



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE GRADUAÇÃO BACHARELADO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PEIXES E  
CRUSTÁCEOS COMERCIALIZADOS EM  
FLORIANÓPOLIS UTILIZANDO A ELETROFORESE  
CAPILAR**

RAFAEL VANDERSON GOMES MANOEL

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis, novembro de 2008

RAFAEL VANDESON GOMES MANOEL

**DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM PEIXES E  
CRUSTÁCEOS COMERCIALIZADOS EM  
FLORIANÓPOLIS UTILIZANDO A ELETROFORESE  
CAPILAR**

Trabalho de conclusão do Curso de Química, executado durante o semestre de 2008.2, apresentado pela disciplina QMC 5512.- Estágio supervisionado II, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

**Coordenador de Estágio:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Inês Maria Costa Brighente  
**Orientador do Estágio:** Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis, SC  
Semestre 2008.2

**Aos meus avós,  
Higino e Carmem.  
A minha namorada,  
Gabriela.  
E a Deus.**

## AGRADECIMENTOS

Obrigado primeiramente a Deus, sem o qual nada disso seria possível.

Obrigado aos professores do departamento de Química da UFSC, que ajudaram em minha formação e que, de alguma forma, ajudaram na minha percepção de mundo, e em especial aos que compõe a banca examinadora.

Obrigado aos amigos de laboratório, Marcel, Melina, pelas ajudas com o equipamento, com esclarecimento de dúvidas, com palavras amigas e com todo apoio que me deram por todo esse tempo juntos.

Obrigado a Ana Carolina, pela ajuda com as correções e por todos os incômodos.

Obrigado ao meu orientador, Gustavo, por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, atenção, apoio, confiança, dor de cabeça. Com toda a certeza a sua contribuição não foi apenas no meu amadurecimento como analítico, como químico, mas no meu crescimento como um todo.

Obrigado aos meus avós, por todo seu sacrifício e apoio incondicional, suas ligações e suas preocupações em todo o tempo que estive fora.

Obrigado a minha mãe, pois sei que ninguém no mundo torceu mais por mim.

Obrigado a Gabriela, que além de competir pela maior torcida, esteve comigo em todos os momentos, nas risadas, no cinema nos finais de noite quando batia o desespero e a saudade, nos abraços, gestos e palavras de carinho, em toda a confiança que depositou em mim, acreditando até mesmo quando eu duvidava.

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE EQUAÇÕES .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Eletroforese Capilar.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1 Instrumentação .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Fluxo eletrosmótico .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Modos de separação .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.1 Eletroforese Capilar em Solução Livre .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Análise de histamina por eletroforese capilar .....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Objetivo geral.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Equipamento .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2. Amostra .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.1. Aquisição da amostra .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.2. Preparo da amostra .....</b>	<b>12</b>
<b>4.3. Método .....</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1. Soluções .....</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1.1. Eletrólito de corrida .....</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1.2. Solução estoque de histamina .....</b>	<b>13</b>
<b>4.4. Figuras de mérito do método .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4.1. Linearidade .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4.2. Calibração por padronização interna .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4.4. Precisão .....</b>	<b>15</b>
<b>4.4.4.1 Repetibilidade (precisão intra ensaio) .....</b>	<b>15</b>
<b>4.4.4.2 Precisão instrumental .....</b>	<b>15</b>
<b>4.4.4.3 Precisão intermediária .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>16</b>

<b>5.1. Desenvolvimento do método .....</b>	<b>16</b>
<b>5.1.1. Determinação da Mobilidade Iônica .....</b>	<b>16</b>
<b>5.1.2. Eletrólito de corrida .....</b>	<b>17</b>
<b>5.1.3. Padrão interno .....</b>	<b>21</b>
<b>5.1.4. Parâmetros da extração .....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Figuras de Mérito do Método .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2.1. Linearidade .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2.3. Precisão .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.3.1. Repetitividade (precisão intra ensaio) .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.3.2. Precisão instrumental .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.3.3. Precisão intermediária (precisão inter ensaio) .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2.4. Exatidão .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3. Resultados das amostras .....</b>	<b>29</b>
<b>5.4. Comparação com o método oficial (fluorimétrico) .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>31</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A sardine ( <i>sardina pilchardus</i> , familia Clupeidae) e B atun ( <i>Thunnus thynnus</i> , familia Scombridae) .....	1
Figura 2. Esquema de um equipamento de eletroforese capilar .....	3
Figura 3. Formação e sentido do fluxo eletrosmótico normal .....	5
Figura 4. Perfil do fluxo pressurizado (laminar) e do eletrosmótico (linear) .....	6
Figura 5. Curvas de mobilidade efetiva versus pH .....	17
Figura 6. Eletroferograma da amostra 12 ppm de histamina em água. Eletrólito composto por 20mmolL <sup>-1</sup> Tetraborato de Sódio (TBS) em água, pH 9,3. Condições: injeção hidrodinâmica (50mbar, 9s); tensão aplicada 30kV; 25°C; detecção direta em 210 nm .....	18
Figura 7. Eletroferograma da amostra 12 ppm de histamina em água. Eletrólito composto por 10mmolL <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> e 40mmolL <sup>-1</sup> de HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> em água, pH 7,6. Condições: injeção hidrodinâmica (50mbar, 9s); tensão aplicada 30kV; 25°C; detecção direta em 210 nm .....	18
Figura 8. Eletroferograma da amostra 12 ppm de histamina em água. Eletrólito composto por 10mmolL <sup>-1</sup> tris-metilaminometano (TRIS) e por 20mmolL <sup>-1</sup> ácido 2-hidroxisobutílico (HIBA) em água, pH 3,9. Condições: injeção hidrodinâmica (50mbar, 9s); tensão aplicada 30kV; 25°C; detecção direta .....	19
Figura 9. Eletroferograma da amostra 12 ppm de histamina em água. Eletrólito composto por 20mmolL <sup>-1</sup> tris-metilaminometano (TRIS) e por 10mmolL <sup>-1</sup> ácido 2-hidroxisobutílico (HIBA) em água, pH 8,0. Condições: injeção hidrodinâmica (50mbar, 9s); tensão aplicada 30kV; 25°C; detecção direta .....	19
Figura 10. Eletroferograma da amostra 12 ppm de histamina em água. Eletrólito composto por 60mmolL <sup>-1</sup> ácido 2-hidroxisobutílico (HIBA) e por 30mmolL <sup>-1</sup> Hidróxido de Sódio em água, pH 3,8. Condições: injeção hidrodinâmica (50mbar, 9s); tensão aplicada 30kV; 25°C; detecção direta .....	20
Figura 11. Eletroferograma da amostra 9 mg L <sup>-1</sup> de histamina em etanol/água. Eletrólito composto por 60 mmol L <sup>-1</sup> de HIBA, 30 mmol L <sup>-1</sup> de NaOH e 0,25 mmol L <sup>-1</sup> de HEXA-Br em água, pH 3,88. Condições: injeção hidrodinâmica pelo lado mais próximo do detector (50 mbar, 9 s); tensão aplicada -20 kV; temperatura 25°C; detecção direta em 214 nm .....	21

Figura 12 . Dados obtidos a partir da extração da histamina em metanol, etanol absoluto e etanol hidratado .....	22
Figura 13. Curvas obtidas para as amostras 1 e 2 em 10, 20, 30, 40 e 50 minutos de extração .....	23
Figura 14. Curva obtida para as amostras 1 e 2 em 10, 20 e 30 minutos de extração .....	24
Figura 15. Resultado da avaliação de linearidade do método com sua respectiva Equação de reta e coeficiente de correlação .....	26



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Métodos para a determinação de BAs por eletroforese capilar .....	9
Tabela 2. Figuras de mérito do método proposto .....	25
Tabela 3. Dados obtidos a partir da recuperação da histamina na amostra de atum .....	28
Tabela 4. Valores encontrados para a análises nas diferentes matrizes .....	29
Tabela 5. Comparação entre o método fluorimétrico e o método proposto por eletroforese capilar .....	30

**LISTA DE EQUAÇÕES**

Equação 1. Medida da velocidade da espécie analisada .....	6
Equação 2. Cálculo da mobilidade efetiva .....	7
Equação 3. Cálculo da mobilidade real ou absoluta .....	16
Equação 4. Relação entre mobilidade efetiva e mobilidade absoluta em valores de pH ao menos duas unidades de grandeza maiores que o $pK_a$ da espécie analisada .....	16
Equação 5. Cálculo da mobilidade iônica a uma dada temperatura .....	16

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

Ba – Aminas Biogênica

CG – Cromatografia Gasosa

ECZ – Eletroforese Capilar de Zona

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FEO – Fluxo Eletrosmótico

MECK – Micellar electrokinetic chromatography (cromatografia eletrocinética micelar)

CGE – Capillary Gel Electrophoresis (eletroforese capilar em gel)

CIEF – Capillary Isoelectric Focusing (focalização isoelétrica capilar)

CITP – Capillary Isotacophoresis (isotacoforese capilar)

CEC – Capillary Electrochromatography (eletrocromatografia capilar)

$\mu_{ef}$  – Mobilidade eletroforética

$\mu_{eo}$  – Mobilidade eletrosmótica

E – Campo elétrico

v – Velocidade

$\mu_{ef}$  – Mobilidade efetiva

U.V. – Ultravioleta.

