



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5515 – Estágio Supervisionado

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO LABCAL
(LABORATÓRIO DE ANÁLISES) DA UFSC/FLORIANÓPOLIS/SC**

FELIPE BRESSAN BATISTA

**TATIANE DE ANDRADE MARANHÃO
GIUSTINO TRIBUZI**

Florianópolis, 6 de Fevereiro de 2023

Felipe Bressan Batista

DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM AMOSTRA DE PESCADO

Projeto de Estágio Supervisionado (QMC 5515)
apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
Desenvolvido no LABCAL (UFSC-CCA)
Supervisor do local de estágio, Giustino Tribuzi.

Florianópolis, 6 de fevereiro de 2023

Felipe Bressan Batista

Este Trabalho de Conclusão de Curso, referente ao estágio supervisionado, foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química.

Florianópolis, 10 de junho de 2023



Documento assinado digitalmente

TATIANE DE ANDRADE MARANHÃO

Data: 10/07/2023 15:40:22-0300

CPF: ***.638.324-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Tatiane de Andrade Maranhão

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	5
2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA REFERENTE AO PROJETO DA HISTAMINA EM PEIXES	7
4. OBJETIVOS.....	10
5. METODOLOGIA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTAGIO.....	11
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO.....	15
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	19
8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL.....	20
9. REFERÊNCIAS.....	22
10. ANEXO REFERENTE AO CERTIFICADO DE CONCLUSÃO DE ESTÁGIO.....	25

RESUMO

A histidina é um aminoácido encontrado nos seres vivos, possuindo diversas funções na produção e manutenção celular, e sua decomposição resulta na histamina, que também é encontrada em diversos animais. O excesso de histamina no corpo humano traz um quadro de intoxicação, seja produzido ou consumido. Dessa forma, é importante o consumo de alimentos com níveis baixos de histamina, porém, não é incomum que peixes tenham uma alta concentração de histamina devido ao seu mau armazenamento e condicionamento, de forma que em estado de decomposição ocorre o aumento do número de bactérias decompositoras que resultam na produção de histamina. Assim, é importante a quantificação da concentração de histamina que há nos peixes para ter controle se o mesmo está com qualidade e se a quantidade de histamina presente não é prejudicial e indicadora de má conservação do pescado. Dentro do período de estágio supervisionado no LABCAL do CCA da UFSC variada experiência na análise de alimentos foi adquirida. Destaca-se o início de otimizações metodológicas para o procedimento de extração da histamina em amostras de pescado para análise por HPLC. Foram analisadas a princípio apenas duas amostras, uma de Atum e outra de Manjuba Boca-Torta. Os resultados, comparados com a curva de calibração externa para as amostras mostraram que a metodologia de extração da histamina possibilitou uma recuperação de 70,5% a 87,0% considerando uma calibração contra padrões aquosos. Necessitando uma reavaliação das condições ótimas de extração como perspectiva futura. Os limites de detecção e quantificação instrumentais foram de 2,8 e 9,2 mg/L, considerando o fator de diluição da metodologia proposta, de 25 vezes, o limite de quantificação foi de 230 mg/L, que é superior ao valor preconizado pela legislação, reforçando a necessidade de mais otimizações na metodologia. Nas amostras não havia histamina em concentrações detectáveis pela metodologia proposta.

Palavras-chave: amina, análise, histamina, HPLC, peixe.

1. JUSTIFICATIVA

A análise de histamina em amostras de peixes é uma proposta relacionada a um projeto do Laboratório que visa avaliar a deterioração de peixes de acordo com a degradação da histidina em histamina, propondo desta forma a histamina como um marcador da qualidade de pescados. Considerando a localização do laboratório focado em análise de alimentos em uma região costeira, com alto consumo de pescados, a escolha do tema é de grande relevância, favorecendo a importância deste tipo de análise e a experiência para a vida profissional em áreas correlatas.

O tema mostrou-se atrativo por ser uma proposta a ser implementada requerendo investigações antes de virar procedimento de rotina do laboratório, além do mais, a proposta é diferente do aprendido na rotina já consolidada das análises diárias do laboratório. A proposta com metodologia para quantificação de histamina envolve a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência como a técnica de análise, e a possibilidade de um maior contato experimental com a técnica traz um diferencial e amplia o que foi visto no âmbito da graduação.

O projeto foi realizado no LABCAL e além da proposta de determinação de histamina, outras análises alimentícias rotineiras do laboratório foram realizadas. A experiência adquirida, tanto no âmbito do preparo de amostra quanto nas análises, devido à diversidade de equipamentos que o laboratório possui, foram de grande importância na vivência do estágio. Em especial destaca-se as determinações de sódio e a identificação de ácidos graxos, que por possuírem alta demanda no laboratório, foram realizadas diversas vezes, e assim, obtendo-se muita experiência em tais análises.

