



Margarida Corte - Real Maia

Ocorrência de histamina em produtos alimentares disponíveis no mercado: qual o risco do seu consumo?

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e coorientada pela Professora Doutora Sofia Alexandra Giestas Cancela Duarte e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Margarida Corte - Real Maia

Ocorrência de histamina em produtos alimentares disponíveis no mercado: qual o risco do seu consumo?

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena
e coorientada pela Professora Doutora Sofia Alexandra Giestas Cancela Duarte e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Na recta final deste trabalho e também do meu percurso académico gostaria de agradecer a todos os que contribuíram para a sua concretização.

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Sofia Duarte por toda a sua dedicação, transmissão de conhecimentos, competência, compromisso, disponibilidade, motivação e rigor científico, foram essenciais para a elaboração e, conseqüentemente, para a conclusão deste trabalho.

À Professora Doutora Angelina Pena pela disponibilidade demonstrada e também pela sugestão do tema do meu trabalho.

A toda a equipa da Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG) com quem contactei, que tão bem me acolheram, em especial à Professora Doutora Anabela Almeida por toda a transmissão de conhecimentos e preocupação demonstrada para comigo.

A toda a minha família pelo apoio e incentivo. Em especial ao meu primo Hugo e à minha prima Joana por terem estado sempre presentes.

Ao André por toda a paciência e incentivo para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas por toda a ajuda e apoio que recebi para a elaboração deste projeto.

Agradeço também a todos aqueles que não estão aqui mencionados mas que de alguma forma, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos na execução desta dissertação.

Por último, mas não menos importante, à minha mãe por todas as oportunidades que me proporcionou até agora e por todo o carinho demonstrado.

Resumo

A alimentação assume um papel determinante na qualidade de vida do ser humano. Com o crescente aumento do aparecimento de novos produtos no mercado, fruto da globalização, é importante e necessário que haja um rigoroso controlo de qualidade e segurança de cada produto.

Atualmente existem várias organizações nacionais, europeias e também mundiais que têm como principal objetivo regulamentar e controlar vários parâmetros (biológico, químico, físico e organolético) que garantam que o alimento é seguro para o consumidor.

A histamina foi descoberta em 1910 por Dale e Laidlaw, posteriormente, em 1932, foi identificado como um mediador de reações anafiláticas. A histamina (2-[4-imidazolil]etilamina) é uma amina biogénica, sendo sintetizada através do aminoácido histidina, sob ação da L-histidina descarboxilase.

Importa referir que a histamina é bastante estável ao calor, o que faz com que a confeção normal dos peixes ou outros alimentos, e mesmo a sua esterilização no caso das conservas de peixe não seja suficiente para a sua eliminação. A problemática da histamina prende-se com os possíveis riscos para a saúde do consumidor.

Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial risco para o consumidor de produtos alimentares, neste caso conservas e patês de peixe, da ocorrência de histamina.

Não foi detetada em nenhuma das 40 amostras analisadas.

Palavras-chave:

Aminas, conservas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), histamina, histidina, intoxicação alimentar, ELISA, patês.

Abstract

Food assumes a determinant role in the quality of life of the human being. With the growing emergence of new products in the market, because of globalization, it is important and necessary to have a rigorous quality and safety control of these products.

Nowadays there are several national, european and international organizations responsible for the regulation and control of different parameters (biological, chemical, physical and organoleptic), thus guarantying that food is safe for consumer.

Histamine was discovered in 1910 by Dale and Laidlaw and, later in 1932, it was identified as a anaphylactic reactions mediator. Histamine (2-[4-imidazolil] etilamine) is a biogenic amine, synthesized through histidine amino acid, under the action of L-histidine decarboxylase.

It is important to mention that histamine is very stable to heat, and for that reason, regular cooking, as well as sterilization as in the case of canned fish, isn't enough for its elimination. The problem with histamine are the possible risks that it can pose to the consumer's health.

Following this, the objective of this work was to evaluate the potential risk for consumers of food products, in this case, canned fish and pates that contain high concentrations of histamine.