LQ – Limite de Quantificação

LD – Limite de Detecção

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

CV – Coeficiente de Variação

$\mu_{act,A^-}$  - Mobilidade real

$\mu_{0,A^-}$  - Mobilidade iônica

EMD – Dispersão por Eletromigração

P.I. – Padrão Interno

AOAC - Association of Analytical Communities

OMA – Official Methods of Analysis

## RESUMO

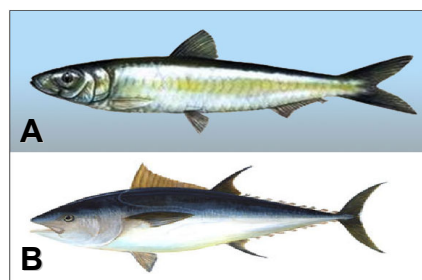
Aminas Biogênicas (BA) são bases orgânicas de baixa massa molecular sintetizadas durante o processo metabólico em todos os organismos vivos. Estes compostos representam importante grupo de produtos naturais tóxicos e a maioria das intoxicações alimentares causadas por BAs está relacionada com a histamina. Nos peixes, principalmente os pertencentes à família Scombridae e Clupeidae, os níveis de histidina livre (precursora da histamina) nos seus músculos são relativamente altos, o que explica o porquê de serem encontradas concentrações elevadas de histamina sem a formação de indicadores organolépticos de deterioração, como mau odor, perda do brilho das escamas e da transparência dos olhos no cristalino e escurecimento das brânquias. Assim, considerando os potenciais efeitos nocivos da histamina ao desenvolvimento do sistema nervoso e imunológico, uma investigação para desenvolver métodos simples e sensíveis para a sua análise é de grande interesse. Em peixes, a legislação brasileira determina que o conteúdo máximo de histamina, na média das amostras, não deve ser superior a 100 mg/Kg, sendo que nenhuma das amostras pode conter uma concentração superior a 200 mg/kg.

## 1. Introdução

Aminas Biogênicas (BA) são bases orgânicas de baixa massa molecular sintetizadas durante o processo metabólico em todos os organismos vivos. Elas possuem estrutura alifática (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina), aromática (tiramina, fenietilamina) ou heterocíclica (histamina, triptamina) e podem ser formadas por transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólises de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação microbiana de aminoácidos, sendo esta última a principal via de formação (AVELAR, 2005).

BA em baixas concentrações podem ser formadas em alimentos não fermentados como frutas, vegetais, carne, leite e peixe (ÖNAL, 2006). Quando a matéria-prima possui alto teor protéico, seu fermentado pode produzir alimentos onde se encontram quantidades elevadas destas aminas. As BA representam um importante grupo de produtos naturais tóxicos e a maioria das intoxicações alimentares causadas por BA está relacionada com a histamina, que em doses elevadas pode causar dores de cabeça, náuseas, hipertensão e problemas digestivos (KVASNICKA e VOLDRICH, 2005).

Nos peixes, principalmente os pertencentes à família Scombridae e Clupeidae (Figura 1), os níveis de histidina livre em seus músculos são relativamente altos quando vivos, sendo que o processo de degradação *post-mortem* libera ainda uma quantidade de histidina adicional (ROSSANO *et al*, 2005). Esta característica explica o porquê de serem encontradas concentrações elevadas de histamina sem a formação de indicadores organolépticos de deterioração.



**Figura 1.** A sardine (sardina pilchardus, familia Clupeidae) e B atun (Thunnus thynnus, familia Scombridae)

Considerando os potenciais efeitos nocivos da histamina ao sistema nervoso e imunológico, uma investigação para o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e sensíveis para a sua análise torna-se necessária (ZHANG e SUN, 2004). A legislação brasileira determina que o conteúdo máximo de histamina em peixes não deve ser superior a 100 mg/Kg, tomando como base a média de amostras analisadas, sendo que nenhuma unidade de amostra pode apresentar um valor superior a 200 mg/Kg (BRASIL. Ministério Da Saúde, 1998).

Os principais métodos explorados para determinação de histamina são a cromatografia gasosa (CG), cromatografia em camada delgada, eletroforese capilar de zona (ECZ) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo a última a que mais possui relatos de técnicas de separação e quantificação de aminas biogênicas. Por possuir alta eficiência de separação (tipicamente acima de  $10^5$  pratos teóricos), tempos de análise reduzidos, alto grau de automação e baixo custo por análise, quando comparada com HPLC, as técnicas eletroforéticas vêm surgindo como uma ferramenta alternativa de alta relevância no meio analítico (BUSTO, 1995; AVELAR, 2005; GUIMARÃES, 2005, Silva, 2003). A proposta deste trabalho então é desenvolver um método analítico quantitativo para histamina por eletroforese capilar de zona, simplificando o máximo possível o pré-tratamento de amostra, visando facilidade operacional e diminuição de custo e tempo de análise.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Eletroforese Capilar

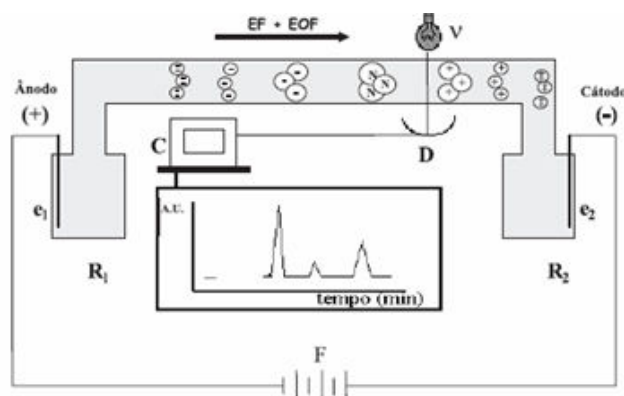
A eletroforese é uma técnica de separação baseada nas diferenças de mobilidade dos analitos quando submetidos à ação de um campo elétrico (SKOOG, 2002). O primeiro pesquisador a utilizar técnicas eletroforéticas, na década de 30, foi Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, no estudo de proteínas em soro humano, recebendo por este trabalho o prêmio Nobel de Química em 1948 (GERVASIO, 2003).

Eletroforese Capilar, ou EC, é um dos modos de aplicação desta técnica, sendo considerada relativamente nova a introdução de um capilar como canal de migração de forma a aumentar o desempenho da separação eletroforética.

Os primeiros trabalhos publicados demonstrando a habilidade na obtenção de alta eficiência de separação pela aplicação de diferença de potencial através de um capilar datam da década de 70, porém, apenas em 1981 foi publicada uma das primeiras análises desenvolvidas com sucesso por Jorgenson e Lukacs (JORGENSEN e LUCKACS, 1981, *apud*: QUEIROZE JARDIM, 2001).

#### 2.1.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada em eletroforese capilar pode ser observada no diagrama esquemático representado na Figura 2.



FONTE: GERVASIO, 2003

**Figura 2.** Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

Onde R1 e R2 são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos e1 e e2, conectados a uma fonte de potência F. Os círculos brancos representam os íons, as áreas representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação  $\nu$  e um detector D acoplado a um computador C. No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais, chamado em EC de eletroferograma.

Em EC, introduz-se uma amostra por uma das extremidades de um capilar preenchido com uma solução tampão (também chamada de eletrólito de corrida) e então é aplicado um potencial para que seja criado um campo elétrico. Este campo influenciará sobre os analitos de forma a migrarem no capilar do ponto de injeção em direção à janela de detecção, onde serão detectados.

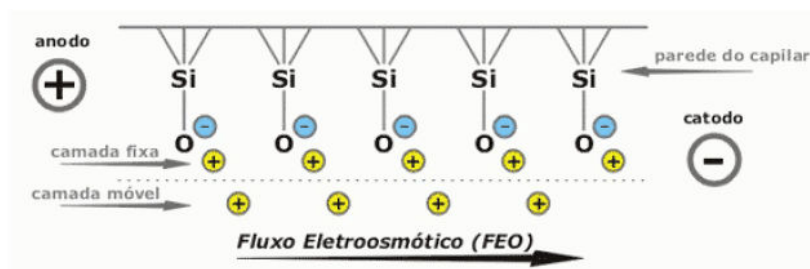
Neste trabalho será empregada apenas eletroforese capilar de zona devido à facilidade de sua implementação para análises de rotina e diminuição no custo e no tempo de análise.

### **2.1.2 Fluxo eletrosmótico**

Um fator extremamente importante na separação por eletroforese capilar é a presença do fluxo eletrosmótico (FEO ou EOF, “eletroosmotic flow”). O FEO ocorre pela ionização dos grupos silanóis da sílica presente no interior dos capilares quando em contato com o eletrólito de corrida com valor de pH acima de 2. Na superfície do capilar estão dispostos grupamentos dissociados (grupos silanoatos) que conferem carga negativa à parede. Estes grupos silanoatos atraem os prótons  $H^+$  provenientes da solução de corrida formando uma camada interna de cátions (camada fixa) próximo à parede do capilar. Esta camada não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas da parede do capilar e então forma-se uma segunda camada de prótons (camada móvel). No momento em que é aplicado um campo elétrico, a camada móvel é deslocada em direção ao eletrodo de carga oposta. Moléculas de água que solvatam os íons da camada móvel também são transportadas ao longo do capilar, contribuindo para o seu deslocamento, induzindo um fluxo de solução como um todo em direção ao cátodo. Esta força responsável pelo transporte



dos analitos, sem distinção de cargas ao longo do capilar é denominada fluxo eletrosmótico. Este fluxo possibilita a análise simultânea de amostras contendo tanto solutos catiônicos quanto solutos aniônicos, e até solutos neutros, embora quanto a estes não haja entre eles uma discriminação temporal (TAVARES, 1996). Quando este movimento se dá do pólo positivo para o pólo negativo denomina-se como sendo um fluxo eletrosmótico normal, como o mostrado na Figura 3.

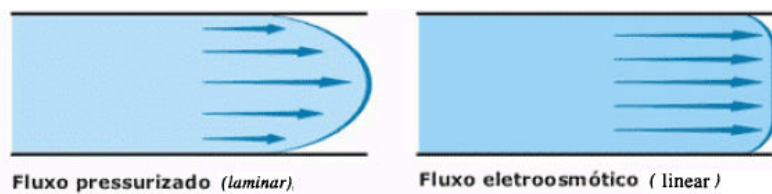


FORNTE: QUEIROZ; JARDIM, 2005.

**Figura 3.** Formação e sentido do fluxo eletrosmótico normal.

Este fluxo depende da carga do capilar, da viscosidade e da constante dielétrica do tampão, sendo, portanto dependente diretamente do pH, concentração e força iônica da solução tampão, além de aditivos orgânicos e temperatura.

Além de o fluxo ser responsável pela possibilidade da análise simultânea das amostras contendo solutos aniônicos, neutros e catiônicos, também possui vinculado a si parte das características de alta eficiência da técnica, devido ao perfil radial de sua velocidade (Figura 4). Seu perfil radial permite que as moléculas dentro do capilar se movimentem com velocidades muito próximas, independentes de sua posição radial. Esta peculiaridade permite uma maior eficiência na separação dos picos frente aos demais métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, que apresentam um fluxo laminar, característico de amostras introduzidas por pressão.