2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

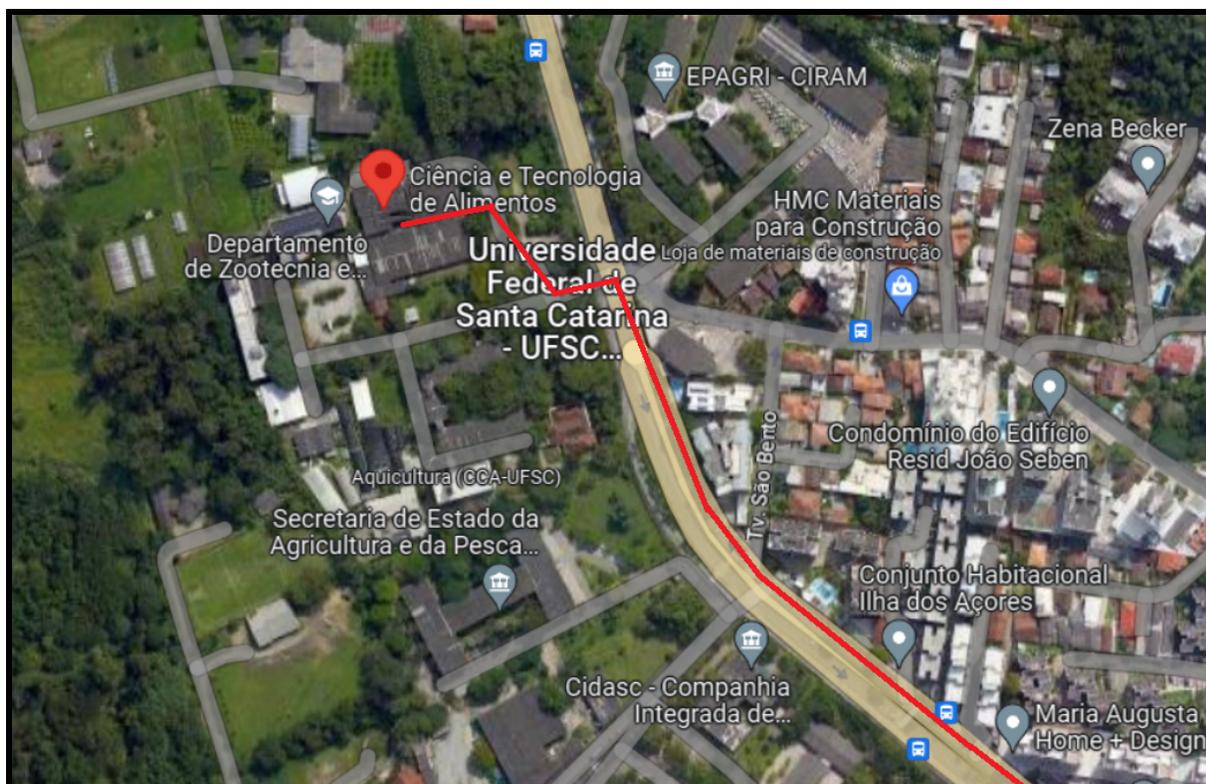
O LABCAL é um laboratório focado em análise de alimentos dentro da própria UFSC - Florianópolis, no Campus do CCA. Foi criado na década de 1980 dentro do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (CAL), na UFSC, inicialmente como uma atividade de extensão voltada para prestações de serviços para terceiros. Ao longo do tempo, foi modificando o escopo e aperfeiçoando suas análises para se adequar aos critérios de qualidade de laboratório, atualmente dito pela ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, a fim de ter a competência para a emissão de certificados sobre as análises realizadas. Assim, desde 1999 possui o reconhecimento junto ao Ministério de Agricultura e Abastecimento, tornando-se laboratório credenciado 5 anos depois.¹

As análises realizadas no LABCAL seguem os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, que dispõe de normas e requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração; dessa forma é possível garantir a qualidade das análises. Cada análise é feita a partir de demandas de empresas diversas que buscam o laboratório por necessitarem de uma ou mais determinações. Algumas delas são a determinação da quantidade de sódio, de cálcio, de proteína, identificação de ácidos graxos, corantes etc. Cada metodologia segue protocolos eficientes e validados para garantir a confiabilidade dos resultados.

O espaço do laboratório é amplo e organizado, possuindo salas e espaços que contam com diversos equipamentos e reagentes, específicos para cada etapa das análises feitas. Além dos EPI's e disponibilizados, o laboratório conta com a separação adequada dos resíduos, locais apropriados para o armazenamento de reagentes e equipamentos, e EPC's, como capelas de exaustão, chuveiro e lava-olhos, além de quatro portas de saída bem localizadas para supostas evacuações. O laboratório é composto principalmente por estudantes da própria UFSC (estagiários), além de haver responsáveis para assinar os relatórios e consentir com os resultados obtidos.

Pode-se chegar no laboratório seguindo a Rodovia Admar Gonzaga, sentido norte, e adentrando no Centro de Ciências Agrárias da UFSC, bairro Itacorubi, no qual o laboratório se encontra como mostrado na Figura 1.

Figura 1. Demonstração do caminho até o LABCAL.



Fonte: Google Maps.

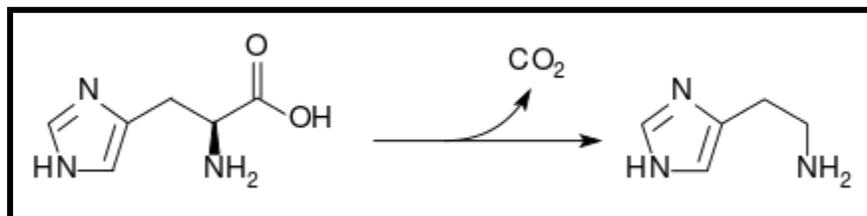
3. REVISÃO DA LITERATURA REFERENTE AO PROJETO DA HISTAMINA EM PEIXES

Os peixes são animais de grande distribuição e variedade utilizados principalmente para a alimentação. Além do valor energético, há diversos nutrientes e óleos que os compõem que são de grande valor para o ser humano, com enfoque nas proteínas e aminoácidos que os compõem, que são de grande importância para a saúde humana. Por se tratar de um alimento perecível, é de grande importância a estocagem em refrigeradores ou câmaras refrigeradas, isso desde a pesca do animal até o momento de seu consumo, evitando a sua degradação.²

A histamina é uma amina biogênica que pode ser encontrada nos animais devido à transformação da histidina, um dos aminoácidos presentes na proteína animal, em histamina pela descarboxilação da molécula. É possível a sua formação por via endógena, mas grande parte da existência da histamina é devido às atividades bacterianas que realizam a descarboxilação da histidina (Figura 2).³ Pela histidina ser

encontrada na musculatura animal, cada espécie de peixe possui concentrações de histidina e sua distribuição na musculatura diferentes. A Manjuba Boca-Torta e o Atum são, respectivamente, das famílias *Engraulidae* e *Scombridae*, que são duas das famílias de peixe que apresentam naturalmente alta quantidade de histidina livre na sua musculatura e conseqüentemente maior probabilidade de possuírem quantidades de histamina adequadas para quantificação.⁴

Figura 2. Esquema da descarboxilação da histidina.