No histamine was detected in any of the 40 samples analyzed. The results suggest that the production of the analyzed canned and pates is safe as regards the prevention of contamination by histamine. The results obtained in this study differ from those reported in previous studies.

Key-words:

Amines, canned, ELISA, food poisoning, histamine, histidine, pates.

Índice geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
<i>Abstract</i>	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
I. Revisão Bibliográfica	I
I. Nota Histórica	1
II. Consumo de peixe e produção de conservas de peixe	2
III. Aminas	5
IV. Histamina	5
V. Efeitos tóxicos	6
VI. <i>Histamine fish poisoning (SFP)</i>	7
VII. Apresentação Clínica	9
VIII. Ocorrência	10
IX. Limites estabelecidos	12
X. Condições de armazenamento	13
XI. Métodos de determinação de histamina	13
II. Trabalho original	17
1. Objetivos	17
2. Material e métodos	17
2.1. Amostragem	17
2.2. Procedimento	18
a. Preparação das amostras	18
b. Procedimento para a derivatização	18
c. Procedimento para o método de ELISA	18
d. Quantificação da histamina	19
e. Cálculo da ingestão diária estimada	19
3. Resultados e discussão	20
3.1. Determinação pelo método de ELISA	20

4. Conclusão	26
5. Bibliografia	27

Índice de figuras

Figura 1 - Top 20 dos maiores países consumidores de peixe (Adaptado de FAO, 2014)....	3
Figura 2 - Reação de síntese da histamina (Adaptado de FAO, 2004).....	6
Figura 3 - Distribuição das causas de surtos alimentares associadas ao consumo de peixes e derivados de peixes, em 2011, na UE (Adaptado de EFSA, 2013).....	10

Índice de tabelas

Tabela 1 - Total de peixe capturado (Milhões de toneladas), em todo o mundo, entre 2011 e 2012 (adaptado de FAO, 2012).....	2
Tabela 2 - Toneladas de conservas de peixe importadas/exportadas (DataPesca,2014).....	4
Tabela 3 - Casos de surtos de SFP ocorridos, no mundo, em 2013 (adaptado de RASFF, 2014).....	11
Tabela 4 - Comparação dos métodos mais utilizados na determinação de histamina (adaptado de AOAC 977.13; Duflos <i>et al.</i> , 1999; FAO/WHO, 2012; Sato <i>et al.</i> , 2005).....	14
Tabela 5 - Comparação das vantagens e desvantagens entre o método ELISA e HPLC (adaptado de Marcobal <i>et al.</i> , 2005; FAO/WHO, 2012).....	15
Tabela 6 - Estudos realizados para a determinação de histamina.....	22

Lista de abreviaturas

ANICP - Associação Nacional dos Industriais de Conservas de Peixe

AOAC - do inglês *Association of Official Analytical Chemist* (Associação Oficial de Químicos Analíticos)

ASAE - Autoridade de segurança alimentar e económica

DAO - do Inglês *Diamine Oxidase* (Oxidases de diamina)

EDI - do Inglês *Estimated Daily Intake* (Ingestão Diária Estimada)

EFSA - do inglês *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

ELISA - do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio de imunoenzimático)

EUMOFA - do inglês *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products* (Observatório do Mercado Europeu das Pescas e Produtos de Aquacultura)

Exp - Exportado

FAO - do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas)

FDA - do inglês *Food and Drug Administration* (Autoridade de segurança Alimentar Americana)

HACCP - do inglês *Hazard Analysis and Critical Control Points* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)

HPLC - do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Imp - Importado

INE - Instituto Nacional da Estatística

MAO - do Inglês *Monoamine Oxidase* (Oxidases de monoamina)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAO - do Inglês *Polyamine Oxidase* (Oxidases de poliamina)

RASFF - do inglês *Rapid Alert System for Food and Feed* (Sistema Rápido de Alerta para Alimentos e Rações)

SFP - do inglês *scombroid fish poisoning* (Intoxicação por histamina/ intoxicação escombroide)

UE - União Europeia

I. Revisão Bibliográfica

I. Nota Histórica

Os alimentos não contêm apenas nutrientes, podem conter também substâncias químicas naturais resultando em intoxicações alimentares (Dabrowski, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma doença de origem alimentar é frequentemente de natureza tóxica ou infecciosa, consequência da entrada de agentes patogénicos, através da ingestão de alimentos ou água (ASAE, 2015).

