

Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados¹

Determination of histamine using reversed-phase high performance liquid chromatography in canned tuna and sardine

Hellen Araújo Cavalcante de Oliveira², Helaine Cristina Maciel da Silva³, Alexandre Holanda Sampaio⁴,
Francisco Arnaldo Viana⁵ e Silvana Saker-Sampaio⁶

RESUMO

A histamina, 4-(2-aminoetil)imidazol, é uma diamina primária, heterocíclica, formada pela descarboxilação de L-histidina. A histamina endógena tem importante papel em vários processos biológicos normais e anormais, incluindo vasodilatação, anafilaxia e secreção gástrica. O acúmulo de aminas nos alimentos depende da disponibilidade de aminoácidos livres, da presença de microrganismos com atividade descarboxilante, da existência de condições favoráveis para seu crescimento e da síntese/atividade dessas enzimas. Muitos microrganismos descarboxilase-positivos podem fazer parte da microbiota do alimento, ou por terem sido introduzidos para obtenção de produtos fermentados, ou por terem contaminado o alimento antes, durante ou depois de sua elaboração. Normalmente, as aminas biogênicas estão presentes em baixas concentrações nos alimentos, entretanto, concentrações elevadas podem ocorrer naqueles obtidos por fermentação, como queijos maturados, vinhos, cervejas, salsichas, chucrute e pescados, ou naqueles produzidos sob condições higiênicas inadequadas. O objetivo deste trabalho foi detectar e quantificar o teor de histamina em atum e sardinha enlatados, adquiridos no comércio varejista de Fortaleza-Ceará por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa. Foi observada a presença de histamina em todas as amostras analisadas. Os teores variaram de 1,57 a 1.023,16mg/kg em atum e de 3,35 a 346,44mg/kg em sardinha. Teores acima de 100mg de histamina/kg foram detectados em 55% das amostras de atum e em 13,33% das de sardinha. Os elevados teores encontrados nos produtos analisados, teoricamente, são capazes de causar sintomas de intoxicação, sugerindo a necessidade de melhorar a qualidade da matéria-prima, assim como as práticas de manuseio e fabricação.

Termos para indexação: Qualidade, pescado enlatado, aminas biogênicas.

ABSTRACT

Histamine, 4-(2-aminoethyl)imidazole, is a primary amine arising from the decarboxylation of L-histidine. Endogenous histamine plays important roles in a number of normal and abnormal biological processes including vasodilatation, anaphylaxis, and gastric acid secretion. Prerequisites for the formation of biogenic amines in foods are the availability of free amino acids, the presence of decarboxylase-positive microorganisms, conditions that allow bacterial growth, and decarboxylase activity. Decarboxylase-positive microorganisms may constitute part of the associated population of the food or may be introduced by contamination before, during or after processing of the food. Biogenic amines are naturally present at low concentrations in many foods. However, high concentrations of biogenic amines may be present in fermented foods, such as ripened cheese, wine, beer, and in some meat and fish products. In other cases, concentrations may be high because of unfavorable hygiene during food processing. The objective of this work was to detect and quantify histamine content in canned tuna and sardine, available at the retail market in Fortaleza, Ceará, Brazil, by reversed-phase-HPLC. The presence of histamine was detected in all samples. Their contents ranged from 1.57 to 1,023.16mg/kg and from 3.35 to 346.44mg/kg in tuna and sardine, respectively. Contents over 100mg histamine/kg were detected in 55% of tuna samples and in 13.33% of sardine samples. Theoretically, the high content of histamine may cause poisoning symptoms after being consumed. It has been suggested to improve raw material quality and handling and/or manufacturing practices in order to assure good quality of canned seafood products available in the market.

Index terms: Food quality, canned fishery products, biogenic amines

¹ Recebido para publicação em 13/05/2004. Aprovado em 02/08/2004. Parte de Dissertação apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal do Ceará, para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

² Médico Veterinário, M.Sc. em Engenharia de Pesca.

³ Engenheiro de Pesca, M.Sc. em Engenharia de Pesca.

⁴ Engenheiro de Pesca, Ph.D., Professor Adjunto Dep. de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Bolsista do CNPq. E-mail: sampaioa@ufc.br

⁵ Químico, D.Sc., Professor Adjunto do Dep. de Química da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. E-mail: arnaldo@hotmail.com

⁶ Engenheiro de Pesca, Ph.D., Professor Adjunto do Dep. de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. E-mail: sakersil@ufc.br

Introdução

O termo aminas biogênicas é usado para as aminas não-voláteis como cadaverina, espermidina, espermina, histamina, hordenina, putrescina, tiramina, triptamina, formadas pela descarboxilação de seus aminoácidos precursores (Bester e Mostert, 1993; López-Sabater et al., 1994; Lima e Glória, 1999). Várias aminas biogênicas (serotonina, histamina e tiramina) desempenham importantes funções fisiológicas no homem e em outros animais, atuando como hormônios no sistema nervoso e nos processos de digestão e de síntese protéica. Devido à integração das aminas biogênicas no metabolismo humano, existem mecanismos para seu controle e degradação; esta última envolve diferentes rotas como desaminação oxidativa com monoamina oxidases, *N*- e *O*-metilação com transferases e adenosilmetionina, *N*-acetilação com *N*-acetiltransferases e acetil CoA como cofator e hidroxilação com hidroxilases e NAD⁺ como cofator (Peters e Kunz, 1995).