Fonte: qnint.s bq.org.br.

O excesso de histamina no corpo humano causa escombrotóxicose, doença causada especialmente por peixes contaminados com altos níveis de histamina. Ainda que dure algumas horas ou poucos dias, a doença carrega alguns sintomas como: enrubescimento do rosto e pescoço seguido por dor de cabeça, sensação de calor intenso, diarreia e desconfortos gerais.⁶ Concentrações de histamina acima de 100 mg/L já atentam sobre a qualidade do produto, ainda que, supostamente, apenas concentrações acima de 1000 mg/L possam causar sintomas leves da doença.⁷

A concentração limite de histamina em peixes permitida pela legislação é de 100 ppm,¹⁷ e com objetivo de determinar tal concentração em uma amostra, é necessário o seguimento de normas técnicas, a fim de obter resultados válidos e fundamentados pela norma. A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 especifica os requisitos gerais para a imparcialidade, competência e operações consistentes de laboratórios, vigente para todas as organizações que realizam atividade laboratorial. Assim, se dispõe sobre a qualidade das instalações e estrutura, calibração de equipamentos e reagentes, confidencialidade de resultados etc., tornando possível a rastreabilidade metrológica por esta padronização, além da garantia dos resultados.¹⁸

A determinação e quantificação de histamina pode vir de diversos métodos e técnicas, como espectrofotometria, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar e eletrodo de íon seletivo.¹⁴ Cada uma possui seus métodos e singularidades, deste modo, a técnica de cromatografia líquida de alta

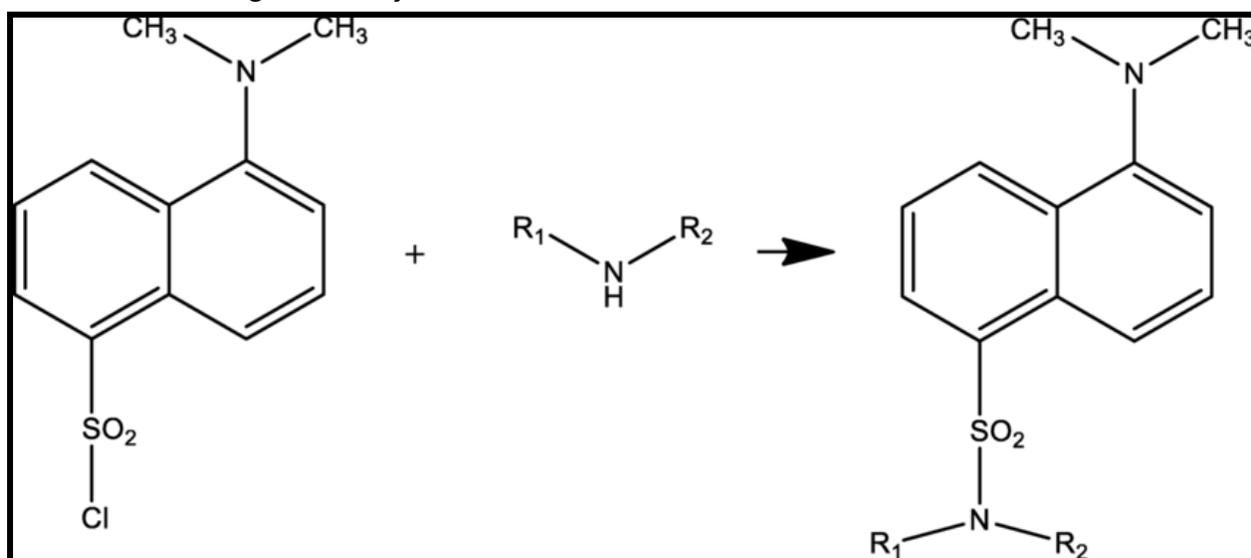
eficiência se torna possível. A cromatografia líquida de alta eficiência, de sigla HPLC (em inglês, High Performance Liquid Chromatography), é uma técnica de cromatografia eficiente com bom potencial de separação de componentes, ainda que haja outras técnicas mais eficazes, que trazem menor gasto de solvente e tempo para uma mesma separação.¹⁵

O funcionamento da técnica de HPLC consiste na passagem da fase líquida (solvente) contendo o analito por uma coluna de partículas com dimensões micrométricas que, pelas partículas estarem compactadas, a passagem do solvente acontece em alta pressão pela coluna.⁸ Conforme a força da interação intermolecular (polaridade) entre o analito aumenta com o solvente, ou diminui com a fase estacionária, a velocidade de passagem do analito pela coluna, e conseqüentemente o tempo de retenção, também aumentam. Dessa forma, para um solvente específico, o analito escolhido terá um tempo de retenção fixo para aquela coluna, sendo possível diferenciá-lo de outros componentes presentes na solução do analito, com cautela para que este pico apareça sem interferências de outros componentes com o tempo de retenção semelhante.⁹ Após a eluição, ao final da coluna, é utilizado um detector de arranjo de diodos (PDA), que realiza a leitura dos componentes em todas as faixas espectrais, onde cada comprimento de onda de um feixe, após passar pela amostra, é difratado e atinge um ponto específico neste arranjo, sendo assim detectado.¹⁶