FONTE: QUEIROZ; JARDIM, 2005.

**Figura 4.** Perfil do fluxo pressurizado (laminar) e do eletroosmótico (linear).

## 2.2 Modos de separação

Eletroforese capilar engloba diversas formas de operação com diferentes mecanismos de separação, tendo em comum um mesmo princípio. Entre os principais modos estão: eletroforese capilar de zona (CZE, “capillary zone electrophoresis”); cromatografia eletrocinética micelar (MECK, “micellar electrokinetic chromatography”); Eletroforese capilar em gel (CGE, “capillary gel electrophoresis”); focalização isoelétrica capilar (CIEF, “capillary isoelectric focusing”); isotacoforese capilar (CITP, “capillary isotacophoresis”), eletrocromatografia capilar (CEC, “capillary electrochromatography”). A diferença básica entre cada modo de operação se encontra na solução tampão empregada e o preenchimento dentro da coluna.

### 2.2.1 Eletroforese Capilar em Solução Livre

Eletroforese capilar de zona ou eletroforese capilar em solução livre é um dos principais modos de separação eletroforética utilizados. Seu mecanismo de separação se baseia nas diferenças de velocidade de migração de espécies iônicas quando submetidas a um campo elétrico devido a sua razão carga/raio iônico. Quando uma espécie carregada eletricamente é exposta a um campo elétrico ( $E$ ), essa migrará com velocidade ( $v$ ) característica que é proporcional ao campo elétrico aplicado, Equação 1.

$$v = (\mu_{ef} + \mu_{eo}) E \quad (1)$$

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica ( $\mu_j$ ), o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade efetiva ( $\mu_{ef}$ ) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, na qual qualquer substância  $i$  presente em solução em diferentes formas  $j$ , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo certa mobilidade efetiva dada pela Equação 2.

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad (2)$$

Onde  $\alpha_j$  é a fração molar ou função de distribuição e  $\mu_j$  a mobilidade iônica de cada espécie individual  $j$ .

Um método desenvolvido por eletroforese capilar em solução livre deve satisfazer as seguintes condições: i) o co-íon do eletrólito de corrida (componente do eletrólito de corrida com a mesma carga do analito) deve ser escolhido de modo a minimizar os efeitos de dispersão por eletromigração (EMD); ii) o eletrólito otimizado deve apresentar boa capacidade tamponante; lii) as diferenças de mobilidade efetiva devem ser suficientes para uma boa resolução entre os analitos; iv) para se obter uma análise rápida deve-se aplicar um alto campo elétrico.

A partir dos valores de pKa e  $\mu_i$  é possível a construção de curvas de mobilidade efetiva para os analitos e para os componentes do eletrólito de corrida utilizando a Equação 2.

A utilização das curvas de mobilidade efetiva *versus* pH auxilia na escolha do co-íon, escolha do padrão interno, inspeção dos possíveis interferentes e determinação do modo de operação (contra ou co-eletrosmótico).

Outro fenômeno que deve ser evitado em eletroforese capilar é a formação de “system zones”, chamados picos de sistema, próximos ou coincidentes com a zona da amostra, fenômeno esse que pode ser prejudicial à separação.

### **2.3 Análise de histamina por eletroforese capilar**

Na literatura, encontram-se diversos trabalhos sobre análises de BA por eletroforese capilar de zona, sendo que os principais encontram-se listados na Tabela 1. Porém nenhum deles possui as qualidades requeridas para um método de análise de rotina, como baixo custo de análise, tempos reduzidos e minimização na quantidade de resíduos produzidos.

**Tabela 1.** Métodos para a determinação de BAs por eletroforese capilar

Método de separação <sup>a</sup>	Reagente <sup>b</sup>	Método de detecção <sup>c</sup>	Analíto <sup>d</sup>	Tempo de separação (s)	Limite de detecção (µM)	Referência
ECZ	PBS (pH 2,5)	UV	Him	294	0,005	ROSSANO, 2005
ECZ	PBS (pH 3,0)	Fluor	7 aminas biogênicas	200	0,021 – 0,051	ZHANG, 2005
ECZ	PBS (pH 5,8)	Fluor	Him His	200	0,0055 0,0038	ZHANG, 2005
ECZ	PBS (pH 2,5)	AD	Him	780	0,004	CINQUINA, 2004
MECK	Borato (pH 9,35), 40 mM SDC, e 10% acetonitrila	LIF	8 aminas biogênicas	2400	0,0005 – 0,01	LIU, 2003
ECZ	PBS e CBS (pH 2,5 e pH6,5)	AD	Him Tir	84	0,018 0,043	LANGE, 2002
ECZ	PBS (pH 7,0)	Amp	Him His 5-HT	400	0,10	WENG, 2002
ECZ	PBS (pH 10,5) e 20% etanol	UV	Histamina	480	2,5	DRIOUICH, 2001
ECZ	Borato (pH 9,0), 15 mM MBCD, 25 mM SBCD e 10% etanol	LIF	8 aminas biogênicas	1380	0,25 - 10	MALE, 2001
MEKC	Acido bórico (pH 8,9), SDS e 10% acetonitrila	UV-Vis	7 aminas biogênicas	1800	1 - 40	KOVÁCS, 1999
ICD-HPCE	PBS – borato (pH 10) SDS, OPA e NAC	Fluor, UV-Vis	Him Tir Cad	1200	1 1 5	OGURI, 1997

<sup>a</sup> ECZ: eletroforese capilar de zona; MECK: cromatografia eletrocínica micelar; ICD-HPCE: eletroforese capilar de alta eficiência com derivação dentro do capilar;

<sup>b</sup> PBS: solução tampão de fosfato; CBS: tampão de citrato, MBCD: metil-β-ciclodextrina; SBCD: sulfobutileter- β –ciclodextrina, SDS: dodecil sulfato de sódio; OPA: o-fitalaldeido; NAC: N-acetilcisteína;

<sup>c</sup> UV: ultravioleta; Fluor: fluorescência; AD: arranjo de diodos; LIF: fluorescência por indução a laser; Amp: amperimetria; Vis: visível;

<sup>d</sup> Him: histamina; His: histidina; Tir: tiramina; 5-HT: serotonina, Cad: cadaverina;

Já em 1997, OGURI publicou artigos referentes à análise de histamina com tempo de separação de 10 minutos. A análise era feita em uma matriz complexa (mariscos) e envolvia técnicas de derivatização dentro do capilar e detecção por fluorescência como forma de aumentar o sinal da análise (OGURI, 1997). Em 1999, KAVÁCSA estudou a separação de 7 diferentes aminas biogênicas com detecção UV em amostras de alimentos, utilizando eletroforese capilar no modo cromatografia eletrocinética micelar (KAVÁCSA, 1999). Neste estudo foi possível avaliar compostos neutros através do tempo de partição do analito com a micela, mas devido ao grande número de analitos, a análise apresentou um tempo de separação elevado (30 min). Após o ano de 2000, diversos artigos foram publicados sobre análises de histamina e outras aminas biogênicas em diversos tipos de amostra, demonstrando a versatilidade da técnica em diferentes matrizes. Entretanto, como forma de aumentar o sinal analítico ou aumentar a eficiência das bandas, a grande maioria dos trabalhos utiliza a derivatização dentro ou fora do capilar, com detecção por fluorescência ou variações desta (CINQUINA, 2004; LIU, 2003; MALE, 2001; ZHANG, 2005).

Em análises de rotina, mais importante que diminuir os limites de detecção (LD) e quantificação do método (LQ), é a redução de tempo e gastos com reagentes, onde técnicas de derivatização implicam justamente no oposto (ganhos de LQ e LD associados ao aumento do tempo e consumo de reagentes).

Utilizando eletroforese capilar de zona, talvez o trabalho mais importante, devido à simplicidade do tratamento de amostra, quanto no custo da análise de histamina em amostras de peixe é o de Cinquina (CINQUINA, 2004). Neste estudo é realizada uma comparação entre métodos validados para análise de histamina em atum utilizando HPLC e CE com limites de detecção de  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  em 5 minutos de corrida, porém há a utilização de ácido clorídrico para o preparo de amostra, e o tempo total de análise foi em torno de 25 minutos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver e validar um método analítico utilizando eletroforese capilar, para identificação e quantificação de histamina em peixes e frutos do mar.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Estabelecer parâmetros e condições de análise por eletroforese capilar para histamina.
- Avaliar o método analítico quanto aos parâmetros de precisão, exatidão especificidade, linearidade, intervalo e robustez.
- Comparar o método desenvolvido e validado para eletroforese capilar de zona com o método Oficial, verificando operacionalidade e custo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Equipamento

As análises foram realizadas em dois equipamentos de eletroforese capilar, modelos HP<sup>3D</sup> CE, Agilent Technologie, (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector com arranjo de diodos, e P/ACE<sup>TM</sup> MDQ (Beckman Coulter). Foram utilizados capilares de sílica fundida recoberto com poliimida (Polymicro Technologies, E.U.A.): no primeiro equipamento, foi utilizado um capilar 48,5 cm de comprimento total e 8,5 cm até o detector, enquanto no segundo equipamento as dimensões do capilar foram de 50,2 cm de comprimento total e 10,2 cm de comprimento até o detector (50 µm D.I.) com a injeção sendo realizada em ambos pela extremidade mais próxima a janela de detecção. A temperatura do capilar foi mantida em 25°C.

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada (desionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, E.U.A.). Para o preparo das soluções foram utilizados os reagentes: dihidrogênio ortofosfato monossódico dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hidrogênio ortofosfato dissódico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hidróxido de sódio (NaOH) e tetraborato de sódio (TBS) obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); tris-metilaminometano (TRIS), ácido 2-hidroxisobutírico (HIBA) e imidazol obtidos da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), etanol e éter etílico obtidos da Tédia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a histamina foi obtida da Acros organics (New Jersey, USA).