A histamina [4-(2-aminoetil)imidazol], diamina primária e heterocíclica formada pela descarboxilação de L-histidina, é encontrada naturalmente em muitos alimentos, principalmente naqueles obtidos por processos de fermentação, como vinhos, queijos, salsichas fermentadas, chucrute e pescado (Smith, 1981; Ten Brink et al., 1990; Stratton et al., 1991; Hálász et al., 1994; Bersot et al., 1996). Sua formação nos alimentos envolve a ação de histidina-descarboxilase sintetizada por bactérias dos gêneros *Proteus*, *Klebsiella*, *Morganella*, entre outros (Leitão et al., 1983). No homem, sob circunstâncias normais, as aminas exógenas absorvidas através da ingestão de alimentos são rapidamente inativadas pelas monoamina oxidases (MAO A e B) ou por conjugação (Smith, 1981; Barwell e Canham, 1988; Dostert et al., 1989; Hsu et al., 1989; Weyler et al., 1990; Shih et al., 1994). Espécies como atum, bonito e cavalinha manuseadas e/ou processadas de forma inadequada podem acumular níveis elevados de histamina, sendo responsáveis por casos severos de intoxicação alimentar (Arnold e Brown, 1978; Ababouch et al., 1991). O consumo de peixes pertencentes às famílias Scombridae (atum, cavala, bonito) e Scomberesocidae (peixes-agulha) tem sido associado ao aparecimento de efeitos tóxicos atribuídos à histamina. Contudo, peixes de outras famílias como os da Arripidae (Bremer et al., 2003), e mesmo outros alimentos, têm freqüentemente sido implicados, e por esta razão o termo intoxicação histamínica tem sido usado em

substituição ao envenenamento escombrídeo (Taylor, 1986). Espécies mais freqüentemente associadas com intoxicação histamínica contêm naturalmente altos níveis de histidina livre em seus tecidos, cuja conversão em histamina é realizada por microrganismos capazes de sintetizar histidina-descarboxilase (Halász et al., 1994; Bremer et al., 2003).

No Brasil, existem poucas informações sobre a quantidade de histamina em peixes *in natura* e industrializados. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo detectar e quantificar o teor de histamina em atum e sardinha enlatados, usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Material e Métodos

Os produtos enlatados de atum e sardinha, perfazendo um total de 85 latas de quatro fabricantes nacionais, foram adquiridos no comércio varejista de Fortaleza, Ceará, Brasil, tendo sido estocados à temperatura ambiente e somente abertos antes das determinações analíticas. As embalagens estavam íntegras e os produtos dentro do prazo de validade estipulado pelos fabricantes. Os enlatados de atum, das marcas A, B, C e D, incluíram cinco variedades: sólido em água e sal, sólido em água e sal *light*, sólido em óleo comestível, ralado em água e sal e ralado em óleo comestível. Foram analisadas 40 latas, sendo 10 da marca A (2 variedades), 15 da marca B (3 variedades), 10 da marca C (2 variedades) e 5 da marca D (1 variedade). As sardinhas enlatadas das marcas A, B e C constaram de seis variedades: sardinha em óleo de soja, em óleo comestível com suco de limão, em molho de tomate temperado, em molho temperado com orégano, em molho com pimenta e ao próprio suco em óleo comestível. Foram analisadas 45 latas, sendo 30 da marca A (6 variedades), 10 da marca B (2 variedades) e 5 da marca C (1 variedade). As análises foram feitas, usando-se sempre 5 latas de cada variedade; as variedades foram determinadas pela disponibilidade dos produtos no mercado varejista.

Acetonitrila, grau HPLC, ácido tricloroacético, ácido bórico, ácido clorídrico, ácido orto-fosfórico 85%, carbonato de sódio, cloreto de sódio, éter dietílico e hidróxido de sódio foram obtidos da Merck. Fosfato de potássio monobásico anidro (P-5379), dicloridrato de histamina (H-7250) e ácido 1-pentassulfônico (P-8199) foram obtidos da Sigma.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura Milli-Q (Millipore).