Como a maioria das técnicas analíticas, o HPLC requer atenção quanto ao preparo de amostras, uma vez que a amostra originalmente é sólida e a técnica é voltada para introdução de amostras líquidas. Neste sentido, os procedimentos de extração se destacam pela simplicidade e ampla aplicação. O processo de extração da histamina de amostras de tecido de peixe pode ser realizado com ácido tricloroacético, que, de acordo com Saaid (2009, apud OLIVO, 2013), apresenta bons resultados de resolução de pico no equipamento em concentrações de 5% v/v a 10% v/v de ácido tricloroacético quando utilizados em peixes. Outros ácidos, como o ácido clorídrico, não são recomendáveis pois o extrato apresenta turbidez, dificultando a análise no equipamento, e o ácido perclórico, que ainda que apresente bons resultados, possui propriedades explosivas, exigindo cuidado quanto ao seu manuseio.^{3, 12, 13}

Para melhorar a eficiência da separação dos componentes, reduzindo o gasto de solvente, custo e tempo de eluição, é comum a prática da derivatização, que consiste em substituir uma parte do analito por outra escolhida a fim de aumentar ou diminuir o tempo de retenção do mesmo por alterar a polaridade da molécula.¹⁰ A derivatização de aminas alifáticas utilizando cloreto de dansila é comum por sua estabilidade após a reação com a molécula em relação ao orto-ftalaldeído, também utilizado como derivatizante de aminas, ainda que esse seja mais sensível e de derivatização mais rápida.^{3, 11} A histamina, sendo uma amina alifática, realiza a derivatização com o cloreto de dansila conforme a Figura 3:

Figura 3. Reação de cloreto de dansila com uma amina não-terciária.



Fonte: Food Analytical Methods por Springer Nature.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Iniciar avaliação de metodologia previamente proposta no laboratório, vinculada a dissertação da Gisele Olivo,² de quantificação de histamina em amostra de pescado no período de vigência do estágio como possibilidade futura de procedimento de rotina.

4.2. Objetivo específico

1. Proceder a extração de histamina nos peixes conforme dissertação (OLIVO, 2013).

2. Realizar a derivatização dos extratos e padrões para introdução no HPLC.
3. Avaliar o uso da estratégia de calibração aquosa para quantificação de histamina nas amostras.
4. Quantificar a histamina presentes em amostra de peixe via HPLC, realizando sua extração e a confecção de curvas de calibração referente à mesma, assim como os processos realizados no decorrer da análise.

5. METODOLOGIA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO

5.1. Equipamentos

Os instrumentos de análise para a determinação de histamina em peixes, aos quais obteve-se capacitação para a sua operação, são os seguintes: Cromatógrafo (SHIMADZU, Japão); Banho-Maria (TECNAL, Brasil); Centrífuga, modelo Super II (I.T.R., Brasil); Banho Ultrassônico (Lojanetlab, Brasil); Vórtex Mixer (KASVIbasic, Brasil); Balança analítica, 4 dígitos (SHIMADZU, Japão).

5.2. Configuração do cromatógrafo utilizado

O cromatógrafo (equipamento referente à técnica HPLC) da Shimadzu foi operado com certas configurações que promovem a leitura eficiente da histamina derivatizada. Foi utilizado para a cromatografia de fase reversa uma coluna Eclipse Plus (Agilent Technologies) C18 de dimensões 3,0 mm x 100 mm, com partículas de 3,5 µm da fase estacionária, utilizando o arranjo de diodos como técnica de detecção. O aplicativo referente à utilização cromatógrafo é o LC Solution.

Todas as eluições realizadas no equipamento tiveram 20 min de duração, com a leitura iniciando aos 3 min. O forno da coluna operou com temperatura constante de 40 °C e vazão da fase móvel foi de 0,5 mL/min com pressão média de 80 kgf/cm², com o intuito de não ultrapassar a pressão limite da bomba de 102 kgf/cm². A fase móvel é composta por Acetonitrila e Água ultrapura, mas para otimizar a separação dos picos obtidos no software e facilitar a leitura do pico correspondente à histamina, foi utilizado o método de gradiente de baixa pressão, que muda a concentração da fase móvel ao longo do tempo conforme mostrado na Tabela 1

Tabela 1. Gradiente de concentração da fase móvel ao longo da eluição.

Fração de tempo	Concentração de Acetonitrila	Concentração de Água ultrapura
Até 3 min	60%	40%
De 3 a 6 min	75%	25%
De 6 a 10 min	95%	5%
De 10 min ao final	60%	40%

Fonte: Arquivo pessoal.

O volume de amostra retirado dos vials para cada eluição no equipamento foi de 20 µL.

5.3. Reagentes

Os reagentes utilizados foram baseados em um método de quantificação de histamina (OLIVO, 2013), alguns substituídos devido à sua disponibilidade no laboratório. São eles: solução de dicloridrato de histamina (Sigma-Aldrich, EUA) 10000 ppm em ácido clorídrico (37% P.A., NEON, Brasil) 0,1 M; solução de cloreto de dansila (Sigma-Aldrich, EUA) 10 mg/mL em acetona (P.A., Êxodo Científica, Brasil); solução de ácido tricloroacético (Dinâmica, Brasil) 6%; solução de bicarbonato de sódio (Dinâmica, Brasil) saturada; solução de hidróxido de amônio (30% P.A., NEON, Brasil) 25%, 1,7-diaminoheptano (Sigma-Aldrich, EUA) 1,28 mg/mL; acetonitrila (P.A., Merck, Alemanha).

5.4. Amostras

Foram utilizadas três amostras para a realização do experimento: Atum cru, para a realização da curva de adição de padrão, Atum assado e Manjuba Boca-Torta enlatada como amostras para quantificação de histamina.