### 4.2. Amostra

#### 4.2.1. Aquisição da amostra

O atum foi adquirido no Mercado Público de Florianópolis/SC, onde é possível a obtenção de pescados com alto grau de frescor, e em redes de supermercado. As amostras de atum enlatado, pintado e camarão foram obtidas em redes de supermercado local.



#### **4.2.2. Preparo da amostra**

A amostra foi preparada a partir de 10 gramas do peixe homogeneizado em 100 mL de etanol hidratado comercial (92,8%) em mixer (modelo RI1350 220 V Walita). Em seguida, foram retiradas alíquotas de cerca de 2 mL e centrifugadas em microcentrífuga (modelo Minitube) a 6.000 rpm (2.000 x g) por 3 minutos. Na seqüência, o extrato assim obtido foi diluído em etanol:solução PI:água (2:1:1, v/v/v). A solução do padrão interno foi constituído por 15 mg L<sup>-1</sup> de imidazol em água. A mistura então foi levada para a análise.

### **4.3. Método**

#### **4.3.1. Soluções**

##### **4.3.1.1. Eletrólito de corrida**

Foram testados como eletrólito de corrida, soluções de: (a) 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS em água, com pH 9,3; (b) 10 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> e 40 mmol L<sup>-1</sup> de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> em água, com pH 7,6; (c) 10 mmol L<sup>-1</sup> tris-metilaminometano (TRIS) e 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido 2-hidroxisobutílico (HIBA) em água, com pH 3,9; (d) 20 mmol L<sup>-1</sup> de TRIS e 10 mmol L<sup>-1</sup> de HIBA em água, com pH 8,0 e (e) 60 mmol L<sup>-1</sup> de HIBA e 30 mmol L<sup>-1</sup> NaOH em água, com pH 3,8.

Depois de escolhido o eletrólito de corrida, foi preparada uma solução estoque com um volume de 100 mL e armazenado sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso. Sempre antes da utilização era adicionado 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de brometo de hexametônio (HEXA-Br) como complexante da parede interna do capilar.

##### **4.3.1.2. Solução estoque de histamina**

Foi preparada uma solução estoque a partir da histamina padrão para uma concentração final de 600 mg L<sup>-1</sup>. Esta então foi mantida sob refrigeração

até o momento do uso, onde eram então diluídas até a concentração de interesse.

#### **4.4. Figuras de mérito do método**

O método foi avaliado segundo alguns dos parâmetros de validação estipulados por órgãos brasileiros como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO).

##### **4.4.1. Linearidade**

Para avaliar a linearidade do método proposto, construiu-se uma curva de calibração para a histamina na faixa de concentração entre 0,25 e 15 mg L<sup>-1</sup>. Os pontos da curva de calibração foram analisados em duplicata.

A partir dos dados obtidos, foi construído um gráfico de linearidade, considerando área corrigida (área do analito / área do P.I.) *versus* a concentração.

##### **4.4.2. Calibração por padronização interna**

É recomendada a utilização de um método de calibração como forma de melhorar a precisão do método. Para isto foi escolhida a calibração por padronização interna, onde é adicionada uma quantidade conhecida e constante de um composto chamado então de padrão interno.

##### **4.4.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)**

Os LQ e LD foram determinados a partir dos dados da curva de calibração, considerando a relação dada pela razão entre o coeficiente linear

da Equação e o coeficiente angular da curva analítica multiplicado por 3,3, no caso da LD, ou por 10, no caso da LQ.

#### **4.4.4. Precisão**

A precisão do método foi avaliada segundo ensaios de repetibilidade, precisão instrumental e precisão intermediária.

Como parâmetros foram avaliados a área corrigida, o tempo de migração e o tempo de migração corrigido para cada análise e foram estimados através do coeficiente de variação de cada parâmetro (CV%).

##### **4.4.4.1 Repetibilidade (precisão intra-ensaio)**

Avaliou-se quatro preparações de uma solução padrão de histamina com concentração de 3 mg L<sup>-1</sup>, analisadas em duplicata, totalizando 8 análises consecutivas.

##### **4.4.4.2 Precisão instrumental**

Avaliou-se uma solução padrão de histamina com concentração de 6,75 mg L<sup>-1</sup>, em quintuplicata.

##### **4.4.4.3 Precisão intermediária**

Avaliou-se a repetibilidade do método em três diferentes dias. O primeiro deles foi feito com quatro análises em duplicata (o mesmo utilizado para o ensaio de repetibilidade) e os outros dois feitos duas análises em duplicata, todos com intervalo entre os ensaios maior que uma semana. Na seqüência foi avaliado então o coeficiente de variação entre os três diferentes ensaios.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Desenvolvimento do método

#### 5.1.1. Determinação da Mobilidade Iônica

Para a construção das curvas de mobilidade efetiva *versus* pH é necessário conhecer os valores de pKa e mobilidade iônica  $\mu_{0,A^-}$ . O valor de pKa para histamina está disponível na literatura, entretanto o valor de mobilidade iônica não. Assim sendo foi realizado um procedimento para a determinação deste valor.

A expressão que relaciona a mobilidade real  $\mu_{act,A^-}$  com a mobilidade efetiva é apresentada na Equação 4. A mobilidade real é a mobilidade da espécie iônica totalmente dissociada numa dada temperatura e força iônica.

$$\mu_{eff,A^-} = \frac{\mu_{act,A^-}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (3)$$

Se o valor de pH  $\gg$  pKa

$$\mu_{eff,A^-} \cong \mu_{act,A^-} \quad (4)$$

A partir da Equação 3 pode-se observar que em pH muito acima do valor de pKa ( $\cong$  2 unidades maior) o valor da mobilidade efetiva se aproxima do valor da mobilidade real.

A partir do valor da mobilidade real em valores baixos de força iônica pode-se obter o valor da mobilidade iônica numa dada temperatura a partir da Equação 5.

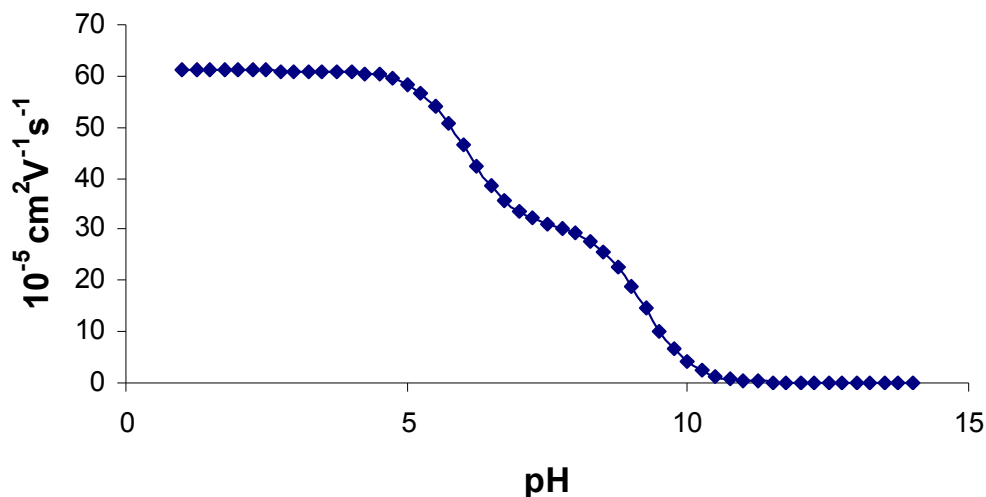
$$\mu_{act,A^-} = \mu_{0,A^-} - \left[ \frac{159,36}{\varepsilon_r^{3/2}} \mu_{0,A^-} + \frac{0,2476 \times 10^{-5}}{\eta \varepsilon_r^{1/2}} \right] \sqrt{I} \quad (5)$$

Onde  $\mu_{0,A^-}$  é a mobilidade iônica de  $A^-$ . Em água a 25°C  $\varepsilon_r = 78,54$   $\eta = 0.890 \times 10^{-3}$  Pa.s, I é a força iônica do eletrólito.

A determinação do valor da mobilidade efetiva num valor de  $\text{pH} \gg \text{pKa}$  para um eletrólito univalente de força iônica  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  foi feita utilizando o procedimento desenvolvido por Willians e Vigh (1996)

Os valores de mobilidade iônica e  $\text{pKa}$  para a histamina foram  $30,7$  e  $61 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $6,0$  e  $9,8$  respectivamente (KVASNICKA, 2006).

A partir destes dados foi possível construir as curvas de mobilidade efetiva em função do pH, Figura 5.



**Figura 5.** Curvas de mobilidade efetiva *versus* pH

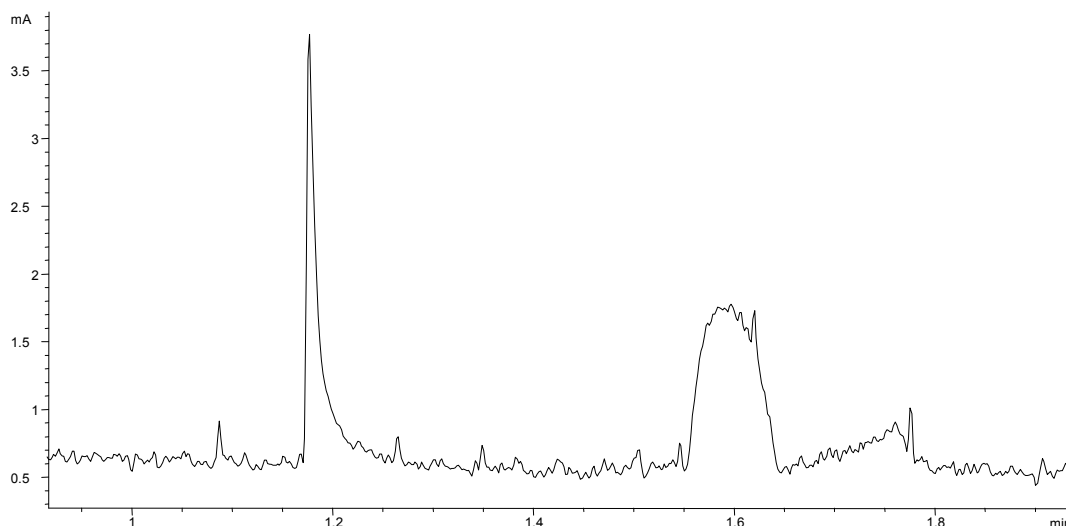
A construção da curva de mobilidade é importante, uma vez que a partir dela podem-se escolher as regiões mais adequadas para testes sobre o comportamento do analito durante a análise, sendo estas nos patamares indicados na curva ( faixas com mobilidades de  $60$  e  $30 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). A terceira região de patamar de mobilidade da histamina não é utilizada em eletroforese capilar de zona por apresentar mobilidade igual a 0.