Em laboratório, as latas foram abertas e o líquido de cobertura foi drenado e descartado. O material sólido foi deixado sobre papel absorvente e, em seguida, macerado manualmente. Cinco amostras de 10g foram homogeneizadas com 35mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/V) por 1 minuto. Este homogenato foi centrifugado a aproximadamente 3.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado re-extraído com 15mL de TCA 5% pelo mesmo procedimento. Os dois sobrenadantes foram combinados e tratados com 55mL de éter dietílico para remoção da gordura. A fase etérea foi completamente removida sob corrente de ar; a fase aquosa teve seu volume completado para 50mL com água Milli-Q e, então, filtrada (Martelli et al., 1993).

Alíquotas de 2mL do extrato bruto foram utilizadas para a extração seletiva da histamina, de uma solução alcalina saturada com sal para éter dietílico e, novamente, para HCl diluído (Saker-Sampaio, 1997).

O conteúdo dos tubos foi misturado por 5 minutos e, em seguida, deixados em repouso para permitir a separação das fases. Da fase etérea superior, foram retirados 7mL, os quais foram transferidos para tubos contendo 2mL de HCl 0,1M e misturados por 5 minutos. A fase etérea superior foi removida sob uma corrente de ar e a fase de HCl 0,1M foi usada para as análises cromatográficas.

O sistema cromatográfico consistiu em coluna Waters Spherisorb S5 ODS 2 (4,6 x 250mm) e fase móvel constituída de tampão fosfato 50mM-acetonitrila (94:6, v/v) (Bartha et al., 1989) contendo 5µM de ácido pentassulfônico, como par iônico, com fluxo de 1mL.min⁻¹. Alíquotas de 50µL da fase de HCl 0,1M foram injetadas manualmente. O detector foi ajustado em 225nm e os cromatogramas registrados pelo Millennium Chromatography Manager Software, versão 2.1.

Uma solução estoque (1mg histamina.mL⁻¹) foi diluída com HCl 0,1M para dar 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125mg.mL⁻¹. Quantidades de histamina, variando de 250 a 2.000mg da base, foram processadas através do procedimento de extração seletiva em 2mL de HCl 0,1M e, então, 50µL foram injetados para as análises cromatográficas. A relação entre a quantidade de histamina processada presente na coluna, variando de 1,5625 a 50mg (assumindo-se 100% de recuperação), e a área do

pico correspondente a cada concentração foi linear ($y = 2.829,5 + 90.332,9 x$; $r = 0,998$; $n = 6$) no intervalo estudado. Assim, o teor de histamina presente nas amostras foi calculado por comparação direta entre a área do pico obtido para 50mg do padrão processado e a área do pico correspondente à histamina das amostras.

O teor de histamina nas amostras estudadas foi calculado segundo Beljaars et al. (1998), utilizando-se a fórmula abaixo, e os resultados foram expressos em mg de histamina por kg de pescado.

$$\text{mg / kg} = \frac{A_a}{A_p} \times C_p \times \frac{100}{m} \times F \times \left\{ 95 + \frac{[U \times (m + 100)]}{100} \right\}$$

onde

A_a – área do pico correspondente à amostra;
A_p – área do pico correspondente ao padrão (histamina);
C_p – concentração da solução padrão (mg/L);
F – fator de diluição pela adição de TCA;
m – massa da amostra; e **U** – umidade (%).

De acordo com Pfeil et al. (1999), o teor de umidade da sardinha enlatada em óleo comestível corresponde a 63,78%, e este valor foi utilizado para o cálculo do teor de histamina em todas as amostras. Os resultados da concentração de histamina nas amostras de pescado enlatado foram submetidos à análise de variância bifatorial, considerando as variedades dos produtos enlatados como tratamentos e as cinco latas analisadas de cada variedade como blocos. Em caso de rejeição da hipótese de nulidade ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, $\alpha = 5\%$ (Centeno, 1999).

Resultados e Discussão

O conteúdo de histamina tem sido estudado por muitos pesquisadores em diferentes alimentos e por diferentes métodos (Soares e Glória, 1994; Hornero-Mendez e Garrido-Fernandez, 1997; Pacheco-Aguilar et al., 1998).

A presença de histamina nas amostras de atum e sardinha enlatadas foi observada tomando como base o tempo de retenção verificado para a histamina padrão, cujo desvio padrão relativo foi 0,245% ($n = 18$). De acordo com Izquierdo-Pulido et al. (1993), as amins biogênicas encontradas em amostras de cervejas, usando HPLC com par iônico,

foram identificadas com base no tempo de retenção das amostras comparado com aquele obtido para a solução padrão, sendo que o desvio padrão relativo variou de 0,35 a 2,65%.