As doenças de origem alimentar podem ser divididas em dois grandes grupos: infeções alimentares e intoxicações alimentares. As infeções alimentares ocorrem após a ingestão de um determinado alimento contaminado com um microrganismo patogénico que tem capacidade de crescer no trato gastrointestinal. Os sintomas surgem após um período de incubação, que pode variar entre algumas horas, dias ou até mesmo semanas, visto ser necessário que o microrganismo se multiplique. As intoxicações alimentares decorrem da ingestão de alimentos que contêm substâncias tóxicas, com origem no próprio alimento, de natureza microbiana ou química (ASAE, 2015).

A contaminação dos alimentos pode surgir por via direta ou indireta. Uma contaminação direta ocorre quando a substância tóxica está presente na matéria-prima. Por outro lado, a contaminação indireta pode ocorrer durante o processamento, manipulação ou preparação do alimento para posterior armazenamento (Dabrowski, 2004).

Em 1804, Nicolas Appert, considerado o pai da conservação dos alimentos, descobriu que se o alimento cozinhado fosse colocado num frasco de vidro hermeticamente fechado este não se iria degradar. Desta forma os alimentos podiam ser armazenados por longos períodos (Food Quality, 2011).

Mais tarde, em 1823, Peter Durand aperfeiçoou e patenteou a lata de metal para conservar comida. Posteriormente, Pasteur demonstrou os princípios científicos do processo. Esse processo foi o primeiro a ser utilizado para alimentos pré-cozinhados (Silva, 2015).

A primeira indústria de conservas em Portugal surgiu em 1865, em Vila Real de Santo António, para a produção de conservas de atum. Mais tarde, em 1889, surgiu em Setúbal a

indústria de conservas de sardinhas (Tengarrinha, 2013). Em 1938 existiam cerca de 152 fábricas dedicadas à produção de conservas de peixes, produzindo 34 mil toneladas. (Castro e Melo, 2015).

Durante a Primeira Guerra Mundial, as conservas portuguesas serviram para alimentar os soldados Portugueses e seus aliados (Silva, 2015).

II. Consumo de peixe e produção de conservas de peixe

O peixe assume um papel de importância na dieta humana, fornecendo cerca de 20% da ingestão média de proteínas animais a 2,9 milhões de pessoas (FAO, 2014).

No ano de 2012 a captura de peixe a nível global assumiu um valor máximo de 86,6 milhões de toneladas, das quais 11,6 milhões de toneladas correspondem a capturas em água doce (Tabela I) (FAO, 2012).

Tabela I - Total de peixe capturado (Milhões de toneladas), em todo o mundo, entre 2011 e 2012 (adaptado de FAO, 2012).

	2011	2012	Variação
Água doce	11,1	11,6	4,5%
Captura marinha	82,6	79,7	-3,5%
Total (Mundial)	93,7	91,3	-2,6%

A pesca de captura continua a ser dominante em relação à aquacultura, no entanto o regime de aquacultura tem aumentado. O sector da pesca nos países em desenvolvimento assumem um papel determinante na medida em que é necessário para aumentar o fornecimento de alimento e meios de subsistência (FAO, 2014).

Em Portugal, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE, 2015) o volume de capturas de pescado registou uma diminuição de 50,2% em 2014. Este decréscimo deve-se a uma diminuição generalizada da captura de peixes marinhos, particularmente de sardinha (resultante da interdição decretada para Portugal Continental relacionada com esta espécie) e também de moluscos (INE, 2015).

Contudo, Portugal tem mantido o consumo de peixe relativamente estável ao longo dos anos. Segundo a FAO (2014) Portugal é um dos vinte maiores consumidores de peixe a nível mundial (Figura 1).