Os dados da curva também na otimização das escolhas do co-íon presente no eletrólito e do padrão interno a ser utilizado na análise.

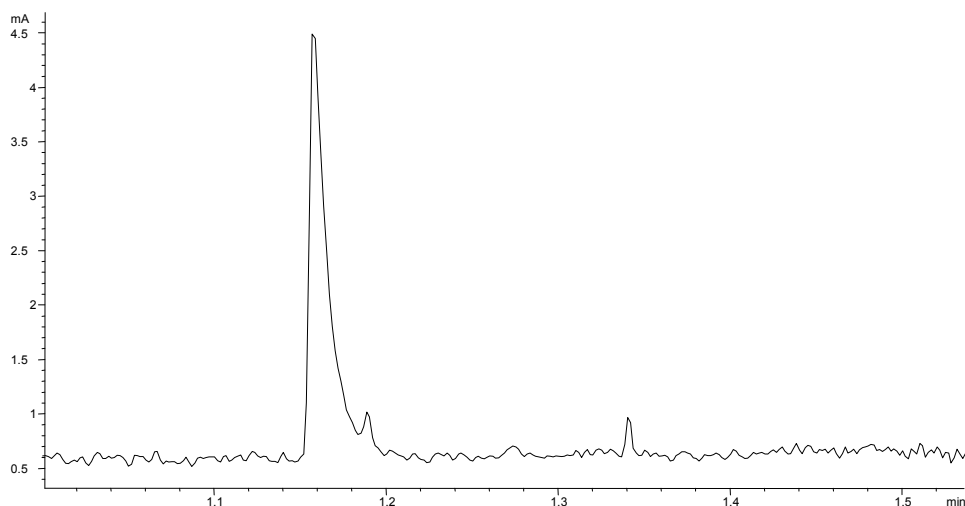
### 5.1.2. Eletrólito de corrida

Com o intuito de investigar o perfil eletroforético da histamina em diferentes valores de pH foram realizadas análises em tampão pH  $9,3$ ,  $7,6$ ,  $8,0$  e  $3,9$ . Figuras 6-9. Pode-se observar que em pH  $3,9$  o perfil da análise é mais satisfatório uma vez que o pico apresenta maior eficiência. De acordo com a

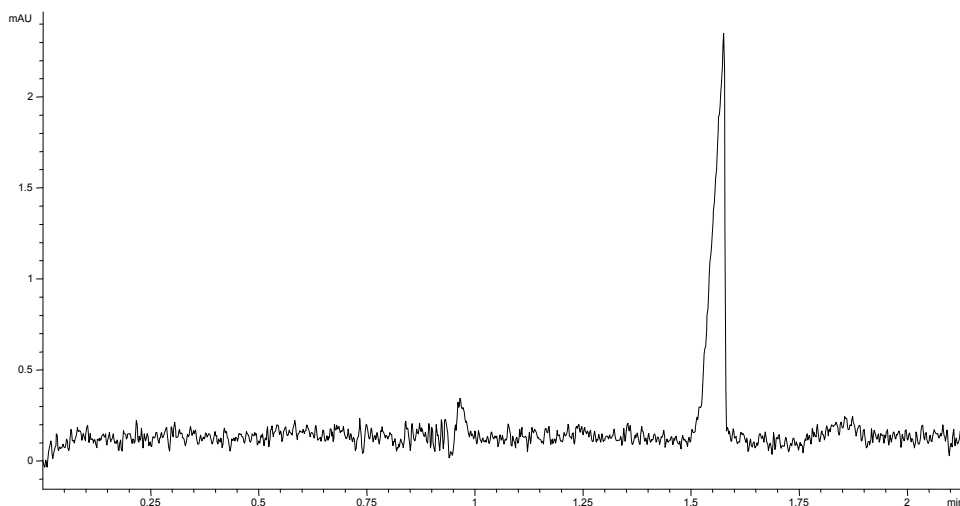
Figura 8 observa-se que em pH 3,9 a histamina apresenta-se com duas cargas positivas o que a princípio promoveria a interação da mesma com a parede negativa do capilar. Entretanto nesse valor de pH as paredes do capilar apresentam carga negativa reduzida em relação aos outros valores de pH utilizados devido a protonação dos grupos silanol, o que reduz a interação.



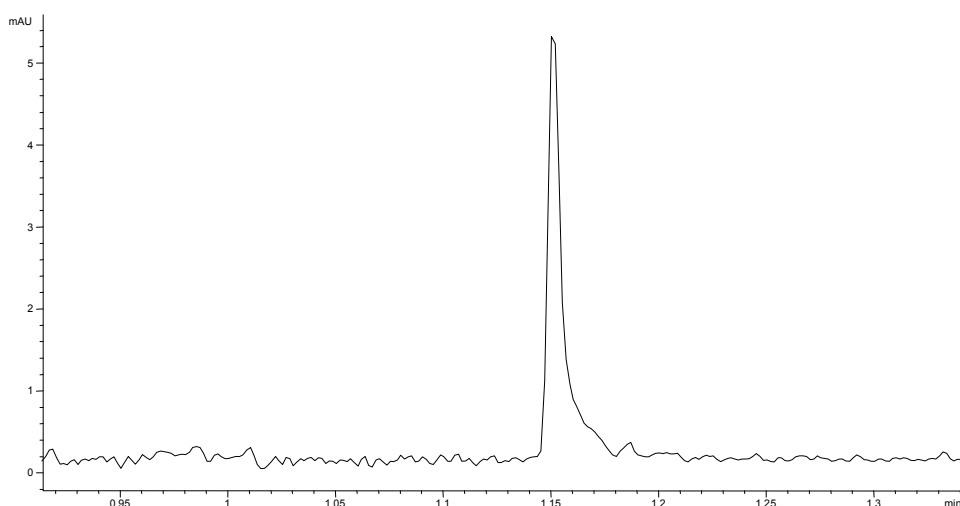
**Figura 6.** Electroferograma da amostra  $12 \text{ mg L}^{-1}$  de histamina em água. Eletrólito composto por  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS em água, pH 9,3. Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 9 s); tensão aplicada 30 kV;  $25^\circ\text{C}$ ; detecção direta em 210 nm.



**Figura 7.** Electroferograma da amostra  $12 \text{ mg L}^{-1}$  de histamina em água. Eletrólito composto por  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{HPO}_4^{2-}$  em água, pH 7,6. Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 9 s); tensão aplicada 30 kV;  $25^\circ\text{C}$ ; detecção direta em 210 nm.



**Figura 8.** Eletroferograma da amostra  $12 \text{ mg L}^{-1}$  de histamina em água. Eletrólito composto por  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  TRIS e por  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de HIBA em água, pH 3,9. Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 9 s); tensão aplicada 30 kV;  $25^\circ\text{C}$ ; detecção direta em 210 nm.

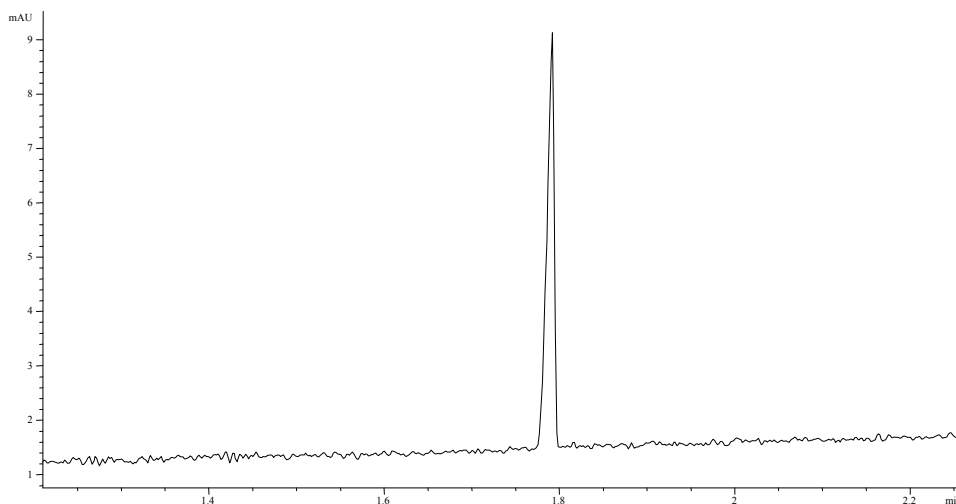


**Figura 9.** Eletroferograma da amostra  $12 \text{ mg L}^{-1}$  de histamina em água. Eletrólito composto por  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de TRIS e por  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de HIBA em água, pH 8,0. Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 9 s); tensão aplicada 30 kV;  $25^\circ\text{C}$ ; detecção direta em 210 nm.

De acordo com os eletroferogramas apresentados nas Figuras 6-9 optou-se pelo uso de um valor de pH por volta de 4.

A fim de reduzir o ruído da linha de base e reduzir fenômenos de dispersão por eletromigração (EMD) utilizou-se um eletrólito composto de HIBA/NaOH pois o co-íon ( $\text{Na}^+$ ) reduz a absorvidade do eletrólito em 210 nm e minimiza a EMD para a histamina uma vez que a mobilidade eletroforética do

sódio ( $56 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) se aproxima da mobilidade eletroforética da histamina. A Figura 10 apresenta um eletroferograma nas condições estabelecidas.



**Figura 10.** Eletroferograma da amostra  $12 \text{ mg L}^{-1}$  de histamina em água. Eletrólito composto por  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de HIBA e por  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaOH em água, pH 3,8. Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 9 s); tensão aplicada 30 kV;  $25^\circ\text{C}$ ; detecção direta em 210 nm.

Utilizando-se um eletrólito composto de HIBA/NaOH obteve-se um aumento da relação sinal/ruído, Figura 9.