Os teores de histamina encontrados nas amostras de atum enlatado estão apresentados na Tabela 1. A presença de histamina foi verificada em todas as amostras, e seus teores variaram de 1,57 a 1.023,16mg/kg. Somente atum ralado em óleo comestível da marca B apresentou baixa concentração de histamina. Das 40 latas analisadas, 55% (22 latas) apresentaram níveis de histamina acima de

100mg/kg, ultrapassando os limites máximos preconizados pela Portaria Nº 185, de 13 de maio de 1997, do Ministério da Agricultura (Brasil, 1997). A amostra de atum sólido em água e sal da marca C apresentou teor de histamina mais de 8 vezes maior que o permitido na legislação.

A análise de variância bifatorial revelou que, há diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos (produtos das quatro marcas analisadas), mas não entre os blocos (cinco latas de cada produto). Para determinar onde as diferenças ocorreram, o teste de Tukey foi aplicado.

Tabela 1 - Concentração de histamina nas amostras de atum enlatado em diferentes líquidos de cobertura de quatro marcas de fabricação nacional.

Marca	Atum	mg histamina/kg produto	
		Mínimo - máximo	$\bar{x} \pm s (n = 5)$
A	Sólido em óleo comestível	51,17 – 111,35	87,75 \pm 24,74 ^a
A	Sólido em água e sal <i>light</i>	63,80 – 224,09	100,81 \pm 69,32 ^a
B	Sólido em água e sal	73,14 – 178,70	118,68 \pm 42,17 ^a
B	Ralado em óleo comestível	1,57 – 3,58	2,48 \pm 0,75 ^a
B	Ralado em água e sal <i>light</i>	50,04 – 118,15	68,28 \pm 28,71 ^a
C	Sólido em água e sal	518,18 – 1.023,16	830,40 \pm 206,35 ^b
C	Ralado em óleo comestível	104,22 – 255,58	163,37 \pm 62,51 ^a
D	Sólido em óleo comestível	102,78 – 928,82	277,50 \pm 364,36 ^a

Letras minúsculas iguais, não há diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$).

Letras minúsculas diferentes, há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

De acordo com Cruickshank e Williams (1978), peixes com conteúdo de histamina superior a 1mg/g (1.000mg/kg) são normalmente tóxicos. Limites máximos de 100mg de histamina/kg de alimento e de 2mg/L de bebida alcoólica têm sido sugeridos (Taylor, 1986). Para Ten Brink et al. (1990), níveis de histamina entre 500 e 1.000mg/kg de alimento são considerados potencialmente perigosos para a saúde humana e se baseiam nas quantidades encontradas em produtos alimentares envolvidos em casos de intoxicação por histamina.

Entretanto, para considerar os níveis tóxicos das aminas biogênicas é recomendado que, além da concentração da amina (histamina ou tiramina) no alimento incriminado, também se observe a quantidade consumida, a presença de outras aminas e o

teor de amina em outros componentes da dieta. Sempre que se deseja avaliar os níveis tóxicos de histamina em alimentos, é importante levar em consideração o uso de álcool e de certos medicamentos (Rice et al., 1976; Ten Brink et al., 1990; Stratton et al., 1991).

Taylor e Lieber (1978) mostraram que 99% das amostras de atum enlatado apresentavam níveis de histamina inferiores a 25mg/100g e concluíram que estavam abaixo dos limites considerados toleráveis. A máxima quantidade encontrada foi de 31,5mg/100g, mas a média ficou em 3,6mg/100g. Nosanchuk et al. (1982) relataram um caso de intoxicação histamínica por consumo de atum fresco em Nova Iorque, tendo encontrado 335mg histamina por 100g do material suspeito, utilizando a técnica

de cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

Vários tipos de pescado enlatados foram analisados quanto ao teor de aminas biogênicas por HPLC. Yen e Hsieh (1991) encontraram histamina em atum, bonito, cavala, enguia, lula e anchova, sendo o mínimo de 0,50mg/g verificado em enguia, e o máximo de 31,57mg/g, em anchova.

Rogers e Staruszkiewicz (1997) analisaram o teor de histamina em atum enlatado e *mahi-mahi* cru congelado pelo método fluorométrico, descrito pela AOAC, mas com pequenas modificações. Os valores médios de histamina variaram de 5,6 a 158,4mg/kg, com desvio padrão relativo variando de 3,6 a 21,4% e recuperação de 85 a 125% em atuns grandes contendo 57mg histamina/kg. A recuperação da histamina nas amostras de filés de cavala e anchova *in natura* foi de 99 e 98%, respectivamente (Beljaars et al., 1998).

Alguns trabalhos sugerem a utilização da histamina como índice de frescor de pescado (Ferencik, 1970; Ienistea, 1973; López-Sabater et al., 1996; Chakrabarti, 1998; Shakila et al., 2003). A avaliação da quantidade de histamina tem sido usada como rotina nos procedimentos de controle de qualidade adotados pela maioria das indústrias pesqueiras de conserva de atum (Taylor e Lieber, 1978). Contudo, Bersot et al. (1996) indicam que não há uma perfeita correlação entre produção de histamina e alterações sensoriais do pescado, sendo possível concluir que a histamina isoladamente não pode ser considerada um indicador universal de decomposição do pescado.