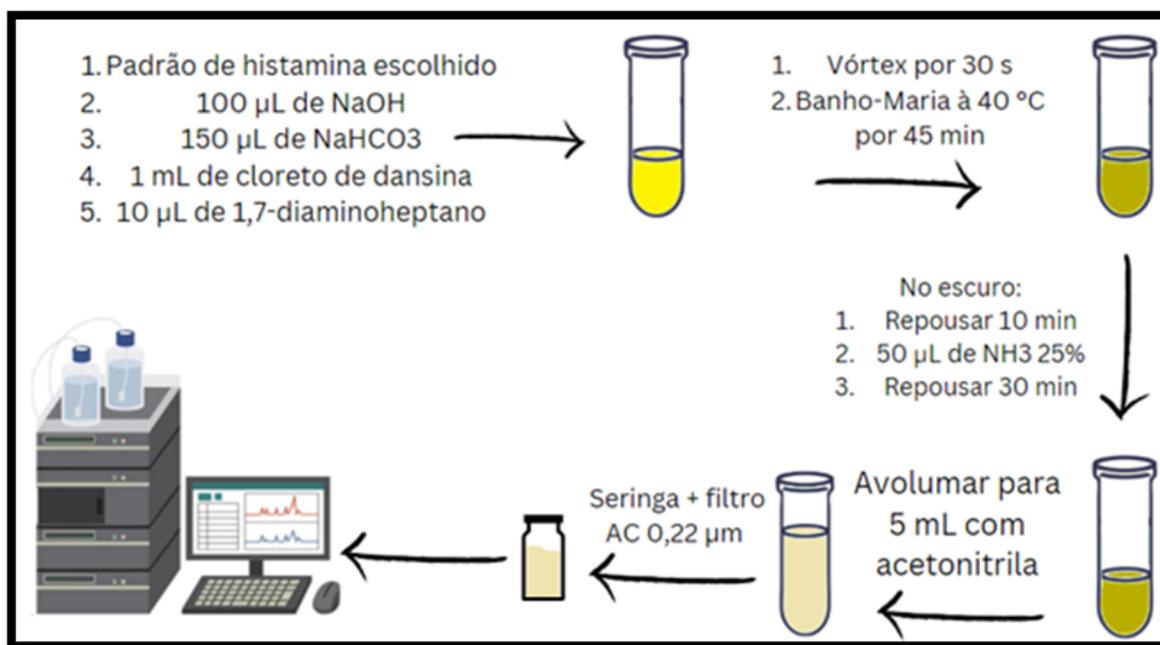
5.5. Preparação da curva de calibração

A curva de calibração de histamina foi preparada a partir de um padrão-estoque de concentração de 2000 mg/L. Concentrações crescentes de 5 ppm a 100 ppm e um branco dos reagentes foram preparadas, os volumes de padrão de histamina foram

adicionados diretamente em 8 tubos tipo Falcon de 15 mL, seguidos da adição de 100 μL de NaOH 2 mol/L, 150 μL de NaHCO_3 saturado, 1 mL de cloreto de dansila 10 g/L e 10 μL de 1,7-diaminoheptano em cada frasco. As soluções preparadas foram submetidas à agitação no vórtex por 30 s e deixou-se os tubos em banho-maria à 40 °C por 45 min. Após o banho-maria, deixou-se os tubos ao abrigo da luz por 10 min, em seguida, foi adicionado aos tubos 50 μL de hidróxido de amônio 25% e levados novamente ao vórtex por 30 s e ao abrigo da luz por 30 min. O volume final das soluções foi de 5 mL, avolumado com acetonitrila.

Após a adição de acetonitrila, os tubos foram levados ao vórtex por 30 s e levados à centrifuga por 2 min. O conteúdo de cada tubo foi filtrado com filtro de acetato de celulose de 0,22 μm e cerca de 1,5 mL do filtrado foi transferido para um vial de 2,0 mL. O filtrado, cerca de 20 μL , foi diretamente injetado no HPLC e o restante descartado. É possível representar o procedimento experimental conforme Figura 4.

Figura 4. Esquema da etapa de derivatização.



Fonte: Arquivo pessoal; google.com.

5.6. Preparo da amostra para recuperação da histamina

Uma amostra de pescado de atum fresco foi triturada a frio em um liquidificador e adicionada em 8 tubos tipo falcon de 50 mL em porções aproximadas de 10 g. A cada

uma, foi adicionado o mesmo volume de histamina de cada ponto da curva de calibração do item 5.2. Após, cada tubo foi levado ao vórtex por 30 s e ao congelador por 24 h, para continuar o processo no dia seguinte.

Após a retirada do congelador e a espera para que a amostra descongelasse, cada tubo foi completado para 25 mL com ácido tricloroacético e levados ao vórtex por 1 min, na sequência levado ao banho ultrassônico por 15 min e por fim levado à centrífuga em 3000 rpm por 15 min. Cada solução foi filtrada para novos tubos Falcon de 50 mL utilizando funil e papel filtro. Com auxílio de micropipetas, 0,5 mL de cada solução filtrada foi adicionada a tubos tipo falcon de 15 mL e o restante armazenado na geladeira para que, caso necessário, o procedimento experimental pudesse ser repetido sem a necessidade de extrair a histamina do peixe novamente.

Foi adicionado aos tubos tipo falcon contendo 0,5 mL de extrato: 100 µL de NaOH 2 mol/L, 150 µL de NaHCO₃ saturado, 1 mL de cloreto de dansila 10 mg/mL e 10 µL de 1,7-diaminoheptano. Após agitação no vórtex por 30 s, os tubos foram deixados em banho-maria a 40 °C por 45 min.

Após o banho-maria, deixou-se os tubos ao abrigo da luz por 10 min, em seguida, foi adicionado aos tubos 50 µL de hidróxido de amônio 25% e levados novamente ao vórtex por 30 s e ao abrigo da luz por 30 min. Cada tubo foi avolumado para 5 mL com acetonitrila e levados ao vórtex por 30 s e à centrífuga por 2 min. O conteúdo de cada tubo foi filtrado (filtro AC 0,22 µm) para um vial de 1,5 mL e direcionado ao cromatógrafo. Cerca de 20 µL, foi diretamente injetado no HPLC via autoamostrador.