O sinal obtido utilizando-se o equipamento modelo HP3D CE, Agilent Technologies, não se mostrou suficientemente alto para a análise de histamina em peixe. Assim optou-se pela transferência do método e das análises para um equipamento modelo P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter) a fim de obter-se uma melhor relação sinal/ruído e conseqüentemente um ganho nos limites de detecção e quantificação do método.

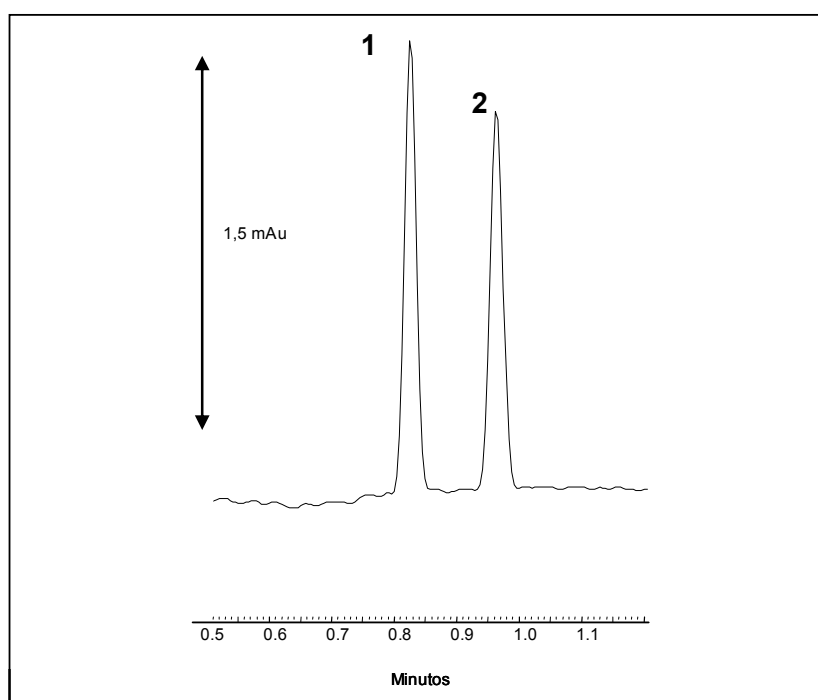
Com a mudança de equipamento, o comprimento de onda a ser analisado foi alterado de 210 nm para 214 nm.

Optou-se também pela introdução da amostra pelo lado mais próximo do detector, reduzindo assim o tempo de migração da histamina e conseqüentemente o tempo de análise, implicando assim em uma alteração da diferença de potencial aplicado, de +30 kV para -20 kV.



### 5.1.3. Padrão interno

Depois de determinada a mobilidade da histamina e o pH do eletrólito de corrida, para alcançar um aumento da precisão do método, foi escolhido um padrão interno, com o objetivo de corrigir pequenas variações ocorridas durante a análise, tais como de volume de injeção. O padrão interno escolhido com base na curva de mobilidade efetiva obtida foi o imidazol. Devido a proximidade da mobilidade do padrão interno escolhido optou-se pela adição de 0,25 mmol L<sup>-1</sup> do complexante HEXA, como meio de diminuir a mobilidade do fluxo, e assim impedir uma possível co-migração das bandas do analito (histamina) e do P.I. escolhido (imidazol).



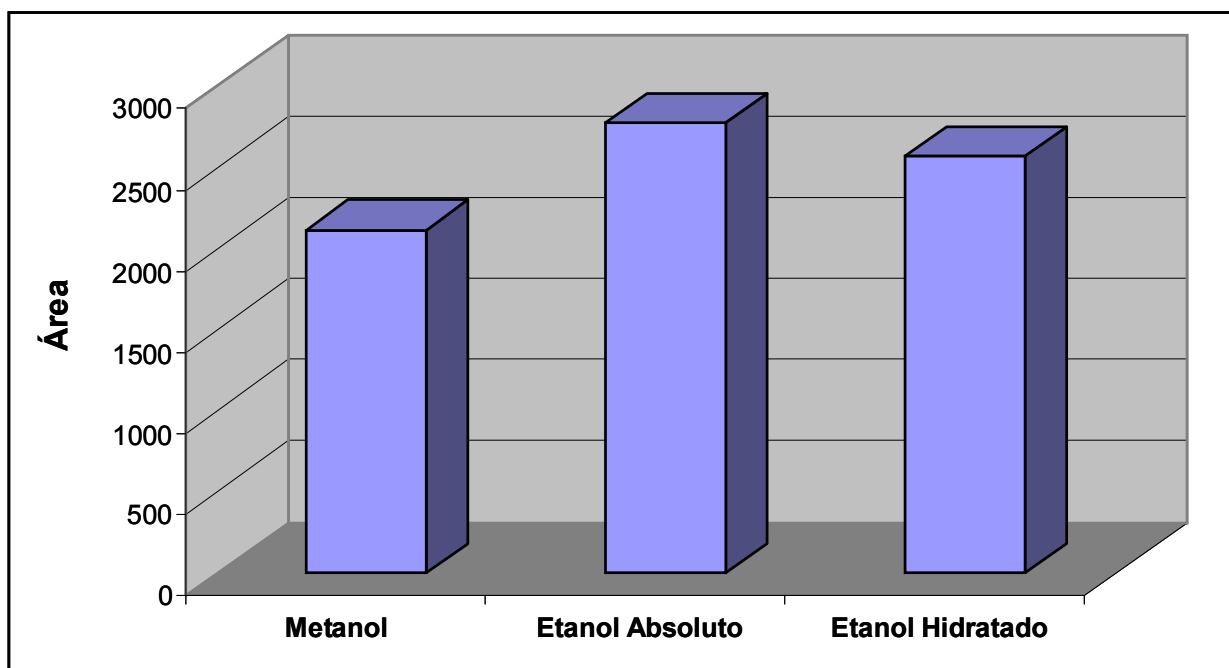
**Figura 11.** Eletroferograma da amostra 9 mg L<sup>-1</sup> de histamina (1) e do imidazol (2) em etanol/água. Eletrólito composto por 60 mmol L<sup>-1</sup> de HIBA, 30 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH e 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de HEXA-Br em água, pH 3,88. Condições: injeção hidrodinâmica pelo lado mais próximo do detector (50 mbar, 9 s); tensão aplicada -20 kV; temperatura 25°C; detecção direta em 214 nm.

A Figura 11 mostra o eletroferograma do padrão histamina após o método ter sido otimizado.

#### 5.1.4. Parâmetros da extração

O método escolhido para extração da histamina na amostra teve como base o preparo proposto para o método fluorimétrico, recomendado pela OMA of AOAC INTERNATIONAL, porém com modificações realizadas após estudos sobre as condições do método oficial em relação ao solvente de extração, tempo e temperatura de extração.

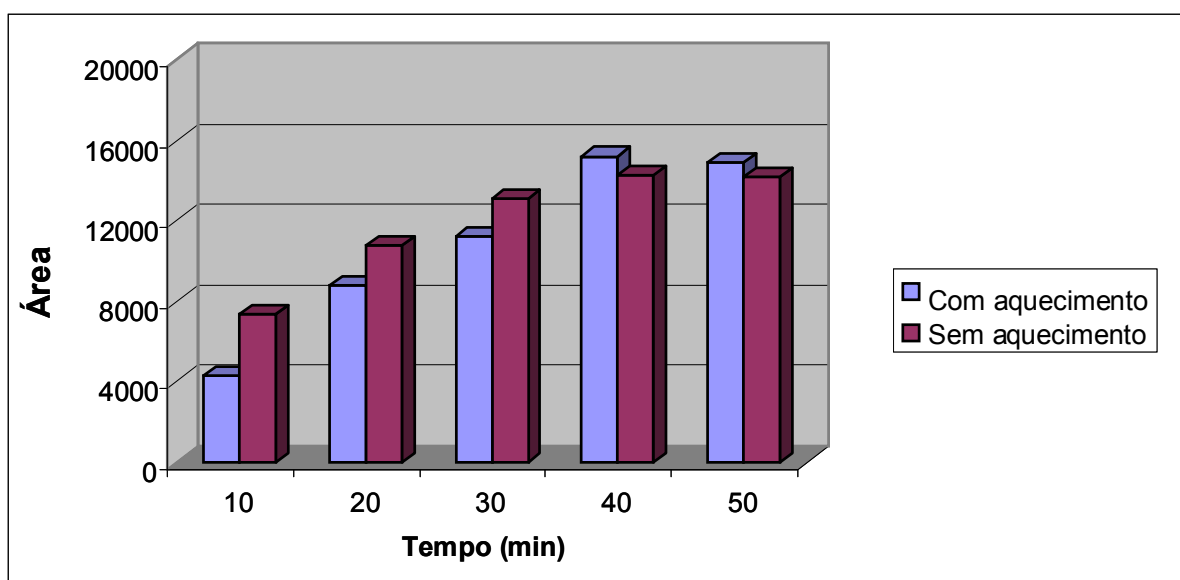
Os primeiros dados foram obtidos a partir da maceração manual do filé de atum em cadinho de porcelana e subsequente agitação da pasta obtida por 10 minutos com o solvente metanol, descrito no método AOAC, e também em mais dois solventes semelhantes, etanol absoluto e etanol hidratado, na tentativa de diminuir custo e toxicidade da metodologia de extração. Após a agitação, as amostras foram aquecidas durante 15 minutos a 60° C, retirou-se duas alíquotas de 1 mL para cada solvente estudado, centrifugadas e levadas para a análise. Os dados obtidos encontram-se na Figura 12.



**Figura 12.** Dados obtidos a partir da extração da histamina em metanol, etanol absoluto e etanol hidratado em relação à área obtida.

Com base nos resultados obtidos no teste optou-se pela utilização do etanol hidratado por este possuir menor toxicidade e custo, sem perdas significativas na área de pico obtida.