As concentrações de histamina nas amostras de sardinha enlatada, examinadas no presente trabalho, estão apresentadas na Tabela 2. A histamina foi detectada em todas as amostras de sardinha analisadas, com teores variando de 3,35 a 346,44mg/kg do produto. O desvio padrão de algumas médias foi muito elevado; observação também encontrada por Ababouch et al. (1986); Veciana-Nogues et al. (1989) e Soares e Glória (1994), que atribuíram, assim como Taylor e Lieber (1978), ao fato de haver diferenças nos níveis de histamina de indivíduo para indivíduo e também em diferentes partes do peixe. Os teores de histamina podem ser bem variados dentro de um mesmo lote. Bersot et al. (1996) acreditam que isto ocorre porque o frio não é distribuído igualmente sobre o pescado estocado nos barcos, câmaras frias e nas demais etapas do processamento tecnológico, fazendo com que uns fiquem resfriados adequadamente, enquanto outros, permaneçam em condições favoráveis ao crescimento bacteriano e, conseqüentemente, à produção de histamina.

Das 45 latas de sardinha analisadas neste trabalho, apenas 13,33% (6 latas) apresentaram níveis de histamina superiores a 100mg/kg, que é o nível máximo permitido pela legislação brasileira (Brasil, 1997). Todavia, de acordo com análise de variância bifatorial, as concentrações de histamina nas variedades das diferentes marcas de sardinha examinadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$).

Segundo Soares e Glória (1994), os ingredientes utilizados na elaboração do produto podem

Tabela 2 - Concentração de histamina nas amostras de sardinha enlatada em diferentes líquidos de cobertura de três marcas de fabricação nacional.

Marca	Sardinha	mg histamina/kg produto	
		Mínimo - máximo	$\bar{x} \pm s (n = 5)$
A	Em óleo de soja	24,28 – 158,16	69,58 ± 55,67
A	Em óleo de soja com limão	28,87 – 128,12	68,08 ± 46,42
A	Em molho de tomate temperado	32,70 – 346,44	112,75 ± 133,57
A	Em molho temperado com orégano	28,14 – 40,52	32,78 ± 4,69
A	Filé em óleo de soja	3,35 - 51,86	26,10 ± 24,00
A	Filé em óleo de soja com pimenta	52,36 - 84,69	70,08 ± 12,84
B	Em óleo comestível com pimenta	47,07 – 55,41	50,16 ± 3,39
B	Ao próprio suco em óleo comestível	26,86 – 45,96	33,85 ± 7,16
C	Em óleo comestível	30,60 – 108,50	51,99 ± 32,23

ser considerados uma fonte de contaminação microbiana. A adição de molho de tomate e de suco de limão deveria promover uma redução do pH do líquido de cobertura e prevenir a formação de histamina, considerando que o pH ótimo para sua formação encontra-se no intervalo entre 5,1 a 6,5 (Arnold e Brown, 1978). Entretanto, ao contrário do que foi encontrado por Veciana-Nogues et al. (1989) e Wootton et al. (1989), as sardinhas da marca A enlatadas em molho de tomate temperado, em óleo de soja e em óleo de soja com limão não apresentaram valores inferiores às demais. Considerando que a histamina é formada antes do processamento térmico e que o líquido de cobertura é adicionado ao produto imediatamente antes do aquecimento, não faz sentido relacionar qualquer influência do líquido de cobertura sobre a concentração de histamina no produto enlatado.

Taylor e Lieber (1978) encontraram um teor médio de histamina igual a 0,79mg/100g, com variação de 0,31 a 1,38mg/100g em dez amostras de sardinha enlatada. A concentração de histamina (mg/100g) também foi determinada em diferentes produtos. Em amostras de albacora e cavala enlatadas, a variação observada ficou entre 0,66 e 2,21, com média igual a 1,45 (n = 11) e entre 1,2 e 4,5, com média de 2,25 (n = 18), respectivamente. Em amostras de lagosta congelada, a variação ficou entre 0,09 e 0,27, com média 1,16 (n = 4). Amostras de siri, marisco e ostra *in natura* apresentaram valores de histamina que oscilaram de 0,05 a 0,24, com média 0,13, de 0,06 a 0,32, com média igual a 0,19 e de 0,04 a 0,64, com média igual a 0,18, respectivamente. Os resultados comprovaram que 99% das amostras apresentavam níveis inferiores a 25mg/100g, com valores médios iguais a 3,58mg/100g e máximo de 31,5mg/100g. Desse modo, os autores concluíram que os níveis de histamina estavam muito abaixo dos limites considerados toleráveis.

Segundo Leitão et al. (1983), os níveis de histamina detectados em sardinhas enlatadas variaram de 2,95 a 3,75mg/100g. Em Belo Horizonte, Soares e Glória (1994) analisaram 191 amostras de peixe enlatado, constando de sardinha, filé de sardinha, sardinha em pasta, atum, bonito, chicharro e anchova, dentre as quais 86% apresentaram níveis detectáveis de histamina que variaram de 0,01 a 3,98mg/100g. As amostras de sardinha em óleo apresentaram de 0,14 a 1,43mg de histamina/100g. Em um estudo realizado em Marrocos, Ababouch et al. (1986) encontraram histamina em todas as amostras de sardinhas enlatadas analisadas, sendo que o

teor estava acima de 100mg/100g em 20,8% das amostras.

Luten (1981) analisou produtos de pescado enlatados e encontrou índices que variaram de <1mg a >10mg/100g. Apenas 13% das latas analisadas exibiram valores acima de 10mg/100g. Taylor e Woychik (1982) encontraram teores de histamina entre 0,31 e 1,38mg/100g com média igual a 0,79mg/100g.

Yamanaka (1990) estudou as poliaminas como índices potencialmente úteis para avaliação do estado de frescor de pescado. Sardinha *in natura* apresentou teor inicial de histamina igual a 8,5mg/100g, aumentando para 241mg/100g ao final de 10 dias de estocagem a 5°C e para 387mg/100g após 3 dias a 20°C. Rodriguez-Jerez et al. (1994) afirmam que além da espécie de pescado e da presença de microrganismos capazes de sintetizar enzimas que descarboxilam a histidina livre, a temperatura e a manipulação inadequadas também são responsáveis pela ocorrência de histamina.

Veciana-Nogues et al. (1989) estudaram a quantidade de histamina e tiramina por espectrofluorometria em amostras de anchovas semipreservadas e em amostras de atum, sardinha, cavala e arenque enlatados, tendo verificado uma ampla variação no conteúdo das aminas estudadas para os vários tipos de produtos e também entre amostras do mesmo tipo. O valor máximo, 219,20mg de histamina/kg, foi observado em uma amostra de anchova semipreservada em óleo. Em atum, sardinha, cavala e arenque enlatados, o conteúdo de histamina variou de 1,35 a 30,95mg/kg. As quantidades de histamina e tiramina mais elevadas nos produtos semipreservados, comparadas com aquelas observadas nos produtos enlatados talvez possam ser explicadas pelas características do processo de produção das anchovas que inclui um período de maturação que envolve microrganismos, os quais podem produzir as duas aminas. Desse modo, os autores sugeriram que os produtos semipreservados sejam estocados sob refrigeração para evitar a formação de histamina. Nos produtos enlatados, as elevadas quantidades de aminas biogênicas só podem ser explicadas pelo uso de matérias-primas de baixa qualidade.

No presente trabalho, os teores de histamina encontrados nas amostras de sardinhas foram mais baixos do que aqueles referentes às amostras de atum. Segundo Veciana-Nogues et al. (1989), nas amostras estudadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os produtos enlatados de

atum e sardinha. Entretanto, alguns pesquisadores espanhóis têm encontrado maiores concentrações de histamina em atum enlatado do que em sardinha enlatada.

Os casos de intoxicação por histamina registrados nos Países Baixos na década de 80 envolveram o consumo de cavala, cujo teor de histamina variou de 100 a 3.000mg/kg (8 casos) e de arenque e atum (3 casos cada), com níveis de 300 a 1.300mg/kg e de 500 a 8.000mg/kg, respectivamente (Ten Brink et al., 1990).

Produtos fermentados e pastas de pescado contêm altos níveis de histamina. Embora poucas pesquisas tenham sido conduzidas para determinar o conteúdo de aminas biogênicas em produtos fermentados de pescado, Stratton et al. (1991) consideram que a quantidade dessas aminas parece variar bastante. Fardiaz e Markakis (1979) reportaram altos níveis de histamina (64mg/100g) e β -feniletilamina (60mg/100g) e níveis moderados (triptamina - 16,3mg/100g e tiramina - 37,6mg/100g) a baixos (cadaverina - 3,5mg/100g) em pasta de pescado fermentada. Mower et al. (1989) encontraram 0,54mg tiramina/100g de um produto de pescado típico das Filipinas. Os teores de aminas também foram estudados por Wootton et al. (1989), em produtos de pescado de diferentes procedências, que detectaram espermina em arenque salgado e seco das Filipinas (165mg/kg), espermidina em anchovas desidratadas de Hong Kong (176mg/kg) e ostras defumadas da Coréia (20mg/kg) e putrescina (85 a 1.570mg/kg) e cadaverina (62 a 2.940mg/kg) predominantemente encontradas em produtos desidratados. A histamina foi encontrada em cavala salgada enlatada em óleo e *pedah* (um produto salgado e seco) frito da Malásia, anchovas desidratadas de Hong Kong e lulas desidratadas, pasta de camarão e arenque salgado e seco das Filipinas, com níveis variando de 7 a 803mg/kg.

A presença de histamina em alimentos processados pelo calor, inclusive naqueles considerados comercialmente estéreis, comprova sua termorresistência (Murray et al., 1982). Além de a maioria das aminas ser estável ao calor, algumas descarboxilases permanecem ativas mesmo após a pasteurização. Assim, a intoxicação histamínica é muito séria, tendo em vista a impossibilidade de se controlar os níveis de histamina nos produtos esterilizados, considerados seguros do ponto de vista sanitário, já que uma vez formada, ela não será afetada durante o processamento e podendo até aumentar com a estocagem (Ten Brink et al., 1991).

Os elevados teores de histamina observados nas amostras de atum e sardinha enlatadas, examinadas neste trabalho, teoricamente são capazes de causar sintomas de intoxicação, sugerindo, portanto, a necessidade de intensificar o controle de qualidade da matéria-prima, assim como das práticas de manuseio e fabricação com o objetivo de garantir a segurança de produtos enlatados encontrados no mercado nacional.

Referências Bibliográficas

- ABABOUC, L.; AFILAL, M. E.; BENABDELJELIL, H.; BUSTA, F. F. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.26, p.297-306, Jun. 1991.
- ABABOUC, L.; ALAOUI, M. M.; BUSTA, F. F. Histamine levels in commercially processed fish in Marocco. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.49, n.11, p.904-908, Nov. 1986.
- ARNOLD, H. S.; BROWN, D. W. Histamine (?) toxicity from fish products. **Advances in Food Research**, San Diego, v.24, p.113-154, 1978.
- BARTHA, A.; VIGH, G.; STAHLBERG, J. Rationalization of the selection of the type of the organic modifier(s) for selectivity optimization in reversed-phase ion-pair chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.485, p.403-419, Dec. 1989.
- BARWELL, C. J.; CANHAM C. A. A method for stabilisation of intestinal monoamine oxidase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.40, p.217-218, Mar. 1988.
- BELJAARS, P. R., VAN DIJK, R., JONKER, K. M.; SCHOUT, L. J. Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut and wine: Interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v.81, n.5, p.991-998, Sep-Oct. 1998.
- BERSOT, L. S.; SÃO CLEMENTE, S. C.; SANTOS, N. N. Avaliação dos teores de histamina em sardinha enlatada (*Sardinella aurita* Valenciennes, 1847). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.45, p.38-43, 1996.

- BESTER, B. H.; MOSTERT, J. F. Biogenic amines in food. **The South African Journal of Food Science and Nutrition**, Sandton, v.5, n.4, p.103-111, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 185 de 13 de maio de 1997. Define o limite tolerável de histamina em peixes no Brasil. Disponível em <http://200.252.165.21/sda/dipoa/portaria_185.htm>. Acesso em: 30 ago. 2002.
- BREMER, P. J.; FLETCHER, G. C.; OSBORNE, C. **Scombrototoxin in seafood**. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, May 2003, p.1-9.
- CENTENO, A. J. **Curso de estatística aplicada à biologia**. 2. ed. Goiânia: Ed da UFG, 1999. 234p.
- CHAKRABARTI, R. Shelf-life and histamine content of ten species of fish stored at tropical ambient temperature. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.35, n.1, p.62-65, Jan-Feb. 1998.
- CRUICKSHANK, J. G.; WILLIAMS, H. R. Scombrototoxic fish poisoning. **British Medical Journal**, London, v.2, n.6139, p.739-740, 1978.
- DOSTERT, P. L.; STROLIN-BENEDETTI, M.; TIPTON, K. F. Interactions of monoamine oxidase with substrates and inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, New York, v.9, n.1, p.45-89, Jan-Mar. 1989.
- FARDIAZ, D.; MARKAKIS, P. Amines in fermented fish paste. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.5, p.1562-1563, 1979.
- FERENCIK, M. Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in flesh of some marine fishes. **Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology**, Prague, v.14, n.1, p.52-60, 1970.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v.5, n.2, p.42-49, Feb. 1994.
- HORNERO-MENDEZ, D.; GARRIDO-FERNANDEZ, A. Rapid high-performance liquid chromatography analysis of biogenic amines in fermented vegetable brines. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.4, p.414-419, 1997.
- HSU, Y. P.; POWELL, J. F.; SIMS, K. B.; BREAKEFIELD, X. O. Molecular genetics of monoamine oxidases. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v.53, n.1, p.12-18, 1989.
- IENISTEA, C. Significance and detection of histamine in food. In: HOBBS, B. C., CHISTIAN, J. H. B. (Eds). **The Microbiological safety of food**. London: Academic Press, 1973. p.327-343.
- 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**, Gaithersburg, v.76, n.5, p.1027-1032, 1993.
- LEITÃO, M. F. F.; BALDINI, V. L. S.; UBOLDI-EIROA, M. N.; DESTRO, M. T. Bactérias produtoras de histamina em pescado de origem marinha. **Coletânea ITAL**, Campinas, v.13, p.83-98, 1983.
- LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.33, n.1, p.70-79, 1999.
- LÓPEZ-SABATER, E. I.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; MORA-VENTURA, M. T. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.4, p.318-323, 1994.
- LÓPEZ-SABATER, E. I.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; MORA-VENTURA, M. T. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.2, p.167-174, 1996.
- LUTEN, J. B. An automated fluorimetric method for determination of histamine in canned fish products. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, n.3, p.958-959, 1981.
- 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**, Roma, v.22, n.3, p.261-270, 1993.
- MOWER, H. F.; BHAGAVAN, N. V.; PONTIUS, E. B.; MCDERMOTT, J. F. Tyramine content of Asian

and Pacific foods determined by high-performance liquid-chromatography. **Food Chemistry**, Oxford, v.31, n.4, p.251-257, 1989.

MURRAY, C. K.; HOBBS, G.; GILBERT, R. J. Scombrototoxin and scombrototoxin-like poisoning from canned fish. **Journal of Hygiene**, New York, v.88, n.2, p.215-220, 1982.

NOSANCHUK, J. S.; BILDER, B. M.; HENION, J. D. Scombroid fish poisoning. **New York State Journal of Medicine**, Lake Success, v.88, n.2, p.202-203, 1982.

PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SANCHEZ, M. E.; VILLEGAS-OZUNA, R. E.; ROBLES-BURGUENO, R. Histamine quantification in Monterey sardine muscle and canned products from Northwestern Mexico. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.11, p.188-195, 1998.

PETERS, N.; KUNZ, B. Microbial building and degradation of biogenic amines. **Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijks-universiteit Gent.**, Belgium, v.60, n.4a, p.1853-1860, 1995.

PFEIL, E. C.; SANTOS, N. N.; MEDEIROS, S. D.; OLIVEIRA, G. A. Avaliação da qualidade da conserva de sardinha sem pré-cozimento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.60, p.63-67, 1999.

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

RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; SABATER-LOPEZ, E. I.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M.; MORA-VENTURA, M. T., Histamine, putrescine and cadaverine formation in Spanish semipreserved anchovies as affected by time/temperature. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.5, p.993-997, 1994.

ROGERS, P. L.; STARUSZKIEWICZ, W. Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and mahimahi and fluorometric method for histamine (minor modification of AOAC official method 977.13): Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v.80, n.3, p.591-602, May-Jun 1997.

SAKER-SAMPAIO, S. **Evaluation of *Palmaria***

***palmata* and *Laminaria digitata* as potential human food products**. 1997. 165 f. Tese (PhD) - University of Portsmouth, Portsmouth, Inglaterra.

SHAKILA, R. J.; VIJAYALAKSHMI, K.; JEYASEKARAN, G. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. **Food Chemistry**, Oxford, v.82, p.347-352, 2003.

SHIH, J. C.; ZHU, Q. S.; GIMSBY, J.; CHEN, K. Identification of human monoamine oxidase (MAO) A and B gene promoters. **Journal of Neural Transmission**, New York, v.41, p.27-33, 1994.

SMITH, T. A. Amines in food. **Food Chemistry**, Oxford, v.6, n.3, p.169-200, 1981.

SOARES, V. F. M.; GLÓRIA, M. B. A. Histamine level in canned fish available in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.7, n.1/2, p.102-109, 1994.

STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.54, n.6, p.460-470, Jun. 1991.

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

TAYLOR, S. L.; LIEBER, E. R. A survey of histamine levels in commercially processed scombroid fish products. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v.1, p.393-397, 1978.

TAYLOR, S. L.; WOYCHIK, N. A. Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.45, n.8, p.747-751, 1982.

TEN BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.11, n.1, p.73-84, Aug. 1990.

VECIANA-NOGUES, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C.; MARINE-FONT, A. Histamine and tyramine in preserved and semi-preserved fish products. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.6, p.1653-1655, 1989.

WEYLER, W.; HSU, Y. P.; BREAKFIELD, X. O.

Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.47, n.3, p.391–417, 1990.

WOOTTON, M.; SILALAH, J.; WILLS, R. B. H. Amine levels in some Asian seafood products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v.49, n.4, p.503–506, 1989.

YAMANAKA, H. Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. **Food Reviews International**, New York, v.6, n.4, p.591–602, 1990.

YEN, G. C.; HSIEH, C. L. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.1, p.158–160, Jan-Feb. 1991.