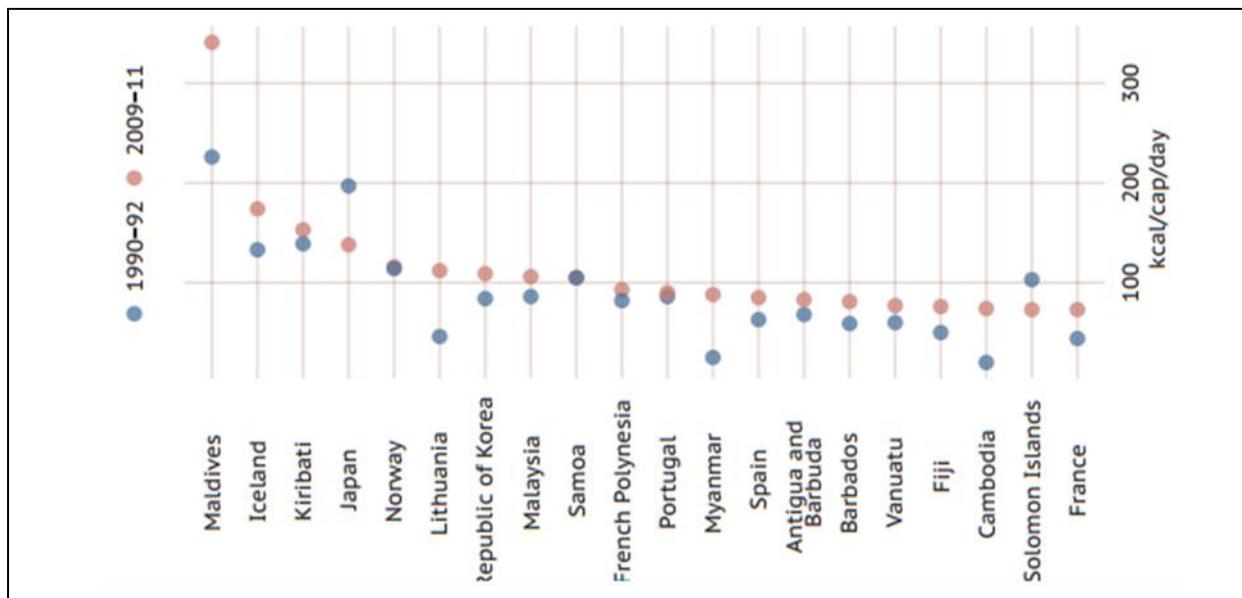


Figura 1 - Top 20 dos maiores países consumidores de peixe (adaptado de FAO, 2014).

Segundo Almeida (2014), Portugal é um dos países com maior consumo de peixe, cerca de 62kg *per capita* por ano, imediatamente a seguir à Islândia (88 kg *per capita*/ano) e Japão (70,6kg *per capita*/ano). Comparativamente, o consumo médio anual de peixe, na União Europeia (EU), é de 26,5kg (Glitnir, 2008). As 13 espécies mais consumidas na UE são: atum, bacalhau, salmão, juliana, arenque, mexilhões, pescada, carapau, peixe-panga, camarões, sardinha, lula e vieiras (EFSA, 2015).

Os consumidores portugueses preferem peixe refrigerado em relação ao peixe congelado, seco, enlatado e fumado, sendo que o peixe fumado se encontra nos produtos menos preferidos pelos consumidores. O bacalhau, pescada e atum em conserva são os produtos de pesca mais consumidos (Cardoso *et al.*, 2013). As espécies de atum utilizadas para as conservas são bonito (*Katsuwonus pelamis*), voador (*Thunnus albacares*) e albacora (*Thunnus alalunga*) (FAO, 2004).

A indústria de conservas de peixe foi uma das primeiras indústrias transformadoras a globalizar-se (Dias *et al.*, 2005). Conservar os alimentos em conservas é uma das formas mais comuns de manter o alimento em segurança e preservar o valor nutricional, sem adição de

conservantes. Os alimentos mais comuns em conservas são o atum, a sardinha e os moluscos (Mongruel *et al.*, 2010). Atualmente, em Portugal, existem 21 fábricas com uma produção que ronda 55 mil toneladas (Castro e Melo, 2015).