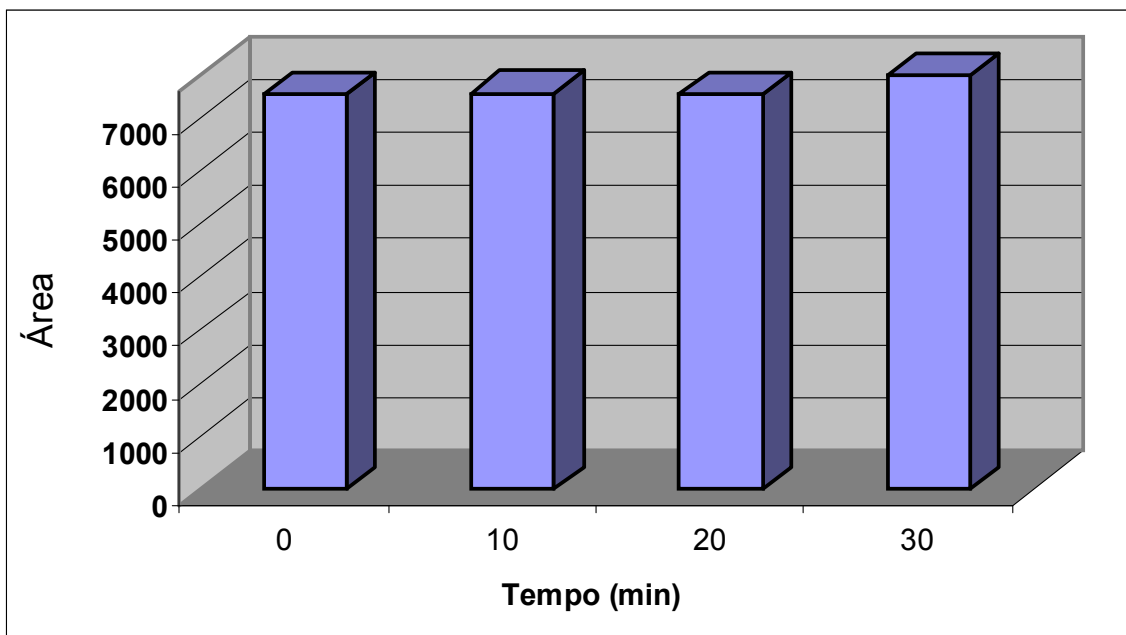
Na seqüência estudou-se a necessidade do aquecimento da amostra durante a extração, sendo ela preparada inicialmente da mesma forma descrita no estudo do solvente, porém utilizando apenas etanol hidratado, e com alíquotas retiradas em 5 tempos diferentes. Juntamente da primeira amostra, foi preparada uma segunda amostra nas mesmas condições, mas sem o aquecimento da mesma, de forma a se fixar o parâmetro estudado. A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para as duas amostras.



**Figura 13.** Dados obtidos para as amostras 1 e 2 em 10, 20, 30, 40 e 50 minutos de extração em relação à área obtida.

A partir dos dados da Figura 13 pôde-se descartar a necessidade do aquecimento da amostra, pois os valores máximos obtidos apresentaram resultados estatisticamente iguais. No entanto, os resultados demonstraram ainda que, independentemente da amostra ser ou não aquecida, a influência do tempo de extração era extremamente relevante para a análise, sendo necessário que a amostra ficasse em contato com o solvente por no mínimo 40 minutos. Como forma de diminuir o tempo de preparo substituiu-se a maceração manual em cadinho e agitação pela utilização de um “mixer” para a homogeneização da amostra. Na Figura 14 encontram-se os resultados obtidos

para a análise, também com variação do tempo, obtidos com esta modificação durante a extração.



**Figura 14.** Dados obtidos para a amostra 1 e 2 em 10, 20 e 30 minutos de extração em relação à área obtida.

Observa-se na Figura 14 que utilizando-se deste procedimento de extração obteve-se uma significativa redução do tempo de preparo da amostra foi atingido um patamar assim que a mesma foi homogeneizada.

## 5.2. Figuras de Mérito do Método

Para avaliar as Figuras de mérito do método foram estudados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão intra e inter-ensaio e recuperação.

Foi determinada a recuperação como uma medida de exatidão. Na Tabela 2 encontram-se todos os resultados obtidos para cada parâmetro.

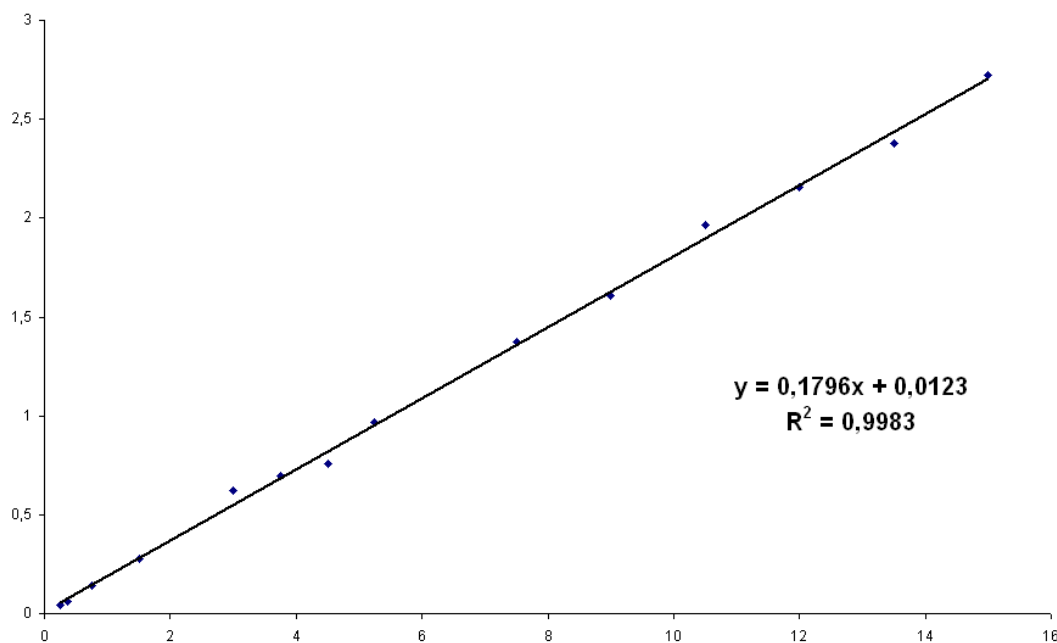
**Tabela 2.** Figuras de mérito do método proposto.

<b>Parâmetro</b>				<b>Valor</b>
Número de pratos (N)				23842
Assimetria de Pico				0
Resolução (histamina, imidazol)	Analito	Pico adjacente		1,657
Precisão instrumental (RSD %); área de pico	n =	5		1,249
Precisão instrumental (RSD %); tempo de migração	n =	5		1,333
Precisão instrumental (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	5		0,088
Precisão intra ensaio (RSD %); área de pico	n =	4		2,478
Precisão intra ensaio (RSD %); tempo de migração	n =	4		1,924
Precisão intra ensaio (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	4		0,149
Precisão inter ensaio (RSD %); área de pico	n =	8		9,497
Precisão inter ensaio (RSD %); tempo de migração	n =	8		6,537
Precisão inter ensaio (RSD %); tempo de migração corrigido	n =	8		0,801
Linearidade – inclinação				0,17959
Desvio Padrão da Inclinação				0,00216
Linearidade – intercepto				0,01228
Desvio Padrão do Intercepto				0,01708
Linearidade - coeficiente de correlação				0,99826
F				6892
% recuperação;	Add	2,5	mg/L	106,3
% recuperação;	Add	3	mg/L	102,8
% recuperação;	Add	3,5	mg/L	100,6
% recuperação;	Add	4	mg/L	99,8
% recuperação;	Add	5	mg/L	100,2
LOQ (mg L <sup>-1</sup> )*				1,0
LOD (mg L <sup>-1</sup> )*				0,3
LOQ (mg L <sup>-1</sup> ) na amostra*				19,0
LOD (mg L <sup>-1</sup> ) na amostra*				5,7

\*Curva analítica

### 5.2.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através do gráfico da razão entre a área da histamina e a área do padrão interno (imidazol) *versus* a concentração. As concentrações utilizadas variaram de 0,25 a 15 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 15.



**Figura 15.** Resultado da avaliação de linearidade do método com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

O intervalo de linearidade do método permitiu a quantificação da amostra entre 19 e 300 mg kg<sup>-1</sup>.

A legislação brasileira vigente determina que o peixe não deve possuir concentração superior a 100 mg kg<sup>-1</sup> na média das amostras e maior que 200 mg Kg em qualquer unidade da amostra ou mesmo a legislação europeia que determina concentrações máximas permitidas de 50 mg kg<sup>-1</sup> nas amostras de peixe, a faixa escolhida cobre tanto recomendações da ANVISA, de intervalo compreendido entre 80 e 120% e mínimo de 5 concentrações, quanto as recomendações da IUPAC, de intervalo entre 50 e 150% do valor esperado e mínimo de 6 concentrações. O coeficiente de determinação  $r$  também é superior ao recomendado pelos dois órgãos, 0,99 e 0,90 respectivamente.

### 5.2.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A partir dos dados obtidos na curva analítica obteve-se um limite de detecção do método de 0,3 mg kg<sup>-1</sup>, sendo esta a concentração mínima de histamina detectada pelo método, sem que necessariamente possa ser quantificada com exatidão. Porém, este valor se refere à quantidade mínima analisada após as diluições necessárias para o preparo da amostra em suas

diversas etapas, que equivale a uma diluição final de 20 vezes, significando então uma concentração mínima detectada na amostra de 20 vezes este valor, ou  $6,0 \text{ mg kg}^{-1}$ . Como limite de quantificação, foi encontrado um valor igual a  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  e fazendo então o mesmo raciocínio encontra-se um valor mínimo de quantificação na amostra de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$ .

### **5.2.3. Precisão**

Os ensaios de precisão foram realizados para a histamina avaliando-se quanto a sua repetitividade, precisão instrumental e precisão inter ensaio. Em todos os casos foram avaliados quanto à concordância de valores da área do analito corrigida, do tempo e do tempo corrigido (devido à análise se dar em um tempo extremamente curto, pequenas variações podem influenciar de forma significativa o tempo de migração do analito e como forma de minimizar estas variações utilizou-se também o tempo corrigido pelo tempo de migração do padrão interno, conseguindo assim melhora considerável nos três níveis de precisão estudados). Os valores encontrados para os três níveis de precisão encontram-se resumidos na Tabela 2.

