



# DESENVOLVIMENTO DE NOVO MÉTODO DE ANÁLISE DE HISTAMINA, PUTRESCINA E CADAVERINA POR CLAE UTILIZANDO DERIVATIZAÇÃO COM 6-AMINOQUINOLIL-N-HIDROXISUCCINIMIDIL CARBAMATO (AQC)

C.R. Pombo<sup>1</sup>, E.T. Mársico<sup>1</sup>, D.F. Schulz<sup>2</sup>, R.L.O. Godoy<sup>2</sup>, S. Pacheco<sup>2</sup>

1- Faculdade de Veterinária, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Campus Santa Rosa. Rua Vital Brazil Filho, 64 – CEP: 24230-340 – Niterói – RJ – Brasil, Telefone: (55-21)2629-9545 – e-mail: ([cissapombo@yahoo.com.br](mailto:cissapombo@yahoo.com.br))

2- Laboratório de Cromatografia Líquida, EMBRAPA – Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas, 29501 – CEP: 23020-470 – Guaratiba – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: (55-21)3622-9792 – FAX: (55-21)2410-1090 – e-mail: ([danschulzms@gmail.com](mailto:danschulzms@gmail.com))

**RESUMO** – O consumo de alimentos fermentados, em especial peixe anchovado, pode ser extremamente prejudicial a algumas pessoas devido a possibilidade de intoxicação por altos níveis de histamina e outras aminas biogênicas formadas durante o processo de fermentação. Por esta razão, um rigoroso controle dos teores de aminas biogênicas nesses alimentos se faz necessário, de forma a garantir a sua segurança. Este trabalho mostra o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica por CLAE para histamina, putrescina e cadaverina num mesmo ensaio, onde o resultado cromatográfico é obtido em apenas dez minutos, utilizando uma coluna de ultra eficiência, Kinetex, e um reagente que produz derivados altamente estáveis, o AQC, sem a necessidade de purificação antes da derivatização ou da injeção no cromatógrafo.

**ABSTRACT** – Consumption of fermented foods, especially fish anchovies, can be extremely harmful to some people due to the possibility of poisoning by high levels of histamine and other biogenic amines, formed during fermentation process. For this reason, a strict control of the levels of these amines it is necessary in this kind of food, in order to ensure their safety. This work shows the development of a new HPLC analytical method for histamine, putrescine and cadaverine in a single test, where the chromatographic result is obtained in just ten minutes, using a ultra performance column, Kinetex, and a reagent that produces highly stable derivatives, AQC, without the need of previous cleaning of the extract before derivatization or the injection into the chromatograph.

**PALAVRAS-CHAVE:** segurança alimentar, envenenamento escombróide, peixe anchovado, aminas biogênicas.

**KEYWORDS:** food safety, scombroid poisoning, fish anchovies, biogenic amines

## 1. INTRODUÇÃO

A histamina é uma importante amina biogênica encontrada em pescados como atum, cavala, bonito e sardinha, e em alimentos fermentados como queijos, salames e chucrutes (ROSSANO *et al.*, 2006). Sua presença nesses alimentos não deve ultrapassar certos limites (100mg/Kg no Brasil e União Européia (UE)), pois a ingestão dessa substância, em quantidades que variam de acordo com a pessoa, pode causar envenenamento escombróide, cujos principais sintomas são: dores abdominais, vômitos, diarreia, dor de cabeça, eritema, urticária e hipotensão, esta última podendo levar a morte,



principalmente em idosos, crianças ou cardiopatas. Os alimentos fermentados estão mais propensos a apresentarem altos níveis de histamina, pois durante a fermentação enzimas microbianas atuam sobre o alimento, produzindo novas substâncias que conferem o sabor e o aroma característicos. Dentre esses produtos estão os peixes anchovados, provenientes da fermentação de peixes engraulídeos como *Engraulis ringens*, *E. mordax* e *E. encrasicolus* ou da sardinha brasileira, *Sardinella brasiliensis*. Esse tipo de pescado é naturalmente mais susceptível à produção de altas quantidades de histamina, pois possuem altos teores de histidina livre, precursor da histamina, além da microbiota naturalmente encontrada nesses peixes ser produtora de histamina (SHALABY, 1996). Todos esses fatores tornam os peixes anchovados um dos alimentos que mais oferecem risco de causar intoxicação por histamina, o que requer, tanto por parte das empresas fabricantes, quanto por parte dos órgãos de fiscalização sanitária, uma atenção maior no controle de todo o processo de fabricação a fim de garantir um baixo teor de amins biogênicas no produto final, diminuindo, assim, os riscos que esse tipo de alimento pode trazer aos seus consumidores.

A ação da histamina no organismo humano é potencializada pela ingestão concomitante de outras amins biogênicas produzidas durante a fermentação, como a putrescina e a cadaverina, que promovem uma inibição competitiva dos sistemas de detoxificação da histamina. Portanto, as metodologias analíticas para amins biogênicas em peixes anchovados devem preferencialmente abranger essas três toxinas numa só análise, poupando tempo e recursos.

No Brasil, a histamina vem sendo analisada por fluorimetria e cromatografia em camada delgada (CCD). O método por fluorimetria envolve reação com agente derivatizante *o*-ftalaldeído, com etapas prévias de purificação do extrato em coluna de troca iônica (AOAC, 2002). Isso resulta numa análise demorada e com produtos de derivatização pouco estáveis. Utilizando-se da CCD a análise se torna mais crítica, pois a quantificação da histamina não é precisa, baseando-se na comparação visual das manchas presentes na placa após eluição com padrões nas concentrações críticas. Diante disso a proposta deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de análise de histamina, putrescina e cadaverina por CLAE utilizando como agente derivatizante o 6-aminoquinolil-N-hidroxissuccinimidil carbamato (AQC), que produz adutos de histamina altamente estáveis, reage rapidamente e é de fácil manipulação (SCHULZ, 2009).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O sistema utilizado foi um cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695, com coluna Kinetex C18, 2,6µm, 50 X 2,10mm Phenomenex® em forno a 30°C, eluição em gradiente com fase móvel acetonitrila:tampão acetato (pH 5,5), de 4 a 50% de . Fluxo 0,51mL/min e detector de fluorescência, comprimento de onda de excitação 254nm e emissão 395nm. O volume injetado foi de 1µL.

Para a reação de derivatização foi utilizado o kit para aminoácidos da Waters® AccQ•Tag®, constituído do reagente AQC, a ser ressuspenso em 1mL de acetonitrila (que acompanha o kit) e tampão borato (pH 8,8) para a reação. No ensaio foram utilizados padrões Sigma® de dicloridrato de histamina (pureza > 99,0%), dicloridrato de putrescina (pureza > 98,0%) e dicloridrato de cadaverina (pureza > 98,0%). Foi preparada uma solução estoque 3,0mM de cada um dos padrões em solução 20mM de HCl. A concentração das soluções padrão injetadas foram 0,3mM e 30µM. Como amostra de peixe anchovado foi utilizada sardinha anchovada comercializada no mercado nacional, fornecida diretamente pelo fabricante.

Toda a água utilizada nos experimentos foi ultra pura, recém coletada em equipamento MilliQ®, com resistividade mínima de 18MΩ/cm e carbono orgânico total (TOC) máximo de 7ppb. Os solventes utilizados, foram grau HPLC, Tedia®.

A extração foi realizada de acordo com o método AOAC (2002) que consiste em extrair as amins biogênicas de 10g de amostra, devidamente homogeneizada, com metanol em “banho maria” sob leve agitação a 60°C, por 15 minutos. Em seguida o extrato é filtrado e avolumado com metanol para 50mL. Após essa etapa é realizada uma purificação do extrato em coluna de troca iônica, para



que seja realizada leitura do teor de histamina no fluorímetro. Para a análise por CLAE a purificação não é necessária, entretanto, foram feitas análises por CLAE de ambos os extratos para fim de comparação. As alíquotas do extrato que não purificado passaram por filtração em filtro Millex® 0,22µM.

A derivatização foi realizada de acordo com método de Schulz (2009), que consiste na secagem de uma alíquota do extrato em dessacador sob vácuo, contendo sílica gel previamente seca em estufa a 105°C e posterior ressuspensão em 20µL de HCl 20mM, seguida de adição de 60µL do tampão borato e agitação por 1 minuto e adição de 20µL do AQC, também seguida de agitação por 1 minuto. A solução derivatizada foi então transferida para “vials” com redutor de volume.

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos padrões mostrou, conforme a Figura 1, que o AQC reage prontamente não só com a histamina, mas também com a putrescina e a cadaverina. A formação de cauda no pico da histamina se deve ao pH da fase móvel, que promove ionização da mesma.

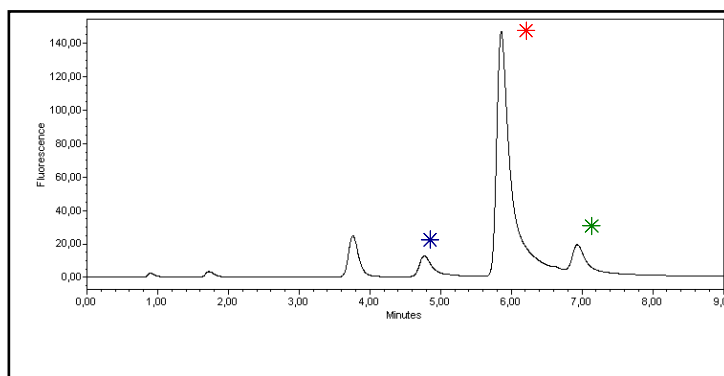


Figura 1 – Cromatograma dos padrões, \*putrescina, \*histamina e \*cadaverina.

Comparando os resultados de Schulz (2009) com o resultado acima, nota-se que a utilização da coluna Kinetex, propiciou o desenvolvimento de um método rápido, cujo tempo total de análise é de 10 minutos, com uma ótima separação entre os picos dos analitos, mesmo na amostra não purificada em coluna de troca iônica, conforme a Figura 2. A utilização da coluna de ultra performance, que permite a utilização de fluxo baixo e análises mais rápidas, resultou na geração de menos resíduo de solvente, proporcionando o desenvolvimento de uma análise menos impactante para o ambiente.

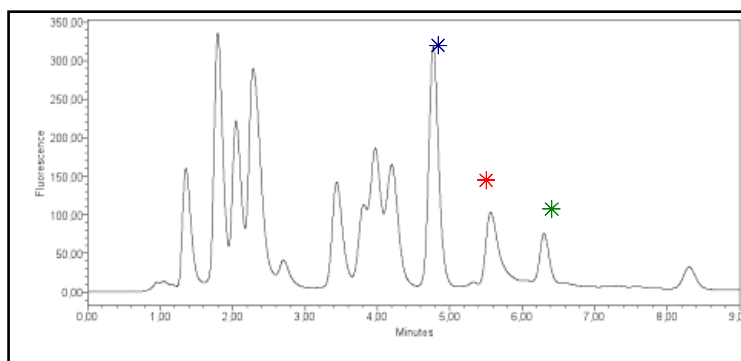


Figura 2 – Cromatograma do extrato bruto de sardinha anchovada, \*putrescina, \*histamina e \*cadaverina.



Segundo os resultados das Figuras 2 e 3 a purificação do extrato de sardinha anchovada propicia um cromatograma mais limpo, com menos interferentes, entretanto a purificação elimina da amostra a putrescina e a cadaverina, perdendo essa informação no cromatograma. Contudo, o cromatograma do extrato bruto, mesmo com interferentes, proporcionou um boa resolução, suficiente para a quantificação da histamina, mas também das outras aminas alvo do estudo, putrescina e cadaverina.

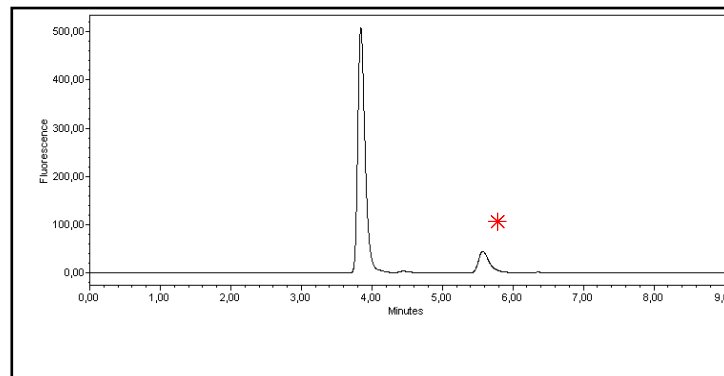


Figura 3 – Cromatograma do extrato purificado de sardinha anchovada, \* histamina.

Os resultados mostram ainda que a utilização de detector de fluorescência fornece uma maior sensibilidade e melhor razão sinal/ruído, o que permite a injeção de pequenas quantidades de amostra derivatizada, no caso 1 $\mu$ L, poupando amostra e aumentando a vida útil da coluna.

## 4.CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que o método desenvolvido é capaz de detectar e quantificar a histamina, a putrescina e a cadaverina presentes em amostras de peixe anchovado utilizando-se de uma extração e derivatização simples, que não necessita de purificação prévia. A análise desenvolvida é rápida e gera pouco resíduo quando comparada aos métodos tradicionais, o que permite economia de tempo e recursos, além de uma maior capacidade de análises.

## 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA. 17 ed., 2002.

ROSSANO, R.; MASTRANGELO, L.; UNGARO, N.; RICCIO, P. Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): a study by capillary electrophoresis. *J. Chrom. B*, v. 830, n. 1, p. 161-164, 2006.

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

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