De acordo com os dados da FAO, as conservas de atum são produzidas em pelo menos 40 países, no entanto o seu consumo continua concentrado na União Europeia (35% do consumo mundial) e nos Estados Unidos da América (25%) (Mongruel *et al.*, 2010).

De janeiro a setembro de 2011, Portugal exportou 23.563,6 toneladas de conservas de peixe, número que se traduz em 108 milhões de euros (Tabela 2). A produção nacional de conservas de sardinha representa 8% (74133 toneladas) da produção mundial (Almeida, 2014).

Tabela 2 - Toneladas de conservas de peixe importadas/exportadas, em 2014 (DataPesca, 2014).

Conservas de Peixe								
	Imp	Exp	Imp	Exp	Imp	Exp	Imp	Exp
Peixes	Atum		Cavala		Sardinha		Outros	
Portugal	21890,4	13797,9	1141,5	9108,2	895,4	1295,8	1717,6	1527,8

Durante o período de 1990 a 2005, a disponibilidade de conservas de atum em casa dos Portugueses aumentou ao longo dos anos. Sendo que o Algarve, é a região que apresentou o maior aumento, ao contrário dos Açores e da Madeira que apresentaram o menor aumento. Em 2005, o consumo de conservas de atum foi estimado em 2,98g/pessoa/dia. Por outro lado, o consumo de conservas de sardinha é menor, 0,41g/pessoa/dia (Teixeira *et al.*, 2013). Segundo o Observatório do Mercado Europeu das Pescas e Produtos de Aquacultura (EUMOFA, 2014), o consumo de conservas de atum em 2011, na UE, foi de 2,14kg *per capita*. Por outro lado, o consumo de sardinhas, em 2011, desceu para 0,71kg *per capita*. Comparativamente com o ano 2010 houve um ligeiro aumento de 2%.

III. Aminas

Os peixes, as conservas e outros produtos derivados de peixe têm levantado algumas preocupações no que diz respeito à presença de aminas biogénicas (Shalaby, 1996).

O peixe é um alimento rico em vitaminas e sais minerais, e uma importante fonte de aminoácidos essenciais. A sua deterioração ocorre rapidamente através da contaminação bacteriana, e, conseqüentemente da produção de aminas biogénicas (Rabie *et al.*, 2014).

As aminas biogénicas são formadas por descarboxilação bacteriana de aminoácidos, como a histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina. Contrariamente, as aminas naturais, espermina e espermidina são formadas *in situ* nas células que necessitam. Tendo em conta a nomenclatura da maior parte das aminas, estas são designadas de acordo com os seus aminoácidos precursores (Rodríguez *et al.*, 2014).

Para além da via biosintética, as aminas biogénicas podem ser ainda classificadas de acordo com o número de grupos amina, a sua estrutura química e a ação que desempenham no organismo. De acordo com o número de grupos amina, podem ser divididas em: monoaminas (tiramina, feniletilamina), diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina, cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina, agmatina). No que diz respeito à estrutura química são classificadas tendo em conta os grupos químicos presentes, designadamente alifático (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromático (tiramina e feniletilamina) e heterocíclico (histamina e triptamina). Em relação à ação que provocam no organismo são classificadas em vasoactivas (histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina, isoamilamina e serotonina) e psicoactivas (norepinefrina, serotonina, dopamina) (Rodríguez *et al.*, 2014).

IV. Histamina

A histamina foi descoberta em 1910 por Dale e Laidlaw, e, posteriormente, em 1932, foi identificada como um mediador de reações anafiláticas (Maintz *et al.*, 2014). De facto a histamina é considerada uma das principais mediadoras nos processos patológicos como alergias e doenças auto-imunes (Shahid *et al.*, 2009).

A histamina (2-[4-imidazolil]etilamina) é uma amina biogénica, sendo sintetizada através do aminoácido histidina (Figura 2), sob ação L-histidina descarboxilase. A histamina é produzida na presença de bactérias existentes em peixes que apresentam, naturalmente, uma elevada quantidade do aminoácido histidina (FAO, 2012).

