

Estudo preliminar sobre a ocorrência de histamina em macroalgas marinhas do Estado do Ceará¹

Preliminary studies about the occurrence of histamine in seaweed
from Ceará State, Brazil

José Olavo Bezerra Mourão², Kelma Maria dos Santos Pires³, Márcia Barbosa de Sousa⁴,
Francisco Arnaldo Viana⁵ e Silvana Saker-Sampaio⁶

Resumo - A histamina é uma amina primária produzida a partir da descarboxilação microbiana da L-histidina. A ingestão de alimentos contendo altos níveis dessa amina pode provocar intoxicação histamínica. A histamina ocorre em uma ampla variedade de plantas superiores, mas sua presença tem sido relatada em um número limitado de espécies de algas marinhas. No presente trabalho quinze espécies de macroalgas marinhas coletadas na praia do Guajiru, Trairi-CE foram analisadas quanto à presença de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa. A identificação da histamina foi feita comparando-se o tempo de retenção do cloridrato de histamina padrão (Sigma), igual a $8,24 \pm 0,05$ min ($n = 15$), com aquele do composto presente nas algas e eluído em aproximadamente 8 min, assim como com base na co-cromatografia. Apenas duas espécies de algas marinhas: *Botryocladia occidentalis* e *Cryptonemia crenulata* apresentaram um composto com tempo de retenção de $8,26 \pm 0,03$ min e $8,27 \pm 0,03$ min, respectivamente, os quais foram considerados preliminarmente como histamina.

Termos para indexação: Detecção, HPLC, histamina

Abstract - Histamine is a primary amine formed from microbial decarboxylation of L-histidine. Consumption of food containing high levels of histamine might induce an intoxication known as histaminic poisoning. Histamine occurs in a wide range of land plants, but has been reported in a very limited number of marine algae. In this paper, fifteen marine macroalga species were collected at Guajiru beach, Trairi-CE. The presence of histamine was investigated using RP-HPLC. Standard solution of histamine showed a retention time of 8.24 ± 0.05 min ($n = 15$). Chromatography of *Botryocladia occidentalis* and *Cryptonemia crenulata* presented a component with approximately the same retention time as histamine, 8.26 ± 0.03 min and 8.27 ± 0.03 min, respectively. For the other species, chromatograms did not show a component similar to histamine.

Index terms: Detection, HPLC, histamine.

¹Recebido para publicação em 22/03/2006; aprovado em 06/11/2006

Parte de monografia apresentada pelo primeiro autor ao Dep. de Engenharia de Pesca, CCA/UFC, CE para obtenção do título de Engenheiro de Pesca. Apoio financeiro: CNPq.

²Eng. de Pesca, CCA/UFC, CE, e-mail: jobmourao@gmail.com

³Eng. de Pesca, estudante de Mestrado em Engenharia de Pesca, CCA/UFC, CE, e-mail: kelmapires@gmail.com

⁴Biólogo, Mestre em Engenharia de Pesca, CCA/UFC, CE, e-mail: marciabiol@gmail.com

⁵Químico, D.Sc., Prof. do Dep. de Química da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, RN, e-mail: arnaldo@hotmail.com

⁶Eng. de Pesca, Ph.D., Prof. do Dep. de Engenharia de Pesca, CCA/UFC, CE, e-mail: sampaioa@ufc.br e sakersil@gmail.com

Introdução

As aminas biogênicas são definidas como compostos orgânicos nitrogenados básicos, de baixo peso molecular, que geralmente possuem atividade biológica. São formadas e degradadas como resultado do metabolismo normal de animais, vegetais e microrganismos por aminação e transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou principalmente através da descarboxilação de aminoácidos (Smith, 1980; Bester & Mostert, 1993; Halász et al., 1994; Santos, 1996).

Esses compostos são encontrados em uma variedade de alimentos de origem animal e vegetal, como algas, peixes e seus produtos (Kneifel, 1979; Shalaby, 1994; Cinquina et al., 2004; Krizek et al., 2004; Patange et al., 2005; Tsai et al., 2005), produtos cárneos (Straub et al., 1993; Draisci et al., 1998), queijos (Stratton et al., 1991; Martelli et al., 1993), vegetais frescos e fermentados (Kalac et al., 2002; Moret et al., 2005), cervejas (Izquierdo-Pulido et al., 1993; Loret et al., 2005) e vinhos (Leitão et al., 2005).

As propriedades psicoativas e vasoativas de algumas aminas biogênicas, especialmente histamina, provocam efeitos tóxicos e farmacológicos após a ingestão de alimentos contendo tais compostos. Isso ocorre principalmente em indivíduos com comprometimento no sistema das monoamina-oxidases (MAO A e MAO B), que são encontradas, naturalmente, no trato gastrointestinal humano (Ten Brink et al., 1990).

Aminas farmacologicamente ativas em algas ou produtos de algas devem ser estudadas. Dependendo da quantidade presente, elas podem representar um risco à saúde do consumidor por desencadear sintomas de intoxicação que podem inclusive levar à morte. Estudos capazes de revelar a presença de aminas biogênicas em algas marinhas são importantes, tendo em vista que: (1) elas podem ser utilizadas como alimento humano; (2) muitos compostos extraídos de algas, principalmente os ficolóides, agar e carragenana, são empregados na manufatura de medicamentos, cosméticos e alimentos, cujo destino é o consumo humano; e (3) as aminas biogênicas não são destruídas pelo calor (Cannell, 1993).

Para promover as algas marinhas como alimento humano é necessário conhecer os compostos benéficos (nutrientes) e maléficos (fatores antinutricionais e compostos potencialmente tóxicos) que possam estar presentes.

O objetivo deste trabalho é investigar preliminarmente a ocorrência de histamina em algumas macroalgas marinhas presentes no litoral do Ceará.

Material e Métodos

Quinze espécies de macroalgas marinhas pertencentes às divisões Chlorophyta: *Caulerpa cupressoides*, *C. prolifera*, *C. racemosa*, *Cladophora prolifera* e *Ulva fasciata*; Rhodophyta: *Botryocladia occidentalis*, *Bryothamnion seaforthii*, *Cryptonemia crenulata*, *Gracilaria ferox* e *Hypnea cervicornis*; e Phaeophyta: *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris delicatula*, *Lobophora variegata*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum* foram coletadas na Praia do Guajiru, Trairi-CE, em julho de 2004, durante a maré baixa, e levadas para o laboratório, onde foram lavadas e preparadas para estocagem a -20°C .

Aproximadamente 100 g de cada alga foram macerados com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, usado na preparação dos extratos. Estes, preparados em triplicata, constaram da suspensão de 1g do pó em 10 mL de HCl 0,1 M, homogeneização em Vortex por 1 min e aquecimento em banho-maria (Thermomix, 18 BU) a 95°C por 15 min. Em seguida, os extratos foram centrifugados a $2.000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi usado para a extração seletiva em solução de NaOH 5 M saturada de NaCl e as aminas extraídas em éter dietílico. Os tubos foram misturados por 10 min e as fases (aquosa e etérea) separadas por centrifugação a $2.000 \times g$ por 5 min. A fase de éter foi transferida para um tubo de ensaio contendo HCl 0,1 M e misturada por 10 min. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados a $2.000 \times g$ por 5 min para a separação das fases. A maior parte da fase de éter foi removida e o remanescente evaporado sob uma corrente de ar. A fase de HCl 0,1M foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (Saker-Sampaio, 1997).

O sistema cromatográfico consistiu em coluna Waters PhaseSep Spherisorb S5 ODS B (4,6 x 250 mm) e fase móvel constituída de tampão fosfato 50 mM-acetonitrila (94:6, v/v) (Bartha et al., 1989) contendo 5 mM de ácido pentassulfônico, como par iônico, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ usando uma bomba (Amersham AKTAbasic 10, modelo P-900). Alíquotas de 100 μL da fase de HCl 0,1M foram injetadas manualmente usando um injetor de amostras Rheodyne 7210 (Hamilton Co.). O detector (Amersham AKTAbasic 10, modelo UV 900) foi ajustado em 271 nm e os cromatogramas registrados pelo Unicorn Software, versão 5.2.