#### **5.2.3.1. Repetitividade (precisão intra-ensaio)**

Representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um método, tendo sido feito para este método um total de 8 repetições, cobrindo assim o recomendado pela ANVISA (6 determinações) e pelo INMETRO (7 ou mais repetições). Os valores encontrados de CV% foram menores que 2,5 para cada parâmetro estudado, podendo assim ser considerado adequado à legislação nacional vigente (BRASIL 2008).

#### **5.2.3.2. Precisão instrumental**

A precisão instrumental foi avaliada através de 5 análises consecutivas de uma mesma amostra padrão. O coeficiente de variação encontrado para os três parâmetros estudados foi próximo a 1%, estando assim próximos do ideal.

### 5.2.3.3. Precisão intermediária (precisão inter-ensaio)

Para os parâmetros de precisão intermediária foram encontrados valores de coeficiente de variação menores que 10% para área de pico corrigida e tempo de migração e menor que 1% para o tempo de migração corrigido. Os valores encontrados foram considerados altos, porém o coeficiente de variação para cada dia apresentou-se inferior a 2,5% indicando a necessidade da construção diária da curva de calibração.

### 5.2.4. Exatidão

Avaliou-se a exatidão do método através de ensaios de recuperação, onde é adicionado o padrão da substância de interesse a matriz. Os valores obtidos para o ensaio encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 3.** Dados obtidos a partir da recuperação da histamina na amostra de atum.

<b>His adicionada</b>	<b>Média áreas His/lmi</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Recuperação (%)</b>
2,50	0,4771	0,0103	106,3
3,00	0,5538	0,0052	102,8
3,50	0,6325	0,0023	100,6
4,00	0,7168	0,0072	99,8
5,00	0,8995	0,0090	100,2
<b>Média</b>			101,9
<b>Desvio padrão</b>			2,700
<b>C.V.%</b>			2,648

Foram feitas análises em 5 diferentes níveis de concentração, todas em duplicata, totalizando 10 determinações. O resultado médio obtido foi próximo a 100% e o desvio padrão das medidas foi menor que 3%. Demonstrando assim a boa exatidão do método proposto.



### 5.3. Resultados das amostras

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na quantificação das amostras estudadas.

**Tabela 4.** Valores encontrados para a análises nas diferentes matrizes.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>[ ] HIS (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>
Camarão	< LD*
Pintado	< LD*
Salmão	< LD*
Atum ralado ao natural 1	< LD*
Atum ralado ao natural 2	< LD*
Atum ralado em azeite	< LD*
Atum fresco	< LD*
Atum armazenado em geladeira	42,55
Atum armazenado em geladeira e depois congelado	445,9

LD\* Limite de detecção

Nenhuma das amostras frescas apresentou quantidade suficiente de histamina para ser detectada pelo método. Como forma de verificar o método foram então armazenadas duas amostras diferentes do peixe, uma com resfriamento em geladeira por 5 dias, e outra com o mesmo resfriamento, seguido por congelamento em freezer por mais 9 dias. Nessas duas amostras foram encontradas então quantidades quantificáveis da amina biogênica em questão.

#### 5.4. Comparação com o método oficial (fluorimétrico)

Após ter sido finalizado e validado quanto aos parâmetros já abordados, o método por ECZ pode ser comparado ao método oficial quanto ao tempo de preparo e custo de solventes para o tratamento da amostra, assim como o tempo para cada análise. Os valores foram estimados para o método fluorimétrico a partir da descrição do mesmo no manual da **AOAC**. Os resultados encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 5.** Comparação entre o método fluorimétrico e o método proposto por eletroforese capilar

<b>Parâmetro</b>	<b>ECZ</b>	<b>Fluorimétrico</b>	<b>Redução (%)</b>
Tempo de análise (min)	2,67	99	97,3
Consumo de solventes no tratamento da amostra (R\$)	0,34	2,34	85,5
Tratamento da amostra (min)	5	48	89,6

Analisando os dados presentes na tabela 6 é possível demonstrar as vantagens da eletroforese capilar quando comparada ao método fluorimétrico, com redução drástica no tempo de análise (de 2 horas e meia de análise por amostra para menos de 8 minutos). Alterações no preparo da amostra também beneficiaram esta redução, além da substituição do solvente de extração por um de menor custo e toxicidade. O método proposto por EC também possui a vantagem de não necessitar de derivatização da amostra, onde há no método fluorimétrico um gasto extra de reagentes de maior valor comercial. Em eletroforese capilar, o consumo de reagentes durante a análise é desprezível, considerando que poucos mililitros são suficientes para dezenas de análises.

## 6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a eletroforese capilar pode ser utilizada com eficiência como método alternativo para quantificar a histamina em diversos tipos de matriz, podendo assim ser aplicado como método alternativo ao método oficial para análises desta amina biogênica em peixes e crustáceos. As condições otimizadas para isto se deram em um eletrólito de corrida composto por 60 mmol L<sup>-1</sup> de HIBA pH 3,88 ajustado com NaOH e HEXA 0,25 mmol L<sup>-1</sup>, capilar de sílica fundida com revestimento externo de políimida com 50,2 cm x 50 mm D.I. e 375 mm D.E. (10,2 cm de diâmetro efetivo), comprimento de onda em 214 nm e tempo de análise para o composto e seu padrão interno em 1 minuto. A diferença de potencial aplicado foi de -20 kV com injeção pelo lado mais próximo do detector.

As figuras de mérito do método atendem os parâmetros estipulados tanto pela ANVISA quanto pelo INMETRO, apresentando excelente seletividade, linearidade com coeficiente de correlação de 0,9983, exatidão próxima a 100 % e precisão intra ensaio e instrumental menores que 2,5.

O método de preparo de amostra também se mostrou altamente eficiente, com tempo de preparo reduzido e utilização de solventes de menor custo e toxicidade quando comparados ao método fluorimétrico (AOAC).

As principais vantagens apresentadas pelo método desenvolvido foram o tempo reduzido e o baixo custo por análise. O baixo consumo de solventes também pode ser considerado como grande vantagem da técnica, minimizando custos com tratamento de resíduos e impacto ambiental, podendo ser considerada então como sendo ecologicamente mais correta.

## 7. Referências Bibliográficas

AVELAR, Érica C., França, Adriana S. & Vany P. Ferraz. “Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos”. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. UNICAMP, 2005

BRASIL. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico: Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos. Portaria nº 685, de 27/08/1998. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

BUSTO, O. *et al.*. “Determination of biogenic amines in wine after clean-up by solid-phase extraction”. **Chromatographia**, 7-8(40):404-410, 1995.

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

DRIOUICH , Rim *et al.*. “Separation and determination of *n*-alkylamines and histamine by capillary zone electrophoresis using salicylaldehyde-5-sulfonate as a derivatizing reagent”. **Journal of Chromatography A**, 934:95–103, 2001.

GERVASIO, Ana P. G. *et al.*. “ Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação”. **Química. Nova**, 1(26):65-74, 2003.

GUIMARÃES, Judite L.. “Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado”. Tese de Doutorado, UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas: 2005 (PDF)

JORGENSON, J. W. e LUKACS K. D., "Zone Electrophoresis in Open-tubular Glass Cappilaries", *Anal. Chem.*, 1981, 53:1298, *apud* QUEIROZ, S C do N de; JARDIM, I C S F. Em CHEMKEYS. Disponível em <[http://www.chemkeys.com/bra/md/mds\\_11/elecap\\_4/fluele\\_2/fluele\\_2.htm](http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/fluele_2/fluele_2.htm)> Acesso em 02 de maio de 2008..

KOVÁCSA, Agnes, SIMON-SARKADI, Livia & GANZLER, Katalin. “Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis” . **Journal of Chromatography A**, 836:305–313, 1999.

KVASNICKA, Kvasnicka & Voldrich, Michal. "Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection". **Journal of Chromatography A**, 1103:145–149, 2006.

LANGE, J., THOMAS, Kathleen & WITTMANN, Christine. "Comparison of a capillary electrophoresis method with highperformance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples". **Journal of Chromatography B**, 779:229–239, 2002.

LIU, Xin, Li-Xiang YANG & Ying-Tang LU. "Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2- carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection". **Journal of Chromatography A**, 998:213–219, 2003.

MALE, Keith B. & LUONG, John H.T.. "Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence detection". **Journal of Chromatography A**, 926:309–317, 2001.

OGURI, Shigeyuki, OHTA, Yoshimi & SUZUKI, Chigusa. "Direct detection of endogenous histamine in rat peritoneal mast cells by in-capillary derivatization high-performance capillary electrophoresis". **Journal of Chromatography B**, 736:263–271, 1999

OGURI, Shigeyuki, WATANABE, Seiko & ABE, Shinobu. "Determination of histamine and some other amines by highperformance capillary electrophoresis with on-line mode in-capillary derivatization". **Journal of Chromatography A**, 790:177–183, 1997.

OMA – Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Fish and Other Marine Products. 35: 16-17, 1995

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

ROSSANO, Rocco *et al.*. "Influence of storage temperature and freezing time on histamine". **Journal Of Chromatography B**, 830:161–164, 2006.

SILVA, José A. F. da. "Detecção eletroquímica em eletroforese capilar". **Química. Nova**, 1(26): 56-64, 2003.

SKOOG, D., HOOLER, A., NIEMAN, T. A.. **Princípios de análise instrumental**. 5<sup>a</sup> ed.. Porto Alegre, Bookman, 2002 (Trad. Ignez Caracelli *at al.*).

TAVARES, Marina F. M.. "Eletroforese capilar: conceitos básicos". **Química Nova**, 2(19): 173-181, 1996.

WENG, Qianfeng, XIA, Fangquan & JIN, Wenrui. "Measurement of histamine in individual rat peritoneal mast cells by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection". **Journal of Chromatography B**, 779:347–352, 2002.

ZHANG, Li-Yao & SUN, Meng-Xiang. "Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection". **Journal of Chromatography A**, 1040:133–140, 2004.

ZHANG, Li-Yao, TANG, Xing-Chun & SUN, Meng-Xiang. "Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection". **Journal of Chromatography B**, 820:211–219, 2005.