5.7. Preparo das amostras para análise por HPLC

Para as amostras de pescado de Atum assado e de Manjuba Boca-Torta enlatado. Aproximadamente 10 g cada amostra foi preparada em duplicata, e cada uma acondicionada em um tubo falcon de 50 mL. Cada tubo foi levado ao vórtex por 30 s e ao congelador por 24 h, para continuar o processo no dia seguinte. O restante do processo é equivalente ao item 5.6, começando a partir da retirada do congelador.

5.8. Segurança e resíduos gerados

O laboratório possui todos os EPC's necessários para a realização das suas análises e especialmente à análise de histamina. EPI's como jalecos, luvas e óculos de proteção são oferecidos pelo laboratório, ainda que seja de escolha os possuir individualmente. As capelas e luvas foram amplamente utilizadas por se trabalhar com amônia, volátil e perigoso caso entre em contato com olhos e pele, ácido tricloroacético, muito higroscópico e danoso em contato diretamente com a pele, e cloreto de dansila, que causa irritação em contato com a pele. Demais reagentes são comuns e pouco prejudiciais em contato com a pele, mas o uso da luva continuou indispensável.

Os resíduos sólidos gerados, como o peixe utilizado e o papel filtro, são descartados em lixeiras especiais espalhadas pelo laboratório para fins de lixo contaminado. Os resíduos líquidos gerados eram separados em 2 bombonas diferentes:

1. Resíduos da análise de amostra: os resíduos gerados pelo cromatógrafo utilizado, ou seja, os solventes utilizados na coluna para a identificação do conteúdo dos vials, são separados como resíduos do cromatógrafo.

2. Resíduos do preparo de amostra: todos os demais resíduos gerados, como a sobra de cada etapa do preparo de amostra e também o descarte do conteúdo restante dos vials e tubos falcon, foram adequadamente despejados em uma bombona, previamente identificada, para que posteriormente o laboratório faça o descarte planejado daquele conteúdo, sem misturar com o resíduo do cromatógrafo, considerado menos contaminado, ou com descartes das demais análises. Assim, após o descarte correto de cada resíduo, o órgão responsável pela coleta a realiza.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO

6.1. Curva de calibração e limites de quantificação e detecção

A curva de calibração aquosa de histamina foi realizada, a faixa linear de trabalho foi de 10 ppm a 100 ppm, branco dos reagentes foi considerado na curva, a

área obtida a partir da leitura das áreas obtidas no software do cromatógrafo. Os valores do coeficiente de determinação, assim como a equação da reta são:

$$R^2 = 0,9988$$

$$Y = 295234,89 X - 334213,40 \text{ (equação 1)}$$

Os ensaios de adição e recuperação de histamina considerando a presença de amostra de tecido de peixe no procedimento de derivatização foram realizadas considerando procedimento similar a confecção de uma curva de calibração de adição do padrão, de forma que sob cerca de 10 g de pescado foram adicionadas concentrações de histamina de 10 ppm a 100 ppm, assim como também foi realizada o ponto de adição zero que trata-se apenas de tecido de pescado submetido ao processo de derivatização. A área obtida a partir da leitura dos picos para as amostras enriquecidas no software do cromatógrafo, permitiram a obtenção de outra equação de reta. Os valores do coeficiente de determinação, assim como a equação da reta são:

$$R^2 = 0,9994$$

$$Y = 216437,09 X - 204166,81 \text{ (equação 2)}$$

Um teste t para 95% de confiança foi realizado para avaliação se a diferença entre os coeficientes angulares das duas curvas de calibração foi significativa. O valor de t calculado obtido foi de 3,54 ($t_{\text{critico}} = 2,45$, $n=8$, $GL=6$) indicando que há diferença significativa entre as duas estratégias avaliadas. Através da análise de regressão das áreas de pico obtidas para as diferentes concentrações avaliadas nas duas estratégias de calibração, Figura 5, mostra que o coeficiente de correlação foi próximo a 1, os intervalos de confiança do coeficiente linear passam pelo zero, no entanto, o do coeficiente angular não passa pelo valor 1 indicando a presença de erros sistemáticos possivelmente proporcionado pelo efeito de matriz, fazendo-se interessante investigar com mais atenção o efeito da matriz. Esse resultado ressalta a importância de reavaliação do procedimento experimental.

Utilizando a Equação 1 com os valores obtidos para as amostras enriquecidas que compõem os pontos que construíram a equação 2, a recuperação de histamina foi de 70,5% a 87,0%.

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram determinados a partir da curva analítica, utilizando o desvio padrão do coeficiente linear multiplicado por 3 e dividido pelo coeficiente angular.⁵ Assim, os valores de LD e LQ são:

$$LD = 2,2 \text{ mg L}^{-1} // LQ = 7,3 \text{ mg L}^{-1}$$

Porém, o limite de quantificação se torna maior que o menor valor de concentração da curva de calibração inicialmente proposta, que era 5 mg L^{-1} , dessa forma, deve-se realizar uma nova curva de calibração sem considerar tal valor, de forma que todos os outros valores da curva se encontrem acima do limite de quantificação. Com isso, a nova curva de calibração (equação 3), possui:

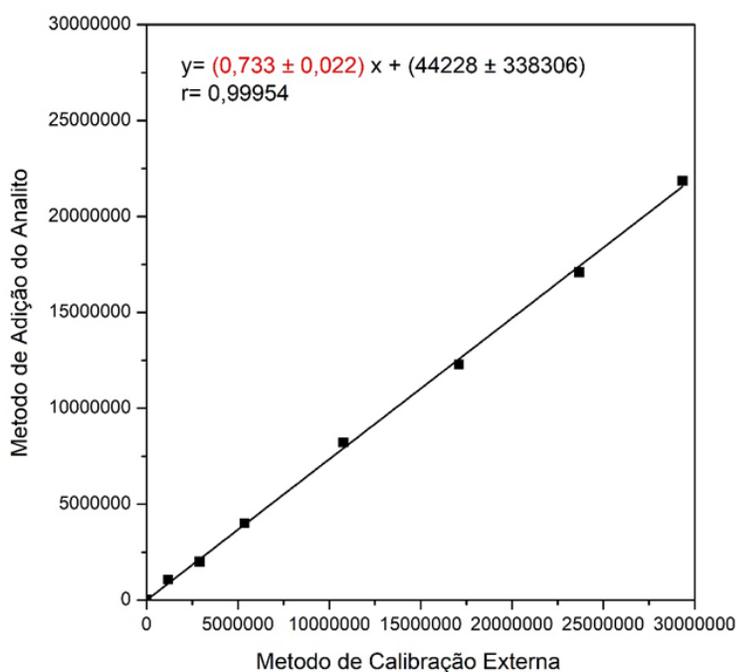
$$R^2 = 0,9995$$

$$Y = 295428,24.X - 272721,97 \text{ (equação 3)}$$

$$LD = 2,8 \text{ mg L}^{-1} // LQ = 9,2 \text{ mg L}^{-1}$$

A partir desses valores e das análises estatísticas realizadas, é possível determinar com precisão e exatidão a concentração de histamina derivada nas amostras de peixes.

Figura 5. Análise de regressão linear para comparação dos métodos de calibração.



Fonte: Arquivo pessoal.

Considerando a curva de calibração com concentração inicial de 10 mg/L, o cromatograma referente à curva para cada concentração pode ser visto na Figura 6. A linha de coloração preta refere-se a uma leitura do equipamento irrelevante para qualquer etapa da análise, mas que não pôde ser retirado da imagem, contudo, na linha de coloração rosa, refere-se ao pico da histamina após derivatização para os padrões aquosos da curva, é possível observar o gradiente de concentração que ocorre em aproximadamente 6,5 min, referente ao espectro de 254 nm para leitura, aumentando a área conforme o aumento da concentração.

Figura 6. Cromatograma referente à curva de calibração.

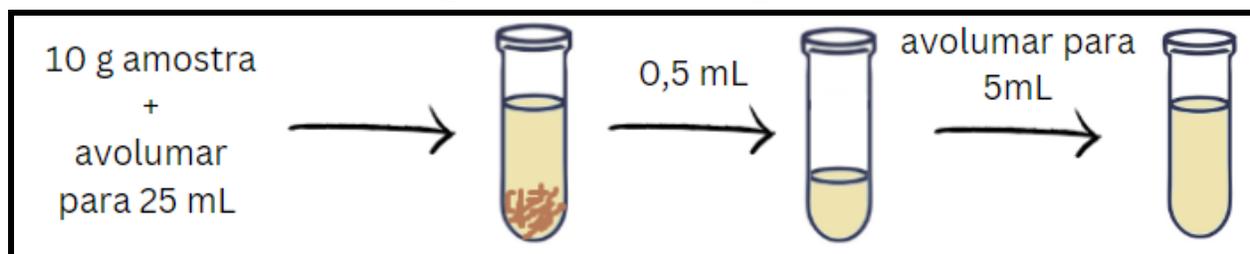


Fonte: Arquivo pessoal.

6.2. Cálculo da diluição e valor real da concentração

Foram realizadas 2 diluições na preparação da análise dos peixes. Inicialmente, 10 g de peixe foram diluídos em um total de 25 mL de solução com ácido tricloroacético. Dessa solução, 0,5 mL foram utilizados para a derivatização, que ao fim, foi avolumada para 5 mL. Respectivamente houve 2 diluições, de 2,5 e 10 vezes, equivalente a uma só diluição de 25 vezes, como representado na Figura 7.

Figura 7. Esquema das diluições realizadas.



Fonte: Arquivo pessoal; google.com.

Dessa forma, ao realizar a leitura do equipamento e realizar o cálculo para uma faixa de recuperação da histamina de 70,5% a 87,0%, o valor real da concentração de histamina do peixe será 25 vezes maior que o valor obtido experimentalmente.

6.3. Amostra de Atum e Manjuba Boca-Torta

Tanto para a amostra de Atum quanto para a de Manjuba Boca-Torta, e suas duplicatas, utilizando os métodos descritos, não foram encontradas concentrações detectáveis de histamina, estas não apresentaram valores de área no software do equipamento. Como sequer algum traço foi apresentado no software, de modo a alterar a linha base do equipamento, pode-se afirmar que, por conta da diluição realizada, os vials direcionados ao cromatógrafo estavam com uma concentração de histamina derivatizada menor que o LQ. Dessa forma, é possível afirmar que ambos os peixes, considerando a diluição do item 6.2, estão com uma concentração de histamina menor que 9 mg L^{-1} .

A diluição de 25 vezes realizada pode ter causado a ausência do sinal de histamina no cromatógrafo. Uma das alternativas para contornar essa ausência seria diminuir o fator de diluição. Contudo, também existe a possibilidade de ambos os peixes estarem com baixos valores de concentração histamina, que da mesma forma dificulta a detecção pelo equipamento. As duas hipóteses, não necessariamente, podem se complementar para o resultado obtido.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

É possível identificar a histamina derivatizada por cromatografia líquida utilizando os métodos descritos, contudo, as diluições realizadas e a concentração de

histamina originalmente nas amostras de peixe são os dois fatores que afetam o resultado significativamente. Os resultados mostraram uma baixa concentração da histamina derivatizada os extratos, no entanto o método ainda não encontra-se adequado fazendo-se necessário realizar mais otimizações quanto a estratégia de calibração, aplicar o procedimento a um número maior de amostras em diferentes estados de decomposição, aplicar com menores valores de diluição aos extratos, são perspectivas para avaliação da aplicabilidade do procedimento na rotina do laboratório.

A utilização de alguns reagentes e dos equipamentos são devidamente controlados devido aos preços de aquisição e utilização, assim, as análises não poderiam ser feitas em larga escala no período do estágio supervisionado pois poderiam prejudicar o andamento de outras análises e o orçamento do laboratório. Contudo, foi o suficiente para adquirir o conhecimento do tema e da proposta na qual foi baseado o procedimento, que abre a possibilidade de evoluir a pesquisa, como o enfoque em diferentes espécies de peixes e em como otimizar a extração e detecção da histamina.

8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL

O tempo investido no estágio trouxe experiências profissionais na área de processos químicos e de equipamentos que foram utilizados por diversas vezes, como também na logística de trabalhar num laboratório com outros profissionais. Além da área química do laboratório, o fato de possuir horário para ser cumprido, obter conhecimento dos preços de reagentes e equipamentos, como também atividades sendo cobradas em momentos de alta e baixa demanda de análises, contribuem para um futuro profissional onde as responsabilidades serão maiores e em maior número.

A experiência instrumental adquirida no laboratório durante o projeto e atividades realizadas teve uma grande contribuição para o âmbito profissional, comparados à graduação onde tais equipamentos são vistos e utilizados poucas vezes. No estágio, o contato com equipamentos, com enfoque no fotômetro de chama e cromatógrafos referentes às técnicas de GC e HPLC (cromatografia gasosa e líquida, respectivamente), são de extrema importância visto a área que almejo seguir

profissionalmente. Tais equipamentos foram semanalmente vistos e alguns trabalhados, gerando maior conhecimento do funcionamento de cada um, considerando um diferencial para a contratação para diversas indústrias.

9. REFERÊNCIAS

[1] Universidade Federal de Santa Catarina. **Labcal 2023**: Sobre o Labcal. Disponível em: <<https://labcal.inffoc.com.br/>>. Acesso em: 04 jun. 2023.

[2] OLIVO, G. “**VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM MATRIZ DE ATUM (Thunnus spp)**”. 2013. Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

[3] PA, Joshi et al. “**Study of Histamine Forming Bacteria in Commercial fish samples of Kalyan city**”. International Journal of Current Scientific Research. Department of Microbiology, Birla College, Kalyan, Maharashtra 421304 , India, 2011.

[4] HUNGERFORD, James M. “**Histamine and Scombrottoxins**”. Toxicon, U.S. Department of Health and Human Services, 2021.

[5] INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008, revisão 5, 2016.

[6] DA SILVEIRA, Natália A. “**Escombrototoxicose: aspectos clínicos e de prevenção desta intoxicação alimentar**.” Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU, São Paulo, 2009.

[7] JAY, J.M. “**Microbiologia de Alimentos**”. 6.ed, p.656-657, São Paulo: Artmed, 2005.

- [8] LINDSAY, Sandie. **“High Performance Liquid Chromatography”**. John Wiley & Sons, 2ª edição. Newham Community College, 1992.
- [9] HORVÁTH, C. **“High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives”**. Academic Press, Volume 2. Department of Engineering and Applied Science, Yale University, New Haven, Connecticut, 1980.
- [10] DANIELSON, Neil et al. **“Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis”**. John Wiley & Sons, Encyclopedia of Analytical Chemistry pp. 7042–7076. Miami University, Oxford, USA, 2000.
- [11] C. Molins-Legua et al. **“Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC”**. Departament de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de Valencia, Valencia, Spain, 1999.
- [12] KOUNNOUN, A. et al. **“Development and Validation of a TLC-Densitometry Method for Histamine Monitoring in Fish and Fishery Products”**. Laboratory of Applied Biology and Pathology, Department of Biology, Faculty of Sciences of Tetouan, Abd Al Malek Essaadi University, Morocco, 2020.
- [13] COSTALONGA, A.G.G. et al. **“Normas de armazenamento de produtos químicos”**. Curso de higiene e segurança. Unesp, Araraquara, 2010.
- [14] AKBARI-ADERGANI, B. et al. **“Ultrasensitive flow-injection electrochemical method for determination of histamine in tuna fish samples ”**. Food & Drug Laboratories Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran, 2010.

[15] BEHNOUSH, B. et al. “**Comparison of UHPLC and HPLC in Benzodiazepines Analysis of Postmortem Samples**”. Department of Forensic Medicine, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, 2015.

[16] ARTVAS, T. et al. “**Espectroscopia Eletrônica de Absorção**”. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, São Paulo, Brasil, 2002.

[17] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019**. Diário Oficial da União, 26 de Dezembro de 2019.

[18] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Brasil, 19 de Dezembro de 2017.

10. ANEXO REFERENTE AO CERTIFICADO DE CONCLUSÃO DE ESTÁGIO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Rodovia Admar Gonzaga, 1346 - Itacorubí - Florianópolis - SC - Brasil - CEP 88034-001
TELEFONE: (48) 37215388

Florianópolis, 12 de junho de 2023.

CERTIFICADO DE CONCLUSÃO DE ESTÁGIO

Declaro, para os devidos fins, que o discente Felipe Bressan Batista, matrícula UFSC 19150245, realizou estágio obrigatório no Núcleo de Análise Físico-químicas do LABCAL, entre 06/02/2023 e 12/06/2023, totalizando uma carga horária de 450 h.

O estagiário teve um excelente desempenho, assiduidade e proatividade e contribuiu significativamente às atividades do laboratório.



Documento assinado digitalmente

Giustino Tribuzi

Data: 12/06/2023 11:20:47-0300

CPF: ***.688.569-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Professor Giustino Tribuzi
Coordenador Núcleo de Análises Físico-químicas LABCAL
Chefe do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos