desta propriedade molecular para detetar, sendo por isso específicos. Apresentam as mesmas vantagens dos detetores de UV-Vis mas têm uma sensibilidade superior a estes para além de serem capazes de discriminar constituintes de interesse numa matriz complexa de substâncias não fluorescentes. A grande desvantagem deste tipo de detetor é o custo associado. O funcionamento do detetor de fluorescência consiste em uma lâmpada de excitação, seguida por uma rede de difração que incide o feixe luminoso sobre a célula da amostra, causando a sua excitação, o que por sua vez origina a emissão de um feixe de luz ao retornar ao estado fundamental, o qual é em seguida dirigido a um monocromador, que seleciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir no fotodetector (Meyer, 2004; Dolan, 2016).

- Índice de refração: O detetor por índice de refração é o segundo mais utilizado em HPLC, este acompanha continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o eluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. Usualmente são usados quando os solutos não absorvem no UV ou visível. A resposta deste tipo de detetores é universal, sendo capaz de detetar todos os solutos, são fáceis de operar e apresentam uma sensibilidade moderada. São sensíveis à variação de temperatura e fluxo, pelo que qualquer alteração pode levar a uma alteração na resposta do detetor, para além disso não é aconselhado o uso de gradiente neste tipo de detetores (Guimarães, 1997).

- Eletroquímico: A deteção por métodos eletroquímicos é provavelmente a solução mais promissora não baseada na absorvância da luz. É um tipo de detetor em larga expansão devido à sua grande seletividade e sensibilidade. O funcionamento deste detetor consiste na oxidação ou redução da substância a analisar na superfície do eléctrodo. Os detetores eletroquímicos são bons para as modalidades de cromatografia em que são empregues fases móveis aquosas, tais como a cromatografia de troca iónica, por exclusão ou fase reversa (Guimarães, 1997; Waters, 2018).

• Espectrometria de massa (MS): Consiste em formar iões, sendo estes separados com base na diferença entre a relação de massa e carga. Para permitir a deteção o solvente deve ser evaporado e bombardeado com um feixe de eletrões. Como resultado desta interação o composto perde um eletrão e torna-se um catião. Em adição, a quantidade de energia usada é suficiente para quebrar as ligações da molécula, gerando fragmentos ionizados. O resultado é uma “impressão digital” de iões com diferentes valores de massa e carga que são usados para determinar a provável identidade do analito original. Estes detetores são extremamente sensíveis, seletivos e são aplicáveis a diversos analitos (Meyer, 2004; Turnipseed *et al.*, 2006).

A tabela 4.1 “sumariza” os detetores acima mencionados bem como a sua quantidade mínima detetada.

Tabela 4.1 – Detetores usados em HPLC e respetiva quantidade mínima detetada [adaptado de Swartz, 2010].

Detetor	Gama de aplicações	Quantidade mínima detetada
UV/Vis	Específico, compostos com cromóforos UV	Nanogramas
<i>Photo diode array</i> (PDA)	Específico, mesmo que os detetores UV/Vis, também providência espectro UV	Nanogramas
Fluorescência	Muito específico, compostos com fluorescência natural	Picogramas
Espectrometria de Massa (MS)	Universal e específico, identificação estrutural	Picogramas
Eletroquímico	Específico	Nanogramas

4.4.5. Processador de dados

O sinal emitido pelo detetor é enviado para o dispositivo de recolha de dados, normalmente um computador. Este para além de ser responsável pelo controlo dos elementos que compõem o HPLC, converte o sinal emitido pelo detetor num cromatograma. É feita a identificação e quantificação dos analitos através da comparação das áreas dos picos com os respetivos tempos de retenção com soluções padrão cujas concentrações e tempos de retenção são conhecidos (Waters, 2017).

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

5. Validação de um método analítico de UPLC

A necessidade de evidenciar a qualidade das medições químicas obtidas a partir da aplicação de um novo método de ensaio, é cada vez mais exigida e reconhecida. Deste modo, para garantir que um novo método de ensaio forneça informações fiáveis e interpretáveis sobre uma amostra, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e fiabilidade, é necessário efetuar uma avaliação denominada validação (Costa, 2015).

A validação de um método é um processo contínuo, que começa no planeamento de uma estratégia analítica e ao longo de todo o seu desenvolvimento. A validação adequada de um método analítico permite evidenciar que os resultados obtidos são credíveis, podendo este ser submetido a acreditação por entidades competentes (Jorge, 2012).

Os requisitos mínimos para a validação de métodos de ensaio internos, dependem do tipo de método usado e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros:

- Seletividade/Especificidade
- Gama de trabalho/Linearidade
- Limiares analíticos (limites de deteção e de quantificação)
- Sensibilidade
- Precisão
- Exatidão

Isto é, para análises qualitativas, não faz sentido determinar o limite de quantificação, a precisão, a exatidão e a linearidade/gama de trabalho. Nesse tipo de análises, o limite de deteção, e a seletividade/especificidade são os pontos mais importantes na validação. Em análise quantitativa, como é o caso deste projeto, onde o método é aplicado em gamas vestigiárias, já todos os requisitos acima citados são importantes. No caso de métodos inovadores, o estudo da robustez do método poderá ser um fator chave para validar o mesmo (Relacre, 2000).

No entanto, o processo de validação não abrange apenas estes parâmetros, assim como nem sempre estes se aplicam. Como tal, é da responsabilidade do laboratório analisar os parâmetros necessários ao seu plano de validação, consoante a intenção do uso do método (Relacre, 2000; Martins, 2016).

Com o objetivo de validar um método de UPLC para a análise e quantificação de histamina em pescado avaliaram-se os seguintes parâmetros: a especificidade/seletividade, gama de aplicação/trabalho e linearidade da curva de calibração, sensibilidade, os limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), a precisão (repetibilidade e precisão intermédia), exatidão e a incerteza dos resultados.

5.1. Seletividade/especificidade

A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes presentes na matriz. Diz-se que um método é seletivo, quando é possível discriminar o analito relativamente a outras substâncias presentes na amostra a analisar (impurezas, produtos de degradação, ou substâncias com propriedades idênticas às do analito), ou seja, quando existe garantia que a grandeza medida provém apenas do analito. Assim, será necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra, utilizando para o efeito uma amostra complexa (Relacre, 2000).

A seletividade do método analítico pode ser avaliada de várias formas, nomeadamente, pela comparação de uma matriz contendo o analito em questão com uma matriz isenta (Costa, 2015). Também é possível avaliar a seletividade através da realização de um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Um método analítico é considerado aplicável (seletivo e específico) quando na prática se verifica que as taxas de recuperação são próximas de 100% (Relacre, 2000).

5.2. Gama de aplicação/trabalho

Para qualquer método analítico, existe uma gama de concentrações no qual o analito pode ser determinado com precisão, exatidão e linearidade, definida como gama de trabalho ou aplicação, onde o limite inferior corresponde ao limite de quantificação (LoQ) e o limite superior dependerá do sistema de resposta de medição (Tarline, 2008).

Uma vez que o presente método envolve o traçado de curvas de calibração, e de acordo com a norma ISO 8466-1, é recomendado o uso de dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações. O primeiro (S^2_1) e último padrão (S^2_{10}) da curva de calibração são analisados em 10 réplicas independentes, deste modo segundo as seguintes equações é possível observar diferenças significativas determinando-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão (Relacre, 2000).

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

Com,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

Sendo:

i – o número do padrão (neste caso i vai de 1 a 10);

j – o número de repetições efetuadas para cada padrão;

y_i – valor do sinal no padrão i ;

\bar{y}_i - média dos valores de y_i ;

n_i – número de réplicas.

As variâncias são testadas para se averiguar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho, para tal é efetuado o teste do valor PG, através das seguintes equações:

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}, \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2$$

É então realizada a comparação do valor PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher, para $n-1$ graus de liberdade:

Se $PG \leq F$: as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

Se $PG > F$: as diferenças de variância são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter $PG \leq F$ (Relacre, 2000).

5.3. Linearidade

A linearidade num método analítico representa uma medida da proporcionalidade existente entre os resultados obtidos e a concentração do analito. Nos métodos cromatográficos para a sua determinação recorre-se à construção de curvas de calibração com soluções padrão de concentração conhecida, com o respetivo coeficiente de correlação (r) a servir de indicador da linearidade do método, sendo esta tanto maior quanto mais aquele se aproximar da unidade (Fernandes, 2001).

O uso de curvas de calibração possibilita a avaliação da linearidade do método, nomeadamente, através do *Teste de Mandel* onde se calculam as funções linear e polinomial bem como os respetivos desvios-padrão residuais ($S_{y/x}$ e S_{y2}) (Costa, 2015). A diferença de variâncias (DS^2) é então calculada pela equação:

$$DS^2 = (N - 2) * S_{\frac{y}{x}}^2 - (N - 3) * S_{y^2}^2$$

Onde:

N – é o número de padrões de calibração;

$S_{\frac{y}{x}}$ – o desvio padrão residual da função linear;

S_{y^2} – o desvio padrão da função polinomial.

Posteriormente, calcula-se o valor teste, PG , através da seguinte equação:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2}$$

O valor PG é então comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher:

- Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear.
- Se $PG > F$: a função de calibração é não linear.

No caso de $PG > F$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho (Relacre, 2000).

5.4. Sensibilidade

A Sensibilidade de um método analítico é caracterizada pela capacidade do equipamento ou do método dar resposta a pequenas variações da concentração do analito. Para determinar a sensibilidade é feito o quociente entre a variação do sinal medido Δy e a variação da concentração de analito ΔC , como representado pela seguinte equação:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta C}$$

No caso das curvas de calibração que seguem um modelo linear o valor da sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa reta de calibração (a) (Relacre, 2000; Costa, 2015).

A sensibilidade é um parâmetro importante quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo, quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos baseados em modelos lineares e quando se compara a sensibilidade de vários analitos (Relacre, 2000).

5.5. Limiares analíticos

5.5.1 Limite de deteção

Quando estamos perante amostras com níveis baixos de concentração de analito é de extrema importância saber qual o menor valor da concentração do analito ou propriedade que pode ser detetado pelo método (Inmetro, 2011).

O limite de deteção (LoD) é o teor mínimo medido a partir do qual é possível detetar com uma confiança de 95% ou 99%, a presença de analito com uma concentração superior a zero, ou seja, corresponde à mais pequena quantidade de substancia a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas que não é necessariamente quantificada como valor exato (Relacre, 2000; Inmetro, 2011). Não obstante, uma leitura inferior ao limite de deteção, não vai necessariamente significar a ausência de analito na matriz em análise (Relacre, 2000).

Quantitativamente este parâmetro é expresso em unidades de concentração e mediante a utilização da calibração linear pode ser calculado com base na seguinte equação (Relacre, 2000):

$$LoD = \frac{3,3 \times S_{y_x}}{b}$$

Onde:

S_{y_x} – o desvio padrão residual da curva de calibração

b – o declive da curva de calibração

No geral, também se pode determinar o LoD a partir da seguinte equação (Relacre, 2000):

$$LoD = x_0 + 3,3 \times s_0$$

em que:

x_0 - média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho

s_0 - desvio padrão associado a x_0

5.5.2. Limite de quantificação

O Limite de quantificação (LoQ) não é mais do que a menor concentração medida a partir do qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão

aceitáveis (Relacre, 2000). Tal como o LoD, é expresso em unidades de concentração e pode ser calculado em calibrações lineares através da seguinte equação (Relacre, 2000):

$$LoQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

Onde:

$S_{y/x}$ – o desvio padrão residual da curva de calibração

b – o declive da curva de calibração.

No geral, também se pode determinar o LoQ pela seguinte equação (Relacre, 2000):

$$LoQ = x_0 + 10 \times s_0$$

em que:

x_0 - média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho

s_0 - desvio padrão associado a x_0

Na prática o LoQ vai corresponder ao padrão de calibração de menor concentração (de onde se exclui os brancos), e o LoD vai corresponder respetivamente a 1/3 do limite de quantificação (Relacre, 2000).

5.6. Repetibilidade do injetor

Um parâmetro a ter em conta no processo de validação de métodos cromatográficos é a repetibilidade do injetor. Este parâmetro indica o desempenho do sistema de UPLC, ou seja, se o aparelho está a funcionar corretamente no que diz respeito a bombas, colunas e condições de operação. São executadas múltiplas injeções dos pontos extremos da curva de calibração e o resultado é expresso em termos de coeficiente de variação (CDER, 1994; Costa, 2015).

5.7. Precisão

A precisão é o termo usado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em

condições definidas (Relacre, 2000). É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressar a dispersão de resultados são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e o coeficiente de variação (Inmetro, 2011).

O coeficiente de variação (CV, expresso em %) também designado por desvio padrão relativo é calculado através da equação seguinte e não deve ultrapassar os 15% (Inmetro, 2011; Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011):

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

em que:

s – desvio padrão

\bar{x} – concentração média determinada

5.7.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio realizado em condições idênticas, ou seja, diz respeito à concordância dos resultados das várias medições de uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível. Essas condições dizem respeito a (Relacre, 2000; Inmetro, 2011):

- Mesmo procedimento experimental;
- Mesmo analista;
- Mesmo laboratório;
- Mesmo tipo de reagentes;
- Mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições;
- Repetições realizadas num curto espaço de tempo.

Para se determinar a repetibilidade de um método efetuam-se várias medições sobre uma mesma amostra ($n \geq 10$), nas condições de repetibilidade mencionadas anteriormente. A estimativa da variação (S_r^2) de um método de análise é determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises estudadas nas mesmas condições. Uma vez que a repetibilidade pode variar com o teor do analito a analisar, em princípio esta última condição assegura a igualdade estatística das variações de w séries de análises. Portanto, a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível i de concentração é calculada através da seguinte equação (Relacre, 2000):

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)}$$

Onde:

S_{ri}^2 - variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

S_{wi}^2 - variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

$(n_{wi} - 1)$ - graus de liberdade da série de análises;

p - número de laboratórios participantes.

O limite de repetibilidade (r), é definido como o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições acima referidas (Relacre, 2000). O limite de repetibilidade é dado pela equação seguinte:

$$r = 2.8 \times \sqrt{S_{ri}^2}$$

Onde:

r - limite de repetibilidade

S_{ri} - desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados.

O coeficiente de variação da repetibilidade, expresso em percentagem, pode ser calculado através da equação seguinte:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

em que:

S_{ri} - desvio padrão dos valores de concentração das tomas analisadas em condições de repetibilidade;

\bar{x} - média dos valores de concentração obtidos.

5.7.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, com a utilização do mesmo método, mesmo laboratório, mas com condições pré-definidas a variar (uma ou mais), sendo estas:

- Diferentes analistas;

- Diferentes equipamentos;
- Diferentes dias de análise;
- Com/sem verificação da calibração.

Este parâmetro é o mais representativo da variabilidade dos resultados de um laboratório e como tal, o parâmetro mais aconselhável a adotar. O objetivo da sua validação é assegurar que o método dará os mesmos resultados, no mesmo laboratório (Ribani *et al.*, 2004).

A sua determinação e controlo podem ser feitos através de vários métodos, dependendo do ensaio e tipo de aplicação. Um deles passa pela utilização da seguinte expressão (Inmetro, 2011):

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Onde:

$Si_{(j,k)}$ - desvio padrão de precisão intermédia;

t - número total de amostras ensaiadas;

n - número de ensaios efetuados por amostra;

j - número da amostra;

k - número do resultado obtido para a amostra j ;

y_{jk} - resultado individual (k) para a amostra j de 1 a t ;

\bar{y}_j - média aritmética dos resultados da amostra j .

O coeficiente de variação da precisão intermédia, expresso em percentagem, pode ser calculado através da equação seguinte:

$$CV_r = \frac{Si_{(j,k)}}{\bar{x}} \times 100$$

em que:

$Si_{(j,k)}$ - desvio padrão da precisão intermédia;

\bar{x} - média dos valores de concentração obtidos.

5.8. Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico define-se como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro. A avaliação da exatidão pode ser feita através de (Relacre, 2000; Ribani *et al.*, 2004):

- Materiais de referência certificados;
- Ensaio Interlaboratoriais;
- Testes comparativos.

Na validação de um método analítico deve ser feita a análise de Materiais de Referência Certificados (MRC), sempre que possível, fornecidos por organismos reconhecidos e credíveis, como por exemplo o *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) ou o *National Institute of Standards and Technology* (NIST), e que funcionam como um indicador externo de qualidade de uma análise química (Relacre, 2000; Ribani *et al.*, 2004). Em alternativa pode recorrer-se a Ensaio Interlaboratoriais (EI) regulados por Organismos como o *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS) e que estão também associados a MRC. Analisa-se o MRC e compara-se o resultado obtido com o respetivo valor certificado seguindo-se a determinação do erro e a exatidão da análise (Relacre, 2000).

Os resultados obtidos são comparados com os valores certificados e é determinado o fator z-score para avaliar o desempenho do laboratório na análise através da seguinte equação (Relacre, 2000):

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S}$$

Onde:

X_{lab} - valor obtido pelo laboratório;

X_v - valor certificado pelo material de referência;

S – unidade de desvio, que pode ser a incerteza do material de referência ou do desvio padrão do material de referência.

O valor de z é depois avaliado numa escala que permite tirar conclusões acerca da exatidão do valor e, conseqüentemente, do método:

$|Z| \leq 2$ - Resultado satisfatório;

$2 < |Z| \leq 3$ - Resultado questionável;

$|Z| > 3$ - Resultado insatisfatório;

Na ausência de um MRC ou de ensaios interlaboratoriais para estimar a exatidão do método de ensaio, podem ser usados os resultados obtidos nos ensaios de recuperação ou através da comparação dos resultados obtidos pelo método a validar com os resultados conseguidos por um método tomado como referência (Relacre, 2000).

5.9. Recuperação

Os ensaios de recuperação são importantes na análise qualitativa da resposta analítica obtida em inúmeras matrizes, devendo ser efetuados regularmente em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método aplicado (Inmetro, 2011).

O conceito “recuperação” reflete a relação entre a quantidade de analito recuperada no processo face à quantidade real presente na amostra. Este tipo de ensaios pretende viabilizar o método em diferentes matrizes que correspondem a amostras reais, adicionando uma quantidade conhecida de uma solução padrão numa amostra real, que é designada por fortificação da amostra, de modo a verificar a quantidade de analito obtida. Ambas as amostras são analisadas posteriormente, sendo determinada a percentagem de recuperação. O objetivo do cálculo da percentagem de recuperação passa por verificar a existência de efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, também conhecido como efeito de matriz. Este efeito baseia-se na presença de interferentes característicos de determinadas matrizes, que causam um aumento ou diminuição da resposta analítica (Martins, 2016).

Na prática, a percentagem de recuperação indica a eficácia com que o analito introduzido numa amostra é recuperado. A percentagem de recuperação é dada pela seguinte equação (Inmetro, 2011):

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

Onde:

C_1 - concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 - concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 - concentração do analito adicionada.

Em métodos instrumentais, nos quais possam existir eventuais perdas ou contaminações, a realização de ensaios de recuperação na matriz a analisar junto do LoQ deve ser feita mais frequentemente. Em termos de critérios de aceitação, a recuperação apresenta-se geralmente entre os 80-120%, sendo dado ao laboratório liberdade para definir outro critério tendo em conta o desempenho ou complexidade do método de análise (Martins, 2016).

5.10. Incerteza dos resultados

De acordo com o Guia ISO/IEC 99:2008 a incerteza é definida como, “parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensurada a partir das informações usadas” (Guia ISO/IEC 99, 2008).

O “Guia para a Quantificação de Incerteza em ensaios químicos” enumera três possíveis abordagens para o cálculo da incerteza: a abordagem “passo a passo”, abordagem baseada em dados de ensaios interlaboratoriais e a abordagem baseada em dados de validação e do controlo interno da qualidade, sendo que esta última consiste na combinação das incertezas determinadas para a precisão e exatidão do método (IPAC, 2007).

5.10.1. Incerteza associada à precisão

A avaliação da incerteza associada à precisão deve ser feita em condições de precisão intermédia, em vez de condições de repetibilidade, de forma a colmatar eventuais variações do método que, geralmente, seriam constantes quando realizadas num mesmo dia de trabalho. A incerteza associada à precisão ($u'_{Precisão}$) pode ser determinada através da equação seguinte (IPAC, 2007):

$$u'_{Precisão} = \frac{Si_{(j,k)}}{\bar{x}}$$

Onde:

$Si_{(j,k)}$ - obtido através do cálculo da precisão intermédia

\bar{x} – média da concentração determinada

5.10.2. Incerteza associada à exatidão

A quantificação da incerteza associada à exatidão está relacionada com o erro sistemático do ensaio. O erro relativo à exatidão pode ser determinado através de alguns itens de referência, tais como, materiais de referência certificados, amostras fortificadas ou amostras analisadas por um método de referência.

No caso da determinação da exatidão ser feita através de um material de referência, é possível estimar a recuperação média (\bar{R}_m), do método através da equação seguinte (IPAC, 2007):

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{c}_{obs}}{c_{MRC}}$$

em que:

\bar{c}_{obs} - concentração média de uma série de análises do material de referência;

c_{MRC} - valor certificado do material de referência.

A incerteza associada à exatidão, $(u(\bar{R}_m))$, pode ser determinada através da equação seguinte:

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{c}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{MRC})}{c_{MRC}}\right)^2}$$

Onde:

s_{obs} - desvio padrão da série de análises do material de referência;

n - número de análises do material de referência;

$u(c_{MRC})$ - incerteza padrão associada ao teor certificado do material de referência (referenciada no certificado do material de referência).

5.10.3. Incerteza da precisão e exatidão combinadas

Após a obtenção dos valores para as incertezas associadas à precisão e à exatidão, estes podem ser combinados de modo a determinar-se a incerteza combinada expandida, através da seguinte equação (IPAC, 2007):

$$u(y) = y \times \sqrt{(u'_{precisão})^2 + (u(\bar{R}_m))^2}$$

Onde:

$u(y)$ – incerteza combinada expandida relativa;

y – fator de expansão igual a 2, para um intervalo de confiança de 95%. Quando a precisão e a exatidão são estimadas através de um número reduzido de ensaios (inferior a 6), utiliza-se um

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

fator de expansão extraído de uma tabela *t-student* bilateral para um nível de confiança igual a 95% e um número de graus de liberdade igual ao menor número de ensaios menos 1;

$u'_{\text{precisão}}$ - incerteza associada à precisão;

$u(\bar{R}_m)$ - incerteza associada à exatidão.

6. Materiais e métodos

O desenvolvimento da metodologia para a determinação e quantificação de histamina em amostras de pescado e seus derivados por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) decorreu no laboratório química do departamento de alimentação e nutrição (DAN), no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em Lisboa.

Ao longo das últimas décadas têm sido descritos diversos métodos para a extração de histamina em produtos de pescado. Como tal, foram realizadas experiências preliminares, de modo a selecionar o método mais adequado para o desenvolvimento da metodologia “Determinação e quantificação de histamina em amostras de pescado e seus derivados”.

Neste capítulo são descritos os materiais, instrumentos e reagentes necessários para a metodologia selecionada, bem como a sua descrição.

6.1. Reagentes e materiais

Os reagentes ácido clorídico (HCl), concentrado a 37%, acetonitrilo (ACN) de grau HPLC, pureza 99,9%, ácido tricloroacético (TCA), pureza 99,5% e Hidróxido de sódio (NaOH), 6 N da marca Merck.

Foi utilizada histamina, (C₅H₉N₃) pureza (HPLC) ≥ 99,9% e norvalina, (C₅H₁₁NO₂) pureza (HPLC) ≥ 99,9% da Sigma - Aldrich.

Foi utilizado o conjunto de reagentes da Waters®, AccQ Tag Ultra *Chemistry Kit*, que contém como derivatizante o 6 aminoquinolil-N-hidroxisucinimidil carbamato (AccQ-Tag Ultra *Reagent Powder*), o tampão borato (AccQ-Tag Ultra *Borate Buffer*) e o diluente, acetonitrilo (AccQ-Tag Ultra *Reagent Diluent*).

Nas análises, foi utilizada água com uma pureza de, pelo menos, grau II, obtida a partir de um sistema de purificação Mili-Q (Millipore).

Foram também usados filtros de seringa com membrana GHP de 25 mm e poro 0,2 µm da *Gelman Laboratory*.

6.2. Equipamento

O sistema de UPLC utilizado para a deteção e quantificação da histamina é proveniente da *Waters*, modelo ACQUITY, equipado com detetor *photo diode array* (PDA), e *sample manager*, onde foi utilizado o *software Empower*® como sistema de tratamento de dados. A coluna analítica é ACCQ-TAG Ultra C18 de fase reversa contendo sílica poliméricamente modificada, 100 x 2,1 mm.

Outros equipamentos necessários para a realização deste trabalho incluem, agitador vai-vem horizontal, marca Edmund Buhler modelo KS-15; aparelho de ultrassons, marca Elma

modelo S60H com controlo de tempo e de temperatura; balança analítica, marca Mettler Toledo modelo XP 205, com precisão de 0,0001 g; centrífuga, marca Eppendorf modelo 5804R; estufa da marca Memmert modelo Beschickung 100-800 com controlo de temperatura $101,5 \pm 2,0$ °C; moinho de facas (Grindomix), marca Retsch modelo GM 200; placa de agitação eletromagnética com controlo de temperatura, marca Stirrer VWR; Vortex marca Grant-Bio modelo PV-1; micropipetas calibradas; câmara fria à temperatura de 5 °C, ensaiada com registador de temperatura LT172 associado a Pt100's, rastreado à Fluke (EUA), de acordo com ensaio realizado a 5 °C e critério de aceitação ± 3 °C; arca congeladora a -20 °C marca Whirlpool e ultracongelador à temperatura de -70 °C marca Revco, ensaiado com registador de temperatura LT211 associado a termopares, rastreado à Fluke (EUA), de acordo com ensaio realizado a -70 °C e critério de aceitação ≤ -70 °C.

6.3. Estudos preliminares

O método utilizado teve por base o procedimento descrito na norma portuguesa de 2009, "Determinação de Histamina em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)" em produtos de pesca e seus derivados, e na norma ISO 19343, que surgiu durante a realização desta dissertação. Em ambos os procedimentos o método foi adaptado para UPLC.

Numa fase inicial, foram testados diversos reagentes com o intuito de selecionar aquele que mais se adequava ao método empregue, possibilitando assim perceber se este método seria ou não adequado.

Foi utilizada norvalina como padrão interno por ter propriedades físico-químicas compatíveis com o analito em estudo e por não estar presente nas amostras.

6.4. Soluções usadas

6.4.1. Soluções de trabalho

No decorrer do trabalho experimental foram preparadas diversas soluções, entre as quais, uma solução de 0,1 M de HCl, diluindo 8,20 mL de HCl 37% em 1 L de água ultrapura. Devido a problemas de estabilidade optou-se por preparar a solução de TCA no próprio dia consoante o número de amostras a analisar, sendo que na generalidade dos casos eram dissolvidos 10 g de TCA em 200 mL de água ultrapura, originando uma solução de 5% TCA.

6.4.2. Soluções padrão

Foi preparada uma solução padrão de histidina, 2,5 mM e 25 mM, dissolvendo 9,20 mg e 92,0 mg de histidina, respetivamente, em 20 mL de HCl 0,1 M.

6.4.3. Soluções de padrão interno

Na preparação das soluções de padrão interno de norvalina, 2,5 mM e 25 mM, dissolveu-se 5,84 mg e 58,4 mg de norvalina, respetivamente, em 20 mL de HCl 0,1 M.

6.5. Amostras

Visto que os alimentos mais suscetíveis à contaminação de histamina são pertencentes à família Scombridae, da qual o atum faz parte, foi usado atum ao natural para a validação desta amina. Quanto ao parâmetro da exatidão este foi determinado com recurso a um material de referência, FAPAS 27149. Para a determinação e quantificação da histamina foram escolhidas diversas marcas de atum ao natural, atum em óleo, paté de atum, paté de sardinha, paté de camarão e sardinha em molho de tomate, a grande maioria destas amostras foram obtidas em diversos estabelecimentos comerciais na zona da grande Lisboa – Portugal, com exceção das duas amostras de atum em óleo, sendo uma proveniente de Espanha e outra do Equador. A tabela 6.1 descreve a sigla utilizada e a sua respetiva amostra, bem como os ingredientes de cada amostra.

Nos estudos preliminares e durante a etapa de validação foram utilizadas as amostras AN1, AN2, AN3, AN4 e AN5. Após a validação do método foram analisadas e quantificadas as amostras AN1, AN6, AO1, AO2, PA1, PA2, PS1, PC1 e SMT1.

As amostras de atum ao natural, atum em óleo e sardinha em molho de tomate foram trituradas e homogeneizadas, ao passo que as amostras de paté foram apenas homogeneizadas.

A toma de amostra usada no procedimento foi de 2,5 g, se o sinal medido saísse fora da gama de trabalho, procedia-se a um ajuste, diminuindo a toma de amostra.

Tabela 6.1 – Sigla, amostra e respectivos ingredientes.

Sigla	Amostra	Ingredientes
AN1	Atum ao natural	Atum, água e sal
AN2	Atum ao natural	Atum, água e sal
AN3	Atum ao natural	Atum, água e sal
AN4	Atum ao natural	Atum, água e sal
AN5	Atum ao natural	Atum, água e sal
AN6	Atum ao natural	Atum, água e sal
AO1	Atum em óleo	Atum, óleo vegetal e sal.
AO2	Atum em óleo	Atum, óleo vegetal e sal.
PA1	Paté de atum	Atum, óleo vegetal, água, flocos de batata, concentrado de tomate, condimento de mostarda, sal e especiarias
PA2	Paté de atum	Atum, óleo vegetal, água, flocos de batata, concentrado de tomate, condimento de mostarda, sal e especiarias
PS1	Paté de sardinha	Sardinha, cavala, óleo vegetal, água, concentrado de tomate, cebola, margarina, condimento de mostarda, pimento, sal e especiarias
PC1	Paté de camarão	Camarão, peixe, água, soja, condimento de mostarda e sal.
SMT1	Sardinha em molho de tomate	Sardinha, água, tomate, óleo de soja e sal.

6.5.1. Extração

Pesou-se cada amostra em triplicado, num tubo de centrifuga de 50 mL. A massa de amostra variou de 2,20 a 2,70 g.

Adicionou-se 9,3 mL de TCA 5% e 0,2 mL de uma solução 25 mM de norvalina às amostras.

Procedeu-se ao uso do vortex até se obter uma mistura homogênea.

De seguida, colocou-se as amostras em agitador mecânico durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Neutralizou-se as amostras adicionando 0,5 mL de NaOH 6 M.

De seguida, centrifugou-se a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

Filtrou-se com filtros de seringa GHP de 0,20 µm.

Por fim, as amostras foram guardadas no congelador a -70 °C até ao momento de derivatização.

6.5.2. Reconstituição do derivatizante

Retirou-se 1 mL do *vial AccQ•Tag Ultra Reagent Diluent* e transferiu-se para o *vial* contendo o *AccQ•Tag Ultra Reagent Powder*. Agitou-se no vortex por 1 minuto. Colocou-se em estufa a 55 °C durante 10 minutos, conforme descrito no manual *AccQ•Tag Ultra Derivatization Kit* da Waters.

6.5.3. Reação de derivatização

Em *vials* adequados para análise no UPLC adicionou-se 10 µL do extrato filtrado por seringa, 80 µL de *AccQTag Ultra Borate Buffer* e 20 µL do derivatizante que foi reconstituído.

Colocou-se os *vials* em estufa durante 10 minutos a 55 °C para se dar a reação de derivatização.

6.6. Análise cromatográfica

6.6.1. Condições cromatográficas

A tabela 6.1 apresenta as condições utilizadas na análise cromatográfica da histamina por UPLC:

Tabela 6.1 – Condições cromatográficas utilizadas.

Caudal	0,7 mL/min
Fase móvel (gradiente de acordo com a Tabela 6.2)	Eluente A – 95% água e 5% ACN; Eluente B – 5% água e 95% ACN
Fase estacionária	Coluna analítica AccQ-Tag Ultra da marca <i>Waters</i> , de fase invertida contendo sílica polimericamente modificada com C18, 100 x 2,1 mm
Volume de injeção	1 µL
Tempo de corrida	10 minutos
Temperatura da Coluna	55 °C
Deteção de fluorescência	260 nm

Na tabela 6.2 está expressa a eluição por gradiente ao longo do tempo que foi utilizada neste método.

Tabela 6.2 – Condições aplicadas na eluição por gradiente.

Tempo (Minutos)	% Eluente A	% Eluente B
0,00	99,9	0,1
0,54	99,9	0,1
5,74	90,9	9,1
7,74	78,8	21,2
8,04	40,4	59,6
8,64	40,4	59,6
8,73	99,9	0,1
9,50	99,9	0,1

Na análise dos cromatogramas com vista à identificação e quantificação dos analitos recorreu-se ao *software* “Empower” integrado no sistema de UPLC “Waters”.

6.6.2. Identificação da histamina

A histamina foi identificada pela comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção obtido nos padrões. A identidade da histamina foi também confirmada por comparação do seu espectro na amostra e no padrão.

6.6.3. Quantificação do teor de histamina

A quantificação do teor de histamina em mg/kg nas amostras foi realizada com base no uso do padrão interno (PI). Foi adicionada a mesma concentração de padrão interno em todas as amostras, e foi usado o rácio da área do analito e do padrão interno. O mesmo processo foi usado para preparar os diferentes pontos da curva de calibração, onde os diferentes pontos da curva de calibração vão ter diferentes concentrações de analito, mas a mesma concentração de padrão interno. Quando o cromatograma é integrado, vão ser medidas as áreas de pico do analito e o padrão interno. A relação destas áreas é então utilizada no processo de calibração, onde no eixo *x* do cromatograma temos o rácio das concentrações (valores teóricos) e no eixo dos *y* vamos ter o rácio da área. Quando uma amostra desconhecida foi quantificada, a área do analito e do padrão interno foram medidas e a relação entre elas determinada, o que permitiu determinar a relação da concentração (valor teórico) que este representa.

O *software* “Empower” integrado no sistema de UPLC “Waters” permitiu o cálculo dos teores de histamina na amostra, sendo que estes já vêm com os valores extrapolados pelo valor do padrão interno.

Para que seja possível considerar os resultados obtidos como válidos, deve verificar-se o valor de r^2 (coeficiente de determinação), da reta de calibração. Este valor deverá estar o mais próximo de 1, de modo a minimizar o valor do desvio padrão residual e, conseqüentemente, menor será a incerteza associada ao resultado final do ensaio. O valor mínimo aceite para o coeficiente de correlação (*r*) é 0,995, abaixo deste valor é recomendável que a análise seja realizada novamente de modo a obter um valor igual ao superior a 0,995 (Relacre, 2000).

Uma vez que o valor obtido pelo *software* do aparelho de UPLC indica o teor de histamina em picomoles por microlitro de amostra e o resultado final pretendido consiste em saber a quantidade de histamina em miligramas (mg) por kilograma (kg) de amostra, foi necessário recorrer às seguintes expressões matemáticas:

$$Amostra \left(\frac{mg}{\mu L} \right) = \left(\frac{m * V1}{\frac{V2}{f d}} \right) * \left(\frac{V3}{V4} \right)$$

Onde, **m** representa a massa da toma de amostra em miligramas; **V1** o volume do extrato da amostra adicionado ao *vial* de UPLC em microlitro; **V2** o volume da retoma de hidrólise em microlitro; **fd** corresponde ao fator de diluição; **V3** a fração de volume da solução de amostras injetada na coluna de UPLC em microlitro; **V4** o volume total da solução de amostra presente no *vial* em microlitro.

$$Amostra \left(\frac{pmol}{100g} \right) = \frac{a * 100000}{Amostra \frac{mg}{\mu L}}$$

Onde, **a** corresponde à média das injeções da uma amostra em picomol por microlitro (pmol/μL).

$$Amostra \left(\frac{mg}{kg} \right) = \left(Amostra \frac{pmol}{100g} * (10^{-12}) * P_{an} \right) * 10000$$

Onde, **P_{an}** corresponde ao peso molecular do analito (histamina) em gramas por mol.

De modo a garantir que possíveis interferências de matriz não influenciam a detecção do analito, neste caso a histamina, foi necessário realizar a fortificação de uma amostra.

O procedimento para a amostra fortificada foi realizado do mesmo modo das restantes amostras, tendo o cuidado de ter sempre o mesmo volume na retoma de hidrólise, sendo que neste caso está sujeita à adição de uma quantidade de padrão de concentração conhecida. A porção de padrão a ser adicionada foi determinada de forma a garantir que a amostra fortificada se encontre sempre dentro da curva de calibração de modo a assegurar a exatidão de resultados. Posto isto, foram adicionados 0,2 mL da solução padrão (25 mM) às amostras de pescado, no início do procedimento, de modo a que no *vial* final a ser injetado no UPLC apresentasse uma fortificação de 45,46 pmol/μL de histamina.

6.7. Etapas de validação do método

O processo de validação do método para a histamina envolveu a avaliação de parâmetros como a gama de trabalho, a linearidade do método na gama de trabalho validada, a sensibilidade, os limites analíticos (LoD e LoQ), e a repetibilidade do injetor. Foram realizados estudos de precisão em condições de repetibilidade e precisão intermédia e foi também realizado o estudo da exatidão do método. Através dos resultados obtidos nos vários ensaios foi possível determinar a incerteza do método. O procedimento utilizado para avaliar cada um destes parâmetros está descrito em vários guias de validação de entidades de referência como o guia Relacre, o Inmetro e o Guia de Validação de Métodos Cromatográficos do INSA.

Linearidade - A linearidade do método foi avaliada através da análise de dez curvas de calibração. Após efetuada a regressão linear, foi realizado o teste de Mandel e analisado o coeficiente de determinação e os resíduos obtidos.

Gama de Trabalho - A partir da solução 2,5 mM de histamina, foram preparadas dez réplicas das soluções padrão de calibração equivalentes ao primeiro e último ponto da curva de calibração (40,00 e 370,0 µg/mL) e uma réplica para cada um dos pontos intermédios (110,0; 170,0; 230,0 e 300,0 µg/mL). No fim, calculou-se a variância (S_i^2) das dez réplicas do primeiro e último ponto da curva de calibração e averiguou-se a homogeneidade das variâncias por comparação do valor PG com o valor da Distribuição F de Snedecor/Fisher.

Limites analíticos da curva de calibração (LoQ e LoD) - Os limites analíticos de quantificação (LoQ) e de deteção (LoD) foram determinados através do desvio padrão das concentrações do primeiro padrão referente a dez curvas de calibração.

Sensibilidade - Para a avaliação da sensibilidade foi determinado o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) dos valores de declive de dez equações de calibração obtidas.

Repetibilidade - Para a determinação do CV da repetibilidade para a análise da histamina foi realizado um ensaio em uma amostra (atum) sob condições de repetibilidade.

Precisão intermédia - Para a determinação do CV da precisão intermédia foram realizados, em dias diferentes, um ensaio sobre a mesma amostra (atum) para a histamina.

Exatidão - A exatidão do método foi avaliada através da análise de um material de referência, FAPAS 27149, contendo o analito em questão (histamina).

Incerteza - Foi determinada a partir dos resultados de precisão intermédia e de exatidão.

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

7. Resultados e discussão

Como já foi referido no capítulo anterior, neste trabalho, foi utilizado o procedimento adaptado para UPLC descrito na norma portuguesa de 2009 e na norma ISO 19343, para a validação de um método analítico de UPLC-PDA na determinação quantitativa de histamina em diversas matrizes alimentares. Visto o método a validar se tratar de uma análise quantitativa sendo a determinação de concentrações residuais de histamina, foram considerados os seguintes requisitos analíticos para o processo de validação, mencionados no Guia Relacre nº13: gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de deteção (LoD), limite de quantificação (LoQ), repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e incerteza do método.

7.1. Otimização da extração

Antes da validação, foi efetuada a otimização do processo de extração.

7.1.1. Extração com ácido tricloroacético

Com base na bibliografia publicada relativamente à análise de histamina em pescado e seus derivados, optou-se por utilizar o ácido tricloroacético (TCA) como reagente de extração, por ser o mais frequentemente descrito. Na tabela 7.1 estão representados os valores obtidos em mg/kg de uma análise ao material de referência (FAPAS) com o uso de TCA, bem como a sua respetiva taxa de recuperação.

Tabela 7.1 - Concentração (em mg/kg) de histamina e respetiva taxa de recuperação de uma análise ao FAPAS, com o uso de TCA.

	Ácido Tricloroacético (5%)	
Descrição	Concentração Histamina (mg/kg)	Recuperação (%)
FAPAS 27149	144 ± 3	103 ± 12

Face aos resultados obtidos, optou-se pelo uso de ácido tricloroacético como reagente de extração devido a duas razões. A primeira razão, foi que o TCA mostrou melhores resultados, tendo uma taxa de recuperação aceitável, a segunda razão foi o valor quantificado de histamina próximo do valor certificado (137 mg/kg). Estes resultados vão ao encontro do que é descrito na bibliografia, onde o uso de TCA como reagente de extração de amins biogénicas em pescado

é mais eficiente, uma vez que este ácido têm a capacidade de precipitar proteínas, através da agregação hidrofóbica (Rajalingam *et al.*, 2009). Por outro lado, as taxas de recuperação para a histamina usando este reagente, encontram-se entre os 80-110% (Moret e Conte, 1996; Saaid *et al.*, 2009).

7.1.2. Extração por meio de ultrassons

Outro método de extração observado na revisão bibliográfica é o uso de ultrassons. Para avaliar a viabilização deste método, foram analisadas algumas amostras de atum. As amostras de atum ao natural pertencem a seis marcas nacionais, sendo que cada amostra continha três subamostras de modo a garantir a representatividade do lote. O procedimento seguido foi semelhante ao descrito no subcapítulo 6.5.1, tendo sido apenas alterado o uso de agitador mecânico por 10 minutos de banho ultrassons. A análise das várias amostras consistiu num ensaio em triplicado, em que na terceira toma foi adicionado um volume de solução padrão 25 mM. Na tabela 7.2 estão representados os valores obtidos em mg/kg das amostras de atum analisadas, bem como a sua respetiva taxa de recuperação usando o método de extração por ultrassons.

Tabela 7.2 - Concentração (em mg/kg) de histamina e respetiva (%) de recuperação de amostras de atum ao natural, por extração com ultrassons.

Sigla	Amostra	Concentração (mg/kg)	Recuperação (%)
AN1	atum ao natural	401 ± 10	96,6 ± 4,5
AN2	atum ao natural	197 ± 18	34,7 ± 5,6
AN3	atum ao natural	91,4 ± 4,1	28,5 ± 2,1
AN4	atum ao natural	172 ± 38	57,2 ± 17,7
AN5	atum ao natural	93,4 ± 9,8	36,0 ± 3,9

Posteriormente efetuou-se a quantificação da histamina em duas amostras de atum ao natural, tendo sido utilizado o agitador mecânico. Na tabela 7.3 estão representados os valores obtidos em mg/kg das amostras de atum analisadas, bem como a sua respetiva taxa de recuperação, usando o método de extração com recurso a agitador mecânico.

Tabela 7.3 - Concentração (em mg/kg) de histamina e respetiva (%) de recuperação de amostras de atum ao natural, extração com recurso a agitador mecânico.

Sigla	Amostra	Concentração (mg/kg)	Recuperação (%)
AN1	atum ao natural	432 ± 2	75,5 ± 8,7
AN6	atum ao natural	43,5 ± 0,1	80,5 ± 0,7

O fator de decisão entre usar o método de ultrassons ou o agitador mecânico foi a (%) de recuperação. Com exceção da amostra AN1, os resultados da recuperação ficavam abaixo dos 60% quando era usado o método por ultrassons. Deste modo, optou-se por usar o agitador mecânico, que para além de ser um método menos agressivo em relação aos ultrassons (Torres *et al.*, 2017), proporcionou resultados mais exatos.

7.2. Curva de calibração

7.2.1. Gama de trabalho

Após algumas tentativas para encontrar a gama de trabalho mais adequada para o método analítico de quantificação de histamina no pescado e seus derivados, chegou-se às seguintes concentrações de padrão: 9,09 pmol/μL, 25,0 pmol/μL, 38,6 pmol/μL, 52,3 pmol/μL, 68,2 pmol/μL e 84,1 pmol/μL. Na tabela 7.4 estão representados os valores das concentrações dos padrões teóricos e os seus sinais analíticos, que correspondem aos rácios da área dos picos, originando a reta de calibração ilustrada na figura 7.1.

Tabela 7.4 – Padrões da curva de calibração e respetivos sinais cromatográficos.

Concentração (pmol/μL)	Rácio da área dos picos
9,09	8,63
25,0	23,8
38,6	37,1
52,3	52,5
68,2	70,4
84,1	83,9

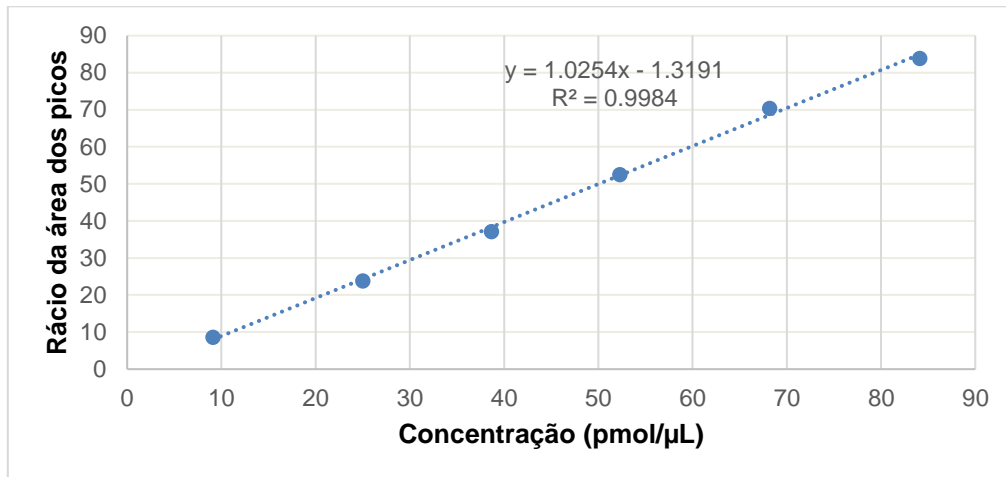


Figura 7.1 – Curva de calibração da histamina na respetiva gama de concentrações de 9,09 a 84,1 pmol/μL.

A gama de trabalho foi avaliada com recurso ao teste de homogeneidade das variâncias, que consistiu em analisar 10 vezes o padrão de menor concentração (9,09 pmol/μL) e 10 vezes o padrão de maior concentração 84,1 (pmol/μL). A figura 7.2 representa o cromatograma referente ao padrão 9,09 pmol/μL, onde é possível observar o valor do tempo de retenção relativo à histamina, sendo este de 3,73 minutos.

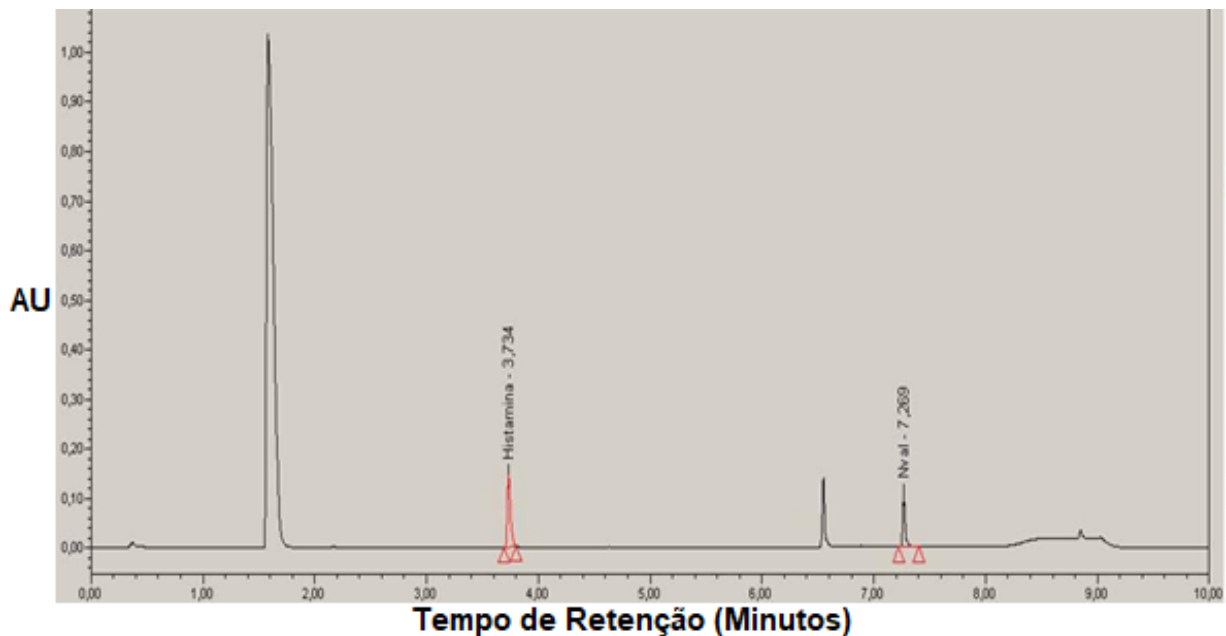


Figura 7.2 – Cromatograma correspondente ao padrão 9,09 pmol/μL.

Através dos resultados observados na tabela 7.5 e das equações mencionadas no capítulo 5.2 foi possível calcular as variâncias associadas ao primeiro e último padrão.

Tabela 7.5 – Rácios das áreas dos picos, valor médio, desvio padrão e variância dos padrões 9,09 pmol/μL e 84,1 pmol/μL

Rácios das áreas dos picos cromatográficos		
Padrão 9,09 pmol/μL	Padrão 84,1 pmol/μL	
8,63	83,9	
8,75	83,1	
8,99	83,9	
10,2	83,6	
9,93	85,1	
9,65	85,0	
9,08	85,4	
9,14	83,8	
9,51	83,6	
9,96	83,6	
9,38	84,1	Média
0,54	0,8	Desvio - Padrão
0,29	0,62	Variância

Para avaliar o valor das variâncias de modo a averiguar se existe diferenças significativas entre elas, foi calculado o valor PG e comparado com o valor tabelado da distribuição f de Snedecor / Fisher, para um intervalo de confiança de 99% e para (n - 1) graus de liberdade. Sendo neste caso, S_i^2 o valor da variância do padrão 84,1 pmol/μL e S_j^2 do padrão 9,09 pmol/μL, obtendo-se um PG igual a 2,14. O valor tabelado da distribuição de f de Snedecor / Fisher para

(10 – 1) com intervalo de confiança de 99% é de 10,56. Deste modo é possível concluir que o ajuste linear é adequado aos pontos experimentais, uma vez que o valor de PG obtido é inferior a F.

7.2.2. Linearidade

A partir dos resultados obtidos da curva de calibração foi realizada uma comparação entre o modelo linear e o modelo polinomial para verificar qual o ajuste mais adequado. Aplicou-se o teste de Mandel que, e através das equações estabelecidas no capítulo 5.3, foi possível calcular o valor de PG para a curva de calibração da histamina. O valor de PG para a histamina foi de 8,66.

Por comparação do valor de PG calculado com o valor tabelado de F. de *Snedecor/Fisher* para n-3 graus de liberdade, 34,12, é possível concluir que o ajuste linear é adequado aos pontos experimentais, uma vez que o valor de PG obtido foi inferior a F.

A linearidade das curvas de calibração também foi confirmada através da análise do coeficiente de determinação (r^2), 0,9984 para a histamina, e dos resíduos gerados para cada padrão da curva de calibração. Uma vez que o valor do coeficiente de correlação é superior a 0,995 e que visualizando os gráficos não se observam desvios em relação à reta traçada, pode-se afirmar que a resposta do equipamento ao teor de histamina na solução é linear.

Por outro lado, na Figura 7.3 está representado o gráfico dos resíduos percentuais gerados para cada padrão da curva de calibração da histamina. Os resíduos representam o desvio percentual entre o valor da área do pico, para os diferentes pontos da curva e o valor resultante do ajuste linear. Como se pode constatar, todos os resíduos encontram-se abaixo dos 10%, estando, portanto, de acordo com o critério de aceitação definido pelo controle de qualidade interno do INSA (DAN, 2012).

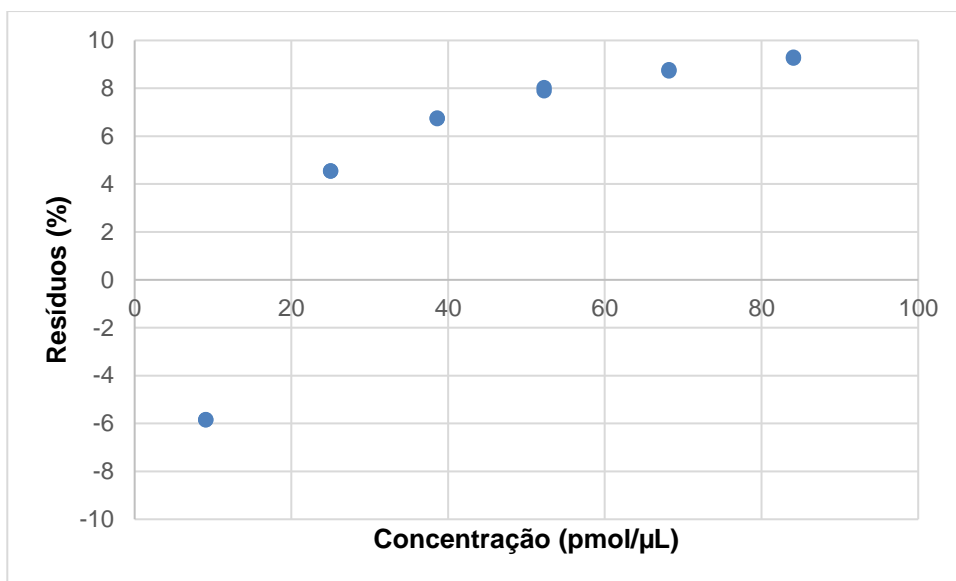


Figura 7.3 – Resíduos para os diferentes pontos da reta de calibração da histamina.

7.2.3. Sensibilidade

A sensibilidade, a resposta do método face à variação do analito em estudo, foi avaliada com base nos declives das curvas de calibração obtidos sempre que se fazia um novo ensaio. Para tal, foi calculada a média dos declives da curva e o seu desvio padrão de modo a detetar a existência de desvios ao longo do processo de análise. Na tabela 7.6 encontram-se apresentados os resultados do parâmetro da sensibilidade.

Tabela 7.6 - Sensibilidade do método, desvio padrão e coeficiente de variação (%).

	Histamina
Sensibilidade	1,00
Desvio padrão	0,02
CV (%)	1,7

Através dos valores obtidos verifica-se que para o analito em estudo, a sensibilidade do método manteve-se aproximadamente constante durante a realização de todos os ensaios realizados, uma vez que o valor do coeficiente de variação foi relativamente baixo.

7.3. Limiares analíticos

O limite de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) são parâmetros que indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar, respetivamente, a substância em análise.

Os limites de detecção e quantificação para a histamina, foram calculados com base no desvio padrão das concentrações do primeiro padrão de dez curvas de calibração.

Na Tabela 7.7 encontram-se os limites de detecção e de quantificação teóricos obtidos para o método, calculados através de parâmetros da reta de regressão linear

Tabela 7.7 Valor dos limiares analíticos calculados para a determinação de histamina.

Declive da reta B	Desvio padrão residual $S_{y/x}$	LoD (pmol/ μ L)	LoQ (pmol/ μ L)
1,03	1,07	3,48	10,6

Os valores dos limiares analíticos podem variar ligeiramente, uma vez que são preparadas novas curvas de calibração a cada ensaio para a mesma gama de trabalho, havendo possivelmente oscilações na estabilidade dos padrões até ao momento da sua injeção no UPLC, assim como nos volumes pipetados na preparação dos padrões devido à incerteza associada ao material.

7.4. Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermédia. De acordo com o guia Relacre, para validar o parâmetro da repetibilidade é necessário efetuar pelo menos 10 medições sobre a mesma amostra, e no mínimo 6 medições para validar a precisão intermédia.

7.4.1 Repetibilidade

O ensaio de repetibilidade consiste em repetir o mesmo ensaio, sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo equipamento e reagentes, efetuado pelo mesmo analista, em curtos intervalos de tempo. Para se determinar a repetibilidade do método efetuaram-se 10 repetições do ensaio para uma amostra de atum ao natural nas condições anteriormente descritas. O método considera-se preciso em termos de repetibilidade se o coeficiente de variação for inferior a 15% (Inmetro, 2011). Na tabela 7.8 encontram-se os resultados obtidos para a repetibilidade, bem como o cálculo das respetivas variâncias.

Tabela 7.8 - Concentração em (pmol/μL) e respetiva concentração em (mg/kg) obtida no atum para o estudo da Repetibilidade em termos de CV (%)

Amostra	Concentração (pmol/μL)	Concentração (mg/kg)
Atum	18,2	86,7
	16,1	77,6
	15,4	75,2
	17,5	88,2
	18,1	85,2
	15,6	75,5
	18,0	88,3
	17,4	82,5
	17,3	82,1
	17,3	83,2
Desvio Padrão	1,0	4,7
Média	17,1	82,4
N	10	
S_{ri}^2	0,94	21,8
S_{ri}	0,97	4,67
Limite de repetibilidade	2,72	13,1
CVr (%)	5,8	5,7

Analisando os dados da tabela 7.8 pode-se constatar que se obteve um limite de repetibilidade de 2,72 pmol/μL e 13,1 mg/kg para a histamina, a um nível de confiança de 95%. Isto significa que, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de

repetibilidade, não deverá exceder estes valores. A diferença máxima apurada para a amostra de atum ao natural foi de 2,70 pmol/ μ L e 13,1 mg/kg. Assim, como os resultados respeitam o limite de repetibilidade, os resultados foram aceites por não existir diferenças significativas.

Pela análise dos coeficientes de variação da repetibilidade (CV_r) pode-se considerar o método validado em termos de repetibilidade uma vez que os valores obtidos para o coeficiente de variação são inferiores a 15% (Inmetro, 2011).

7.4.2. Precisão intermédia

Para a determinação da precisão intermédia, foram consideradas as 2 medições da repetibilidade e efetuaram-se 4 novos ensaios em dias diferentes, sobre a mesma amostra, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e usando os mesmos reagentes. A condição que variou face à repetibilidade foi o dia de análise. Para o parâmetro da precisão intermédia ser válido o seu coeficiente de variação não deve ultrapassar os 15% (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011). Na tabela 7.9 estão descritos os dados referentes à precisão intermédia.

Tabela 7.9 - Concentração em (pmol/ μ L) e respetiva concentração em mg/kg obtida no atum para o estudo da precisão intermédia em termos de CV (%).

Data	Amostra	Concentração (pmol/μL)	Concentração (mg/kg)
2/11/2017	Atum	17,5	88,2
	Atum	18,0	88,3
3/11/2017	Atum	20,1	102
	Atum	16,4	81,3
6/11/2017	Atum	16,9	83,5
	Atum	20,5	103
	Média	18,2	91,1
	Desvio-Padrão	1,5	8,5
	CV (%)	8,2	9,3

Os coeficientes de variação obtidos para a precisão intermédia foram inferiores a 15% (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011), sendo possível afirmar que o método apresenta uma boa precisão intermédia para a matriz em estudo. Considerando assim o método validado no parâmetro de precisão intermédia.

7.5. Exatidão

Para a avaliação da exatidão optou-se por usar um material de referência, FAPAS 27149, contendo o analito em questão (histamina). Os resultados obtidos são comparados com o valor certificado e é determinado o fator z-score para avaliar o desempenho do laboratório na análise através da seguinte equação (Relacre, 2000):

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S}$$

Onde:

X_{lab} - valor obtido pelo laboratório;

X_v - valor certificado pelo material de referência;

S - unidade de desvio, que pode ser a incerteza do material de referência ou do desvio padrão do material de referência.

A unidade de desvio utilizada foi o desvio padrão do material de referência, sendo este valor de 10,5. Na tabela 7.10 estão discriminados os valores de várias análises efetuadas ao material de referência.

Tabela 7.10 – Concentração em mg/kg obtida do FAPAS e seu respectivo z-score.

Data	Amostra	Concentração (mg/kg)	Valor Certificado (mg/kg)	Z-score
7/6/2017	FAPAS	135	137	-0,18
4/8/2017	FAPAS	139		0,16
22/9/2017	FAPAS	145		0,72
23/11/2017	FAPAS	173		3,43
15/01/2018	FAPAS	161		2,29
	Média	151		1,36

Como se pode observar pela tabela 7.10, inicialmente o z-score obtido é inferior a |2|, o que indica um resultado satisfatório e que o método aplicado é exato. No entanto, nas análises mais recentes o z-score obtido foi superior a |2|, o que possivelmente foi devido ao facto de a amostra FAPAS ter sido usada em inúmeras experiências, sendo que esta era descongelada a cada ensaio, podendo levar a alterações no valor de histamina. Por outro lado no ensaio de 23/11/2017 foi utilizado o ultrassons, o que poderá explicar o alto valor de z-score nesse ensaio. A média do z-score obtido, foi de 1,36, sendo este valor inferior a |2|, desta forma é possível aferir que o resultado é satisfatório e que o método aplicado é exato.

7.6. Incerteza

Por fim, o último parâmetro do processo de validação do método a ser validado foi a incerteza. Foi calculada a incerteza associada à precisão, a incerteza associada à exatidão e depois quantificou-se a incerteza combinada expandida a partir destas últimas duas. O cálculo da incerteza associada à precisão teve por base os resultados obtidos da precisão intermédia e o cálculo da incerteza associada à exatidão foi determinado através dos resultados de exatidão. Nas tabelas 7.11 e 7.12 estão os resultados referentes à incerteza associada à precisão e exatidão, respetivamente.

Tabela 7.11 – Valores de incerteza associada à precisão, $u'_{precisão}$ (mg/kg), com base nos resultados dos ensaios de Precisão Intermédia.

Amostra	Analito	Teor Médio (mg/kg)	$\sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2$	Desvio padrão $S_{i(j,k)}$	Incerteza (mg/kg) $u'_{precisão}$
Atum ao natural	Histamina	91,0	427	8,4	0,09

Tabela 7.12 – Valores de incerteza padrão $u(\overline{R}_m)$ (em mg/kg) determinados a partir dos resultados do ensaio FAPAS.

Concentração (mg/kg)				Desvio padrão S	Recuperação Média do Método (\overline{R}_m)	Incerteza (mg/kg) $u(C_{MRC})$	Incerteza Padrão (mg/kg) $u(\overline{R}_m)$
Descrição	Analito	Média \bar{c}_{obs}	Material Certificado C_{MRC}				
FAPAS 27149 (Canned Fish)	Histamina	151	137	10,5	1,10	2,29	0,05

Com os valores da incerteza associada à precisão intermédia e exatidão, determinou-se a incerteza combinada expandida, foi considerado um intervalo de confiança de 95% e um fator de expansão y igual a 2. Os resultados da incerteza combinada expandida e da incerteza expandida relativa combinada estão expressos na tabela 7.13.

Tabela 7.13 – Incerteza combinada expandida (%) associada à quantificação da histamina.

Amostra	Incerteza (mg/kg) $u'_{Precisão}$	Incerteza combinada expandida (mg/kg)	Incerteza expandida relativa combinada (%)
Atum ao natural	0,09	0,21	21,0

A incerteza expandida relativa combinada foi de 21,0% para a histamina, conduzindo, em geral, à apresentação dos resultados com três algarismos significativos.

O valor da incerteza combinada expandida obtido para a histamina, é semelhante ao valor determinado por outros autores (Evangelista *et al.*, 2016).

7.7. Análise das amostras

Após a validação do método analítico, procedeu-se à análise das diversas amostras objeto deste estudo.

Foram analisadas nove amostras de diferentes matrizes alimentares.

A análise das várias amostras consistiu num ensaio em triplicado, em que na terceira toma foi adicionado um volume de solução padrão 25 mM. A partir destes três ensaios foi possível calcular a respetiva taxa de recuperação. Após a obtenção dos resultados pelo *software Empower*, procedeu-se à quantificação da histamina em mg/kg através das equações descritas no capítulo 6.6.3.

Na tabela 7.14 está apresentado o teor médio em mg/kg das diferentes amostras, bem como a respetiva percentagem de recuperação, obtida através do ensaio de fortificação.

Tabela 7.14 – Concentração (em pmol/μL e mg/kg) de histamina, determinados nas amostras analisadas e respectivas taxas de recuperação.

Sigla	Amostra	Analito	Concentração (pmol/μL)	Concentração (mg/kg)	Recuperação (%)
AN1	atum ao natural	Histamina	38,7 ± 3,9	432 ± 1	75,5 ± 8,7
AN6	atum ao natural		< LoQ	< LoQ	-
AO1	atum em óleo		363 ± 10	1794 ± 47	110 ± 22
AO2	atum em óleo		36,5 ± 13,9	243 ± 2	64,8 ± 30,6
PA1	paté de atum		24,6 ± 5,2	127 ± 30	88,5 ± 12,1
PA2	paté de atum		n.d.	n.d.	-
PS1	paté de sardinha		22,9*	105*	131*
PC1	paté de camarão		n.d.	n.d.	-
SMT1	Sardinha em molho de tomate		35,1 ± 12,9	171 ± 62	62,0 ± 28,4

n.d. - Não detetado.

< LoQ - Inferior ao Limite de Quantificação.

* - Só foi detetada histamina em apenas 1 dos duplicados.

O teor de histamina (pmol/μL) observado na amostra AN6 ficou abaixo do limite de quantificação, o que implica que nesta amostra não foi possível a quantificação da histamina, mas foi possível a sua deteção. Na amostra AO1 obteve-se uma concentração de histamina (em pmol/μL) fora da gama de trabalho, pelo que também não foi possível quantificar o analito com precisão e exatidão nesta amostra (Relacre, 2000). Neste último caso bastava proceder à diminuição da toma de amostra para se obter um resultado preciso e exato.

As recuperações variaram entre os 62,0% e os 110%. A exceção foi uma marca de paté de sardinha cuja recuperação foi de 131%, onde, provavelmente houve a existência do efeito de matriz. Este efeito baseia-se na presença de interferentes característicos de determinadas matrizes, que no caso dos patês poderá ser o amido, o que pode levar a um aumento ou diminuição da resposta analítica (Martins, 2016). Como estamos a trabalhar em unidades na gama de pmol/μL houve a necessidade de definir uma gama de recuperação aceitável. Tendo em conta outros analitos que tal como a histamina são produzidos por via exógena, como por exemplo a ocratoxina A, e que está definida na legislação a gama de recuperação (Regulamento

(UE) N. 519, 2014), definiu-se como critério de aceitação, valores de recuperação entre os 60-120%, para a histamina.

Na figura 7.4, apresentam-se um gráfico de barras que traduz os resultados experimentais obtidos na análise da histamina nas várias amostras e que permitem uma melhor observação sobre a variação da concentração nas diferentes amostras. De realçar que o teor de histamina máximo imposto na legislação não deve ultrapassar os 200 mg/kg em pescado.

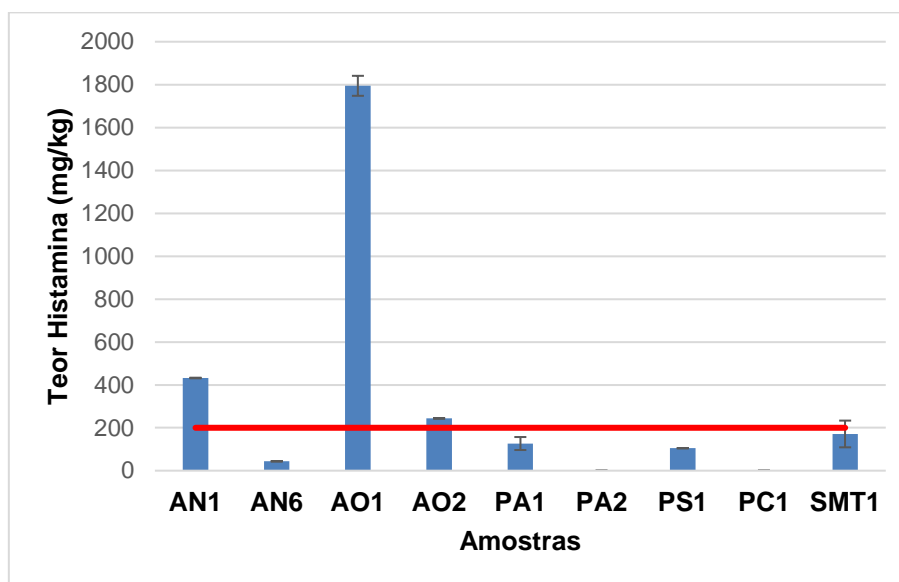


Figura 7.4 – Concentração (mg/kg) de histamina para as diferentes amostras analisadas.

Relativamente à quantificação de histamina, verificou-se que as amostras AN1, AO1 e AO2, que corresponde a uma amostra de atum ao natural e duas amostras de atum em óleo, respetivamente, apresentam desvios significativos quanto ao teor de histamina legislado, ultrapassando o limite permitido de 200 mg/kg de histamina (Regulamento (CE) N. 1441, 2007), pelo que se pode considerar que houve falhas ao nível das boas práticas de higiene. A amostra SMT1, que corresponde à sardinha em molho de tomate, pode apresentar desvios que ultrapassem o limite de 200 mg/kg. Esta amostra em particular foi preparada com o molho de tomate, de modo a mimetizar uma refeição típica deste alimento. O desvio observado nesta amostra poderá estar relacionado com o efeito de matriz, uma vez que a sardinha não é o único constituinte.

O teor de histamina quantificado nas amostras variou entre 105 mg/kg e 1794 mg/kg o qual foi encontrado num atum paté de sardinha e em atum em óleo, respetivamente. Não foi possível detetar histamina nas amostras PA2 e PC1, que correspondem a paté de atum e paté de camarão, respetivamente. Nos patês, existe um grande efeito de matriz devido à presença de amido, que pode interferir com a quantificação do analito em estudo. Outro motivo que dificultou a quantificação de histamina neste tipo de alimentos é o facto de o pescado ser apenas um dos diversos ingredientes deste tipo de amostras.

No que diz respeito aos atums enlatados, atum ao natural e atum em óleo, 75% das

amostras analisadas ultrapassam o limite de 200 mg/kg (Regulamento (CE) N. 1441, 2007). De acordo com a bibliografia, não é esperado uma percentagem elevada de amostras ultrapassarem os limites legislados, no entanto, o número de amostras de atum enlatado que foi analisado após a validação do método foi muito pequeno. Em 2010, Zarei e colaboradores obtiveram valores entre 4-236 mg/kg de histamina em amostras de atum enlatado. Foi na amostra de atum em óleo que se detetou a presença de histamina em maior concentração, os investigadores Silva e colaboradores verificaram que a concentração de histamina em atum em óleo é mais alta do que no atum ao natural (Silva *et al.*, 2011). Num estudo efetuado por Rahimi e colaboradores em 2012, através do método ELISA, obtiveram concentrações de histamina em atum enlatado entre 170-2100 mg/kg. Em 2015, Bilgin e Gençcelep realizaram um estudo similar para a quantificação de histamina por HPLC, aplicando-o à análise de 63 amostras de atum enlatado. Sete amostras de atum enlatado exibiram concentrações superiores a 100 mg/kg. Comparando os valores obtidos para o atum ao natural e atum em óleo, com os valores encontrados na bibliografia, estes encontram-se dentro da gama observada. No entanto, à que ter em atenção que a concentração de histamina no pescado varia de acordo com diversos fatores, entre eles, as condições de armazenamento e isso pode justificar a concentração de histamina elevada em algumas amostras.

Para finalizar e de acordo com a revisão bibliográfica, na análise de histamina, o método mais utilizado é HPLC. No entanto o UPLC é mais promissor para a determinação deste analito, uma vez que permite a redução da quantidade de solventes necessários, bem como o tempo necessário para as análises, sendo que recentemente esta técnica é cada vez mais utilizada em laboratórios credenciados.

8. Conclusão e perspectivas futuras

O método de cromatografia líquida de ultra eficiência usado neste trabalho revelou ser adequado para a quantificação da histamina em algumas matrizes alimentares. Foi selecionada uma gama de trabalho que pudesse ser utilizada para analisar diferentes matrizes alimentares simultaneamente, neste caso atum, patês e sardinha em molho de tomate. Relativamente à linearidade, esta foi adequada à gama de trabalho compreendida entre 9,09 – 84,1 pmol/ μ L, uma vez que se obteve um coeficiente de correlação superior a 0,995 e um valor de PG inferior ao tabelado.

O limite de deteção (LoD) foi de 3,48 pmol/ μ L e o limite de quantificação (LoQ) corresponde ao primeiro ponto da curva de calibração, sendo este confirmado a cada novo ensaio. Tendo em conta que existem diversos fatores que podem variar durante a preparação dos padrões da curva de calibração, o LoQ deste método encontra-se entre os valores 9,09 e 10,6 pmol/ μ L. Tanto o LoD e o LoQ revelaram-se adequados para as várias matrizes alimentares analisadas.

A precisão do método foi avaliada através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia que revelaram coeficientes de variação inferiores a 6 e 10% respetivamente e tendo em conta que o valor máximo admitido no coeficiente de variação é de 15%, pode se afirmar que os resultados são satisfatórios.

A exatidão do método foi avaliada através do valor de z-score, onde se obteve um valor de z-score inferior a 2, pelo que o resultado foi satisfatório, confirmando-se a exatidão do método. Por último, a incerteza expandida relativa combinada foi de 21,0%, pelo que os resultados devem, em geral, ser apresentados com três algarismos significativos.

A concentração de histamina nas amostras variou entre 105 e 1794 mg/kg. Não se verificou o cumprimento do limite máximo permitido (200 mg/kg) presente na legislação em vigor, tendo sido detetados valores acima do permitido em uma amostra de atum ao natural e nas duas amostras de atum em óleo. É importante monitorizar a histamina em enlatados de pescado, uma vez que é neste tipo de amostras que a sua concentração tende a ser mais elevada.

Deste modo, pode-se concluir que o método proposto para a quantificação de histamina em pescado e seus derivados apresentou resultados confiáveis para poder ser utilizado regularmente para essa finalidade. Também é possível referir que o processo de validação é uma etapa indispensável para garantir a qualidade e credibilidade dos resultados obtidos por um método validado.

Para finalizar, segue-se algumas propostas que podem ser realizadas futuramente:

- ✓ Desenvolver o método para a putrescina, cadaverina e tiramina, uma vez que estas aminas estão associadas à degradação do pescado e por serem potenciadoras da histamina, torna-se importante a sua determinação e quantificação.

Implementação e validação do método analítico para determinação da Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

- ✓ De modo a garantir a viabilidade do método validado para o pescado, analisar amostras provenientes de peixe fresco, uma vez que só foram utilizados conservas ou patês.
- ✓ Analisar um maior número de amostras relativamente aos enlatados onde se obtiveram valores de histamina acima de 200 mg/kg.

Referências bibliográficas

Adams, F.; Nolte, F.; Colton, J.; DeBeer, J.; Wedding, L. (2018) Precooking as a control for histamine formation during the processing of tuna: an industrial process validation. *Journal of Food Protection*, Vol. 81. Nº 3, pp, 444-455;

Bilgin, B.; Gençcelep, H. (2015) Determination of biogenic amines in fish products. *Food Science and Biotechnology*, Vol. 24. Nº 5, pp. 1907-1913;

Brink, B. T.; Damink, C.; Joosten, H.M.L.J.; Huis in't Veld, J.H.J. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 11. Nº 1, pp. 73-84;

Brinker, C.; Kerr, M.; Rayner, C. (2002) Investigation of biogenic amines in fish and fish products. *Victorian Government Department of Human Services*. Vol. 1, pp. 1-17;

Cardozo, M.; Lima, K. S. C.; França, T. C. C.; Lima, A. L. S. (2013) Aminas Biogênicas: Um Problema de Saúde Pública. *Revista Virtual de Química*, Vol. 5. Nº 2, pp. 149-168;

CDER (1994) Reviewer Guidance – Validation of Chromatographic Methods, 33 p.;

Claessens, H. A.; Van Straten, M. A. (2004) Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1060. Nº 1-2, pp. 23–41;

Collins, J. D.; Noerrung, B.; Budka, H.; Andreoletti, O.; Buncic, S.; *et al.* (2011) Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. *EFSA Journal*, Vol. 9. Nº 10, pp. 1-93;

Committee for Medicinal Products for Human Use (2011) Guideline on Bioanalytical method validation. *European Medicines Agency*, 1ª Rev. 23 p.;

Costa, J. C. D. (2015) Validação de um método de cromatografia de alta eficiência para determinação de conservantes em géneros alimentícios. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa – Lisboa, 105p.;

Dadáková, E.; Krizek, M.; Pelikánová, T. (2009) Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, Vol. 116. Nº 1, pp. 365–370;

Dolan, J. W. (2016) How does it work? Part V: Fluorescence Detectors. *LCGC North America*, Vol. 34. Nº 9, pp. 710–719;

EFSA (2017) Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. *EFSA Supporting Publications*, Vol. 14. Nº 9, pp. 36;

EFSA; ECDC (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, Vol. 15. Nº 12, pp. 228;

El-Zahar, K. M. (2014) Biogenic amines and microbiological profile of Egyptian cheeses. *Universal Journal of Food and Nutrition Science*, Vol. 2. Nº 1, pp. 18-26;

Emborg, J.; Paw, D. (2008) Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii* — development and evaluation of predictive models, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 128. Nº 2, pp. 234-243;

Evangelista, W. P.; Silva, M. T.; Guidi, L. R.; Tette, P. A. S.; Byrro, R. M. D.; Silva, P. S.; Fernandes, C.; Gloria, M. B. A. (2016) Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish. *Food Chemistry*, Vol. 211. pp. 100-106;

Feng, C.; Teuber, S.; Gershwin, M. E. (2016) Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, Vol. 50. Nº 1, pp. 64–69;

Fernandes, M. S. (2016) Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no Laboratório da SGS Portugal Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa – Lisboa, 94 p.;

Flick, G. J.; Granata, L. A. (2005) Biogenic Amines in Foods, Handbook of Toxins in Food. *CRC Press : Estados Unidos da América*, Cap. 6, 344 p. ISBN : 0849319048;

FAO (2017) Fishery and Aquaculture Country Profiles, The Portuguese Republic. Disponível em : <http://www.fao.org/fishery/facp/PRT/en>. Acedido a 25 de Janeiro de 2018;

FDA (2011). Scombrotxin (Histamine) Formation. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition : Estados Unidos da América*, Cap. 7, 476 p. ISBN : 9780854044603;

Food Quality (2017) “Hundreds” sickened by histamine poisoning from fish. Disponível em: <https://www.foodqualitynews.com/Article/2017/08/08/Multiple-EU-countries-report-outbreaks-caused-by-histamine>;

Gardini, F.; Özogul, Y.; Suzzi, G.; Tabanelli, G.; Özogul, F. (2016) Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7. pp, 1-8;

Gennaro, L.; Brunetti, N. D.; Locuratolo, N.; Ruggiero, M.; Resta, M.; Diaferia, G.; Rana, M.; Caldarola, P. (2017) Kounis syndrome following canned tuna fish ingestion. *Acta Belgica: International Journal of Clinical and Laboratory Medicine*, Vol. 72. Nº 2, pp, 142-145;

Gloria, M. B. A. (2005) Bioactive Amines, Handbook of science, technology, and engineering. *CRC Press – Estados Unidos da América*, Vol. 1. Cap. 13, 1516 p. ISBN : 978-0-8493-9847-6;

Gouveia, N. N. F. (2009) Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de aminas biogénicas em tunídeos. Dissertação de Mestrado. Universidade da Madeira – Funchal, 83 p;

Greibrokk, T. (2004) The contributions of Csaba Horváth to liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, Vol. 27. Nº 15-16, pp. 1249-1254;

Guia ISO/IEC 99 (2008) Vocabulário Internacional de Metrologia, Instituto Português da Qualidade, 95p.;

Guimarães, J. L. (2005) Aminas biogénicas, aminas voláteis, triptofano livre e ureia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado. Dissertação de Mestrado. Universidade estadual de Campinas – Campinas, 114 p.;

Guimarães, L. F. L. (1997) Cromatografia líquida de alta eficiência, Introdução a métodos cromatográficos. *Editora da UNICAMP - Brasil*, 7ª Ed. Cap. 9, 262 p. ISBN : 85-268-0164-3;

Halász, A.; Baráth, A.; Sarkadi, L. S.; Holzapfel, W. (1994) Biogenic amines and production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 5. Nº 2, pp. 42-49;

Heidorn, M. (2016) The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography. *Thermo Fisher Scientific*, Vol. 1. pp. 1-6;

Inmetro (2011) Orientação sobre validação de métodos analíticos. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04, 20 p.;

Innocente, N.; Biasutti, M.; Padovese, M.; Moret, S. (2007) Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*, Vol. 101. Nº 3, pp. 1285-1289;

INSA (2017) Alimentação e Nutrição. Disponível em: <http://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/alimentacao-e-nutricao>. Acedido a 21 de Janeiro de 2018;

INSA (2017) História. Disponível em: <http://www.insa.min-saude.pt/category/institucional/historia/>. Acedido a 21 de Janeiro de 2018;

INSA (2017) O Instituto. Disponível em: <http://www.insa.min-saude.pt/category/institucional/o-instituto/>. Acedido a 21 de Janeiro de 2018

;

IPAC (2007), Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos. Disponível em: <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC007.pdf>. Acedido a 17 de Outubro de 2017;

ISO 19343 : 2017 Microbiology of the food chain — Detection and quantification of histamine in fish and fishery products — HPLC method, 22 p.;

Jinadasa, B. K. K. K.; Jayasinghe, G. D. T. M.; Ahmad, S. B. N. (2016) Validation of high-performance liquid chromatography (HPLC) method for quantitative analysis of histamine in fish and fishery products. *Cogent Chemistry*, Vol. 338. Nº 1, pp. 1-8;

Jorge, T. F. P. (2012) Nutrientes e suplementos nutricionais em vegetais e frutos frequentemente usados na dieta: estudo por espectrometria de massa do resveratrol nas uvas. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa – Lisboa, 71p;

Karovicová, J.; Kohajdová, Z. (2005) Biogenic Amines in Food. *ChemInform*. Vol. 35. Nº 34, pp. 70-79;

Kim, M. K.; Mah, J. H.; Hwang, H. J. (2009) Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chemistry*, Vol. 116. Nº 1, pp. 87-95;

Kordiovská, P.; Vorlová, L.; Borkovcová, I.; Karpísková, R.; Buchtová, H.; Svobodová, Z.; Křížek, M.; Vácha, F. (2006). The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, Vol. 51. Nº 6, pp. 262-270;

Lanças, F. M. (2011) Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde?. *Scientia Chromatographica*, Vol. 3. Nº 1, pp. 17-23;

Lavizzari, T.; Nogues, M. T. V.; Cid, S. B.; Font, A. M.; Carou, M. C. V. (2006) Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1129. Nº 1, pp. 67–72;

Lembke, P. (2001) Liquid Chromatography, Handbook of analytical techniques. *Wiley-VCH - Germany*. 1ª Ed. Cap. 12. 1196 p. ISBN : 9783527618323;

Lin, C. S.; Kung, H. F.; Lin, C. M.; Tsai, H. C.; Tsai, Y. H. (2016) Histamine production by *Raoultella ornithinolytica* in mahi-mahi meat at various storage temperatures. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 24. Nº 2, pp. 305-310;

Linares, D. M.; Martín, M. C.; Ladero, V.; Alvarez, M. A.; Fernandez, M. (2011) Biogenic Amines in Dairy Products. *Food Science and Nutrition*, Vol. 51. Nº 7, pp. 691-703;

Mahmoudi, M.; Mardani, K. (2015) Histamines and foods: A review on importance, detection and controlling in foods. *Malaysian Journal of Science*, Vol. 34. Nº 1, pp. 103-107;

Maia, M. C. R. (2015) Ocorrência de histamina em produtos alimentares disponíveis no mercado: qual o risco do seu consumo? Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra – Coimbra, 42 p;

Majjala, R.L.; Eerola, S.H.; Aho, M.A.; Hirn, J.A. (1993) The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, Vol. 56. Nº 2, pp.125-129;

Martins, A. F. S. (2016) Implementação e validação de métodos analíticos. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra – Coimbra. 126 p;

Meyer, V. R. (2004) Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4ª Ed., John Wiley & Sons, Ltd, 369 p. ISBN: 0-470-09377-3;

Moret, S.; Conte, L. S. (1996) High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, Vol. 729. Nº 1-2, pp. 363-369;

Myslek, A. C.; Leszczynska, J. (2017) Risk assessment related to biogenic amines occurrence in ready-to-eat baby foods. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 105. pp, 82-92;

Norma PT 4490:2009, Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em produtos de pesca e aquacultura, 9 p.;

Önal, A. (2007) Analytical, Nutritional and Clinical Methods - A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, Vol. 103. Nº 1, pp. 1475-1486;

Özogul, F. (2004) Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method. *European Food Research and Technology*, Vol. 219. Nº 5, pp. 465-469;

Porto, H. S. M. (2014) HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analítico. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra – Coimbra, 102 p;

Prester, L. (2011) Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Additives & Contaminants*, Vol. 28. Nº 11, pp. 1547-1560;

Rahimi, E.; Nayeypour, F.; Alian, F. (2012) Determination of histamine in canned tuna fish using ELISA method. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, Vol. 4. Nº 2, pp. 64-66;

Rajalingam, D.; Loftis, C.; Xu, J. J.; Kumar, T. K. S. (2009) Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein science*, Vol. 18. Nº 5, pp. 980-993;

Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, Jornal Oficial da União Europeia L 322, 12 p.;

Regulamento (UE) Nº 519/2014 de 16 de Maio de 2014, Jornal Oficial da União Europeia L 147, 15 p.;

Relacre (2000) Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Relacre, Lisboa, 60 p. ISBN : 972-8574-02-9;

Reuhs, B. L.; and Ann, M. (2010) High-Performance Liquid Chromatography, Food Analysis. *Springer – United States of America*. 4ª Ed. Cap. 28. 585 p. ISBN : 1441914773;

Ribani, M.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; Bottoli, C. B. G.; Melo, L. F. C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, Vol. 27, Nº5, pp. 771-780;

Rogers, P. L.; Staruszkiewicz, W. F.; Benner, R. A.; (2003) Gas Chromatographic Method for Putrescine and Cadaverine in Shrimp. *Journal of AOAC International*, Vol. 86. Nº 6, pp. 1172-1178;

Saaid, M.; Saad, B.; Hashim, N. H.; Ali, A. S. M.; Saleh, M. I. (2009) Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry*, Vol. 113. Nº 4, pp.1356-1362;

Santos, M. H. S. (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 29. Nº 2-3, pp.213-231;

Shalaby, A. R. (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, Vol. 29. Nº 7, pp. 675-690;

Silva, T. M. (2008) Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da UFMG - Belo Horizonte, 103p;

Silva, T. M.; Sabaini, P. S.; Evangelista, W. P.; Glória, M. B. A. (2011) Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. *Food Control*, Vol. 22. Nº 2, pp. 323-327;

Silva, V. L. M.; Torre, C. A. L.; Mársico, E. T.; Mano, S. B.; Júnior, C. A. C. (2013) Aminas biogénicas como indicadores de qualidade de salames e produtos cárneos fermentados. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, Vol. 9. Nº 16, pp. 69-84;

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. (2001) Principios de Análisis Instrumental. 5ª Ed., McGraw-Hill : Madrid, 1024 p. ISBN : 0-03-002078-6;

Souza, A.; Calixto, F.; Mesquita, E.; Packness, M.; Azeredo, D. (2015) Histamina e rastreamento do pescado: revisão de literatura. *Arquivos do Instituto Biológico*, Vol. 82. pp. 1-11;

Stadnik, J.; Dolatowski, Z. J. (2010) Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum*, Vol. 9. Nº 3, pp. 251-263;

Sullivan, B. O. (2000) The analysis of biogenic amines by standard and novel methods. Dissertação de Mestrado. Dublin City University – Dublin, 88 p;

Swartz, M. (2010) Seeing is Believing: Detectors for HPLC. *LCGC North America*, Vol. 28. Nº 10, pp. 880–889;

Taleuzzaman, M.; Ali, S.; Gilani, SJ; Imam, SS; Hafeez, A. (2015) Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, Vol. 6. Nº 2, pp. 1-5;

Torres, N. M.; Talavera, T. A.; Andrews, H. E.; Contreras, A. S.; Pacheco, N. (2017) Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, Vol. 7. Nº 3, pp. 1-19;

Turnipseed, S. B.; Roybal, J. E.; Pfenning, A. P. (2006) Confirmation of fluoroquinolone residues in salmon and shrimp tissue by LC/MS: Evaluation of single quadrupole and ion trap instruments. *FDA Laboratory Information Bulletin*, Vol. 4298. pp. 1-20;

Waters (2017) Beginners guide to liquid chromatography. Disponível em: http://www.waters.com/waters/pt_PT/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=pt_PT. Acedido a 6 de Fevereiro de 2018;

Waters (2018) Detector Eletroquímico 2465. Disponível em: https://www.waters.com/waters/pt_BR/2465-Electrochemical-Detector-for-HPLC-Systems/nav.htm?locale=pt_BR&cid=514431. Acedido a 6 de Fevereiro de 2018;

Whitworth, J. J. (2017) "Hundreds" sickened by histamine poisoning from fish. Disponível em: <https://www.foodqualitynews.com/Article/2017/08/08/Multiple-EU-countries-report-outbreaks-caused-by-histamine>. Acedido a 25 de fevereiro de 2018;

WHO (2016), High Pressure Liquid Chromatography, The Internacional Pharmacopeia, Disponível em : <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acedido a 11 de Outubro de 2017;

Xie, Z.; Wang, Y.; Chen, Y.; Xu, X.; Jin, Z.; Ding, Y.; Yang, N.; Wu, F. (2017) Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish. *Food Chemistry*, Vol. 230 .pp. 547-552;

Zarei, M.; Mollaie, A.; Eskandari, M. H.; Pakfetrat, S.; Shekarforoush, S. (2010) Histamine and heavy metals content of canned tuna fish. *Global Veterinaria*, Vol. 5. Nº 5, pp. 259-263;

Zarei, M.; Fazlara, A.; Najafzadeh, H.; Karahroodi, F. Z. (2014) Efficiency of Different Extraction Solvents on Recovery of Histamine from Fresh , Frozen and Canned Fish. *Journal of Food Quality and Hazards Control 1*, Vol. 1. pp. 72-76;

Zhang, L.; Huang, W.; Wang, Z.; Cheng, J. (2002) Determination of histamine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytical sciences*, Vol. 8. Nº 10, pp. 1117-1120;