Uma solução padrão de histamina em HCl 0,1 N ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) era preparada diariamente. Um padrão constituído de histamina foi processado separadamente e em combinação com 1 g de alga (co-cromatografia), de forma idêntica às amostras de algas, de modo que 10 μg fossem

injetados na coluna. Esse procedimento foi usado para assegurar a extração e detecção de histamina nos extratos em que ela foi adicionada intencionalmente. A presença de histamina nos extratos de alga foi observada com base no tempo de retenção da histamina padrão (Sigma) e na co-cromatografia.

Resultados e Discussão

A identificação da histamina foi feita comparando-se o tempo de retenção do dicloridrato de histamina padrão (Sigma), igual a $8,24 \pm 0,05$ min ($n = 15$), com aquele do composto presente nas algas e eluído em aproximadamente 8 min, assim como com base na co-cromatografia.

A ocorrência de histamina foi verificada em apenas duas espécies de algas marinhas das quinze estudadas neste trabalho. As rodofíceas *Botryocladia occidentalis* e *Cryptonemia crenulata* apresentaram um composto com tempo de retenção de, respectivamente, $8,26 \pm 0,03$ min (Figura 1) e $8,27 \pm 0,03$ min (Figura 2), os quais foram considerados preliminarmente como histamina. O extrato de *C. crenulata* exibiu um pico com área aproximadamente 20 vezes maior que o observado em *B. occidentalis*.

Neste trabalho, os compostos encontrados nos extratos de algas marinhas com tempo de retenção de aproximadamente 8 min foram considerados preliminarmente como histamina. A co-cromatografia (alga + padrão) foi procedida de modo que, se o composto presente na alga fosse histamina, ele deveria ser eluído junto com o padrão e a área do pico correspondente à alga + padrão deveria ser maior do que a área do pico da alga sozinha.

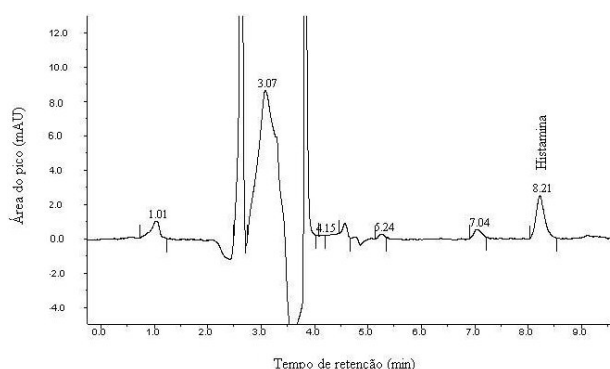


Figura 1 - Cromatograma do extrato da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*.

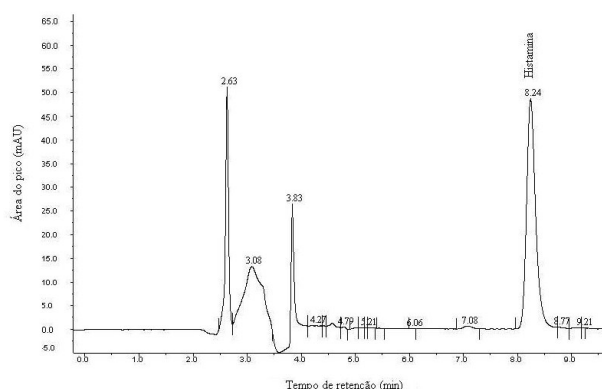


Figura 2 - Cromatograma do extrato da alga marinha vermelha *Cryptonemia crenulata*.

As co-cromatografias de *B. occidentalis* e *C. crenulata* estão apresentadas nas Figuras 3 e 4, onde é possível observar a coincidência dos tempos de retenção e o aumento discreto da área do pico, tendo em vista que apenas $10 \mu\text{g}$ foram adicionados.