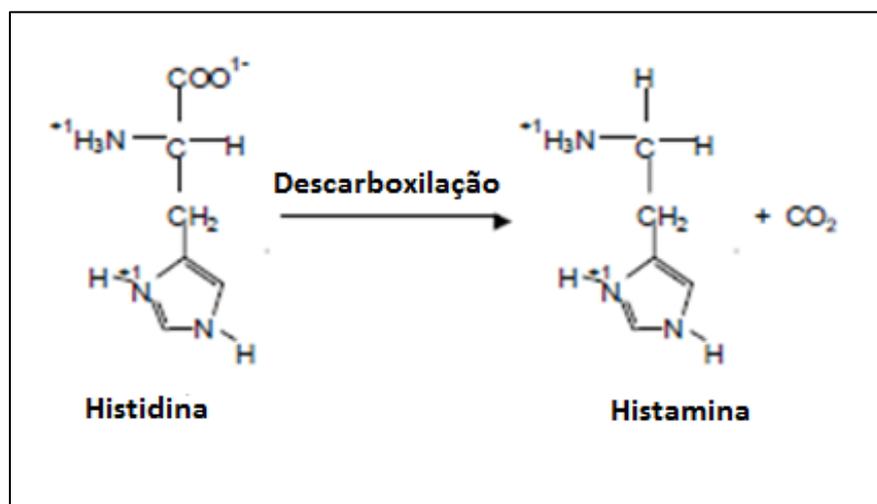


Figura 2 - Reação de síntese da histamina (adaptado de FAO, 2004.)

V. Efeitos Tóxicos

As aminas que são ingeridas através dos alimentos são rapidamente metabolizadas através de reações de conjugação ou oxidação. As aminas são oxidadas por oxidases de monoamina (MAO) e oxidases de diamina (DAO). No caso das poliaminas, são oxidadas através de oxidases de diamina (DAO) e também através de oxidases de poliamina (PAO), posteriormente à reação de acetilação. As aminas bioativas representam um grave problema para a saúde quando se encontram em grandes quantidades no organismo. Os indivíduos com doenças respiratórias, doenças coronárias, hipertensão ou deficiência em vitamina B₁₂ correm riscos de saúde visto serem sensíveis a pequenas concentrações de aminas (Rodriguez *et al.*, 2013).

Contudo muitas aminas desempenham um importante papel na manutenção da fisiologia do organismo, como é o caso da histamina, serotonina, dopamina e tiramina. A histamina endógena é necessária para algumas funções fisiológicas, mas poderá ser tóxica em quantidades elevadas (FAO/WHO, 2012). As aminas bioactivas, espermidina e espermina, apesar de não apresentarem efeitos tóxicos diretos, podem propiciar a produção de

histamina e tiramina para níveis tóxicos que irão competir com enzimas desintoxicantes (Rodriguez *et al.*, 2013). Os efeitos toxicológicos da histamina estão relacionados com as ações fisiológicas que esta amina desempenha no organismo (FAO/WHO, 2012).

A histamina é um importante mediador que coordena as respostas inflamatórias e alérgicas. Estudos realizados indicam que a histamina contribui para a progressão das respostas inflamatórias alérgicas (Jemima *et al.*, 2014).

A histamina exerce os seus efeitos através da ativação de quatro recetores diferentes: H1, H2, H3 e H4 sobre e/ou dentro da membrana celular. Estes tipos de recetores estão presentes em diferentes tipos de células e exercem funções em diferentes vias, originando múltiplas respostas inflamatórias (FAO/WHO, 2012).

Os recetores H1 e H2 são responsáveis pela resposta inflamatória cutânea produzida pela histamina exógena e também pela libertação de histamina endógena a partir dos mastócitos. A histamina também provoca um aumento da permeabilidade capilar, originando sintomas tais como edema, urticária, hemoconcentração e aumento da viscosidade do sangue. O efeito da permeabilidade capilar é igualmente da responsabilidade da ativação dos recetores H1 e H2 (FAO/WHO, 2012). A histamina aumenta a contratibilidade cardíaca e por sua vez aumenta a frequência cardíaca. Estes efeitos poderão explicar as palpitações que por vezes ocorrem em casos de intoxicação por histamina. A contração é da responsabilidade dos recetores H1, enquanto o relaxamento é associado ao recetor H2 (Shahid, 2009).

VI. Histamine fish poisoning (SFP)

A intoxicação por histamina, também designada por intoxicação escombroides (SFP do inglês *Scombroid Fish Poisoning/ Histamine fish poisoning*), por consumo de peixe, foi descrita pela primeira vez em 1799 (Wilson *et al.*, 2012). Embora ainda não exista nenhum estudo conclusivo sobre as toxinas escombroides, considera-se que as aminas biogénicas, especialmente a histamina, desempenham um papel fundamental na patogénese da SFP (Hungerford, 2010; FAO/WHO, 2012). As toxinas escombroides, incluindo a histamina, são estáveis ao calor (Veiga *et al.*, 2012).

O termo *scromboid* deriva da família Scrombidae, que inclui várias espécies de peixes, designadamente atum (*Thunnus sp.*), cavala (*Scomber japonicus*) e agulhão (*Scomberesox*

saurus). Estas espécies de peixes têm, em comum, um elevado nível de histidina livre nos tecidos musculares (Hungerford, 2010).

Apesar da formação de histamina estar principalmente associada à família Scrombidae, também pode ocorrer em espécies não escombrídeas, como é o caso das sardinhas (*Sardina pilchardus*), anchovas (*Pomatomus saltatrix*), arenque (*Clupea harengus*), salmão (*Salmo salar*), peixe-espada (*Lepidopus caudatus*), biqueirão (*Engraulis encrasicolus*) e espadim (*Istiophoridae*). Foi igualmente detetada histamina em alguns produtos processados, como semi-conservas (Veiga *et al.*, 2012).

Apesar de existirem semelhanças no que diz respeito aos sintomas provocados pela SFP e a intolerância a histamina, há algumas diferenças. Na intoxicação (SFP) poderão estar envolvidos outros compostos tóxicos além da histamina. Adicionalmente, a SFP pode ocorrer em indivíduos com uma capacidade normal de degradação de histamina e não apenas nos indivíduos intolerantes à histamina (Hungerford, 2010; FAO/WHO, 2012). A intolerância à histamina resulta de uma elevada sensibilidade à histamina (Hungerford, 2010).

O aumento da produção de histamina está relacionado com as más condições de conservação após a captura do peixe, particularmente quando os peixes não são conservados a baixa temperatura, permitindo a metabolização bacteriana de histidina em histamina (Vosikis *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2012).

Existem algumas hipóteses para justificar o consumo de peixe deteriorado, contaminado com histamina, ser mais tóxico que a histamina pura administrada oralmente (Lehane *et al.*, 2000). A resposta toxicológica da histamina depende da via de administração e os efeitos toxicológicos detetados dependem da espécie em causa (FAO/WHO, 2012). A sua toxicidade pode ser aumentada na presença de outras aminas, tais como, a cadaverina, a putrescina e a tiramina (Shalaby, 1996).

A maioria das bactérias associadas ao desenvolvimento da histamina são halotolerantes ou halófilas. Como resultado é possível a formação de histamina em processos como a salga, fumeiro, secagem e fermentação. A refrigeração pode contribuir para a inibição da formação de histamina durante os processos referidos (FDA, 2011).

As bactérias frequentemente associadas à produção de histamina são as seguintes: *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.* e *Escherichia coli* (Hwang *et al.*, 2005). Vulgarmente existem

nas brânquias, superfícies externas e no intestino do peixe sem causar danos para o animal (FDA, 2011).

VII. Apresentação clínica

Os humanos podem tolerar até 180mg de histamina, administrada oralmente, sem que se verifiquem efeitos visíveis. No caso de administração intravenosa, apenas 0,007mg de histamina é suficiente para aumentar a frequência cardíaca e provocar