A injeção de $100 \mu\text{L}$ da solução padrão de dicloridrato de histamina ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em dias consecutivos ($n = 15$) revelou que o desvio padrão relativo do tempo de retenção foi igual a $0,66\%$, enquanto que para injeções no mesmo dia ($n = 6$), esse valor variou de 0 a $1,96\%$.

A histamina ocorre em uma ampla variedade de plantas superiores, mas sua presença em algas marinhas tem sido muito pouco relatada na literatura. A ocorrência e distribuição de histamina em diferentes partes do talo da

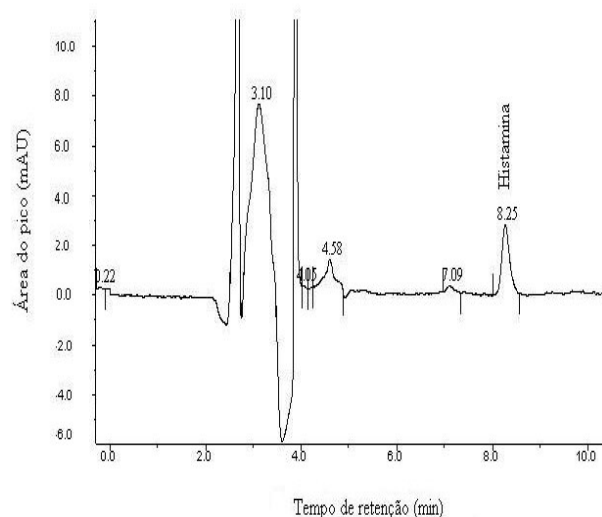


Figura 3 - Co-cromatograma do extrato da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* + $10 \mu\text{g}$ de dicloridrato de histamina (H-7250, Sigma).

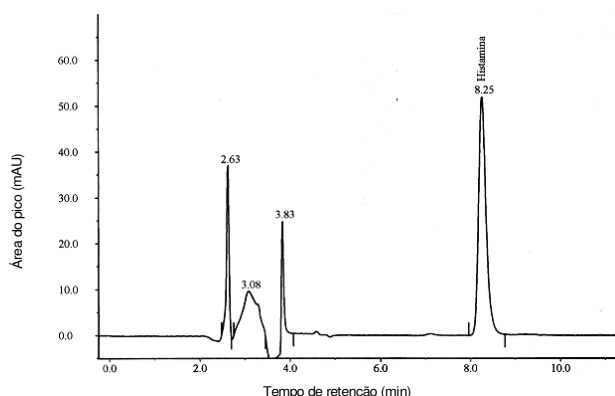


Figura 4 - Co-cromatograma do extrato da alga marinha vermelha *Cryptonemia crenulata* + 10µg de dicloridrato de histamina (H-7250, Sigma).

Furcellaria lumbricalis (gametófitas e tetraesporófitas) foi estudada e a quantidade relativamente alta de histamina encontrada no material (60 a 500 µg.g⁻¹ peso fresco) foi associada à proteção natural contra organismos herbívoros, para que a alga garanta sua sobrevivência até atingir a maturidade (Barwell, 1989; Barwell, 1994).

A ocorrência de histamina está registrada apenas na rodófitas *F. lumbricalis* (Barwell, 1979). Entretanto, outras aminas biogênicas foram detectadas em algas marinhas. Guven et al. (1970) encontrou hordenina na alga vermelha *Phyllophora nervosa*. Mais tarde, Kawauchi & Sasaki (1978) alegaram o primeiro registro da presença de uma alquilamina fenólica em algas marinhas. Eles isolaram e identificaram hordenina da alga vermelha *Ahnfeltia paradoxa*. A hordenina também foi isolada de algas provenientes de diferentes localidades da Inglaterra e Irlanda. A quantidade dessa amina na alga vermelha *Gigartina stellata* variou de 1,20 ± 0,08 a 4,97 ± 0,60 µg.g⁻¹ peso seco (Barwell & Blunden, 1981) e em *Mastocarpus stellatus*, outra alga vermelha, ficou entre 600 e 5.500 µg.g⁻¹ peso seco (Barwell et al., 1989). Saker-Sampaio (1997) coletou amostras mensais, em Southsea (Inglaterra), da feocícea *Laminaria digitata* e da rodófitas *Palmaria palmata*, mas a presença de hordenina não foi observada em nenhuma amostra ao longo de 12 meses.

A tiramina foi encontrada na microalga verde *Scenedesmus acutus* (Rolle et al., 1977), nas macroalgas vermelhas *Chondrus crispus*, *Polysiphonia urceolata* e na parda *Laminaria saccharina* (Steiner & Hartmann, 1968; Hartmann & Auferman, 1973; Kneifel et al., 1977). Saker-Sampaio (1997) investigou a presença de tiramina em *L. digitata* e *P. palmata*, não tendo encontrado nenhum componente similar à tiramina em *L. digitata*, mas em *P. palmata* a quantidade variou de <1 a 85 µg.g⁻¹ peso fresco.

Conclusões

1. Das quinze espécies de macroalgas marinhas estudadas, treze não apresentaram histamina. Apenas duas espécies de macroalgas marinhas vermelhas, *Botryocladia occidentalis* e *Cryptonemia crenulata* apresentaram um composto com tempo de retenção semelhante ao da histamina padrão.
2. Na co-cromatografia (alga + padrão), o composto presente na alga apresentou um tempo de eluição igual ao padrão e área do pico ligeiramente maior do que àquela correspondente ao extrato da macroalga sem o padrão, tendo em vista que apenas 10mg foram adicionados.
3. O extrato de *C. crenulata* exibiu um pico em aproximadamente 8 min com área cerca de 20 vezes maior que o observado em *B. occidentalis*.

Referências Bibliográficas

- BARTHA, A.; VIGH, G.; STAHLBERG, J. Rationalization of selection of the type of the organic modifier(s) for selectivity optimization in reverse-phase ion-pair chromatography. **Journal of Chromatography**, v.485, p.403-419, 1989.
- BARWELL, C. Distribution of histamine in the thallus of *Furcellaria lumbricalis*. **Journal of Applied Phycology**, v.1, p.341-344, 1989.
- BARWELL, C. J. Pharmacologically-active amines in some marine algae and algal food products. **Journal of Home & Consumer Horticulture**, New York, v.1, n.1, p.77-82, 1994.
- BARWELL, C. J. The occurrence of histamine in the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. **Botanica Marina**, v.22, n.6, p.399-401, 1979.
- BARWELL, C. J.; BLUNDEN, G. Hordenine from the red alga *Gigartina stellata*. **Journal of Natural Products**, v.44, n.4, p.500-502, 1981.
- BARWELL, C. J.; CANHAM, C. A.; GUIRY, M. D. Hordenine content of the marine alga *Mastocarpus stellatus* and the algal food product carrageen. **Phytotherapy Research**, v.3, n.2, p.67-69, 1989.
- BESTER, B. H.; MOSTERT, J. F. Biogenic amines in food. **The South African Journal of Food Science and Nutrition**, v.5, n.4, p.103-111, 1993.
- CANNELL, R. J. P. Algae as a source of biologically active products. **Pesticide Science** v.39, n.2, p.147-153, 1993.
- CINQUINA, A. L.; LONGO, F.; CALI, A.; DE SANTIS, L.; BACCELLIERE, R.; COZZANI, R. Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. **Journal of Chromatography A**, v.1032, n.1-2, p.79-85, 2004.

- DRAISCI, R.; GIANNETTI, L.; BORIA, P.; LUCENTINI, L.; PALLESCI, L.; CAVALLI, S. Improved ion chromatography-integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented foods. **Journal of Chromatography A**, v.798, n.1-2, p.109-116, 1998.
- GUVEN, K. C.; BORA, A.; SUNAM, G. Hordenine from alga *Phyllophora nervosa*. **Phytochemistry**, v.9, n.8, p.1893, 1970.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, v.5, n.2, p.42-49, 1994.
- HARTMANN, T.; AUFERMAN, B. Physiology of amine formation in marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **Marine Biology**, v.21, n.1, p.70-74, 1973.
- IZQUIERDO-PULIDO, M. L.; VIDAL-CAROU, M. C.; MARINE-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with postcolumn derivatization. **Journal of AOAC International**, v.76, n.5, p.1027-1032, 1993.
- KALAC, P.; SVECOVA, S.; PELIKANNOVA, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chemistry**, v.77, n.3, p.349-351, 2002.
- KAWAUCHI, H.; SASAKI, T. Isolation and identification of hordenine, *p*-(2-dimethylamino)ethyl-phenol from *Ahnfeltia paradoxa*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.44, n.2, p.135-137, 1978.
- KNEIFEL, H. Amines in algae. In: HOPPE, H.A.; LEVRING, T.; TANAKA, Y. **Marine algae in pharmaceutical science**. Berlin: Walter de Gruyter. 1979. p.265-401.
- KNEIFEL, H.; MEINICHE, M.; SOEDER, C. Analysis of amines in algae by high-performance liquid chromatography. **Journal of Phycology**, v.13, p.36-36, 1977. Suppl. S.
- KRIZEK, M.; VACHA, F.; VORLOVA, L.; LUKASOVA, J.; CUPAKOVA, S. Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. **Food Chemistry**, Oxford, v.88, n.2, p.185-191, 2004.
- LEITÃO, M. C.; MARQUES, A. P.; SAN ROMÃO, M. V. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. **Food Control**, Moines, v.16, n.3, p.199-204, 2005.
- LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: data from Belgian samples. **Food Chemistry**, v.89, n.4, p.519-525, 2005.
- MARTELLI, A.; ARLORIO, M.; TOURN, M. L. Determination of amines and precursor amino acids in gorgonzola cheese by ion-pair HPLC without derivatization. **La Rivista di Scienza dell'Alimentazione**, v.22, n.3, p.261-270, 1993.
- MORET, S.; SMELA, D.; POPULIN, T.; CONTE, L. S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. **Food Chemistry**, v.89, n.3, p.355-361, 2005.
- PATANGE, S.B.; MUKUNDAN, M.K.; KUMAR, K.A. A simple and simple method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. **Food Control**, v.16, n.5, p.465-472, 2005.
- ROLLE, I.; HOBUCHER, H.E.; KNEIFEL, H.; PASCHOLD, B.; RIEPE, W.; SOEDER, C.J. Amines in unicellular green algae. 2. Amines in *Scenedesmus acutus*. **Analytical Biochemistry**, v.77, n.1, p.103-109, 1977.
- SAKER-SAMPAIO, S. **Evaluation of *Palmaria palmata* and *Laminaria digitata* as potential human food products**. 1997. 165 f. Tese (PhD) – University of Portsmouth, Portsmouth.
- SANTOS, M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, n.2-3, p.213-231, 1996.
- SHALABY, A. R. Separation, identification and estimation of biogenic amine in foods by thin-layer chromatography. **Food Chemistry**, v.49, n.3, p.305-310, 1994.
- SMITH, T. A. Amines in food. **Food Chemistry**, v.6, n.3, p.169-200, 1980.
- STEINER, M.; HARTMANN, T. The occurrence and distribution of volatile amines in marine algae. **Planta**, v.79, n.2, p.113-121, 1968.
- STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. **Journal of Food Protection**, v.54, n.6, p.460-470, 1991.
- STRAUB, B.; SCHOLLENBERGER, M.; KICHERER, M.; LUCKAS, B.; HAMMES, W. P. Extraction and determination of biogenic amines in fermented sausages and other meat products using reversed-phase-HPLC. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v.197, n.3, p.230-232, 1993.
- TEN BRINK, B. T.; MAMINK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; HUISIN'I VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, n.1, p.73-84, 1990.
- TSAI, Y. H.; KUNG, H. F.; LEE, T. M.; CHEN, H. C.; CHOU, S. S.; WEI, C. I.; HWANG, D. F. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. **Food Control**, v.16, n.7, p.579-585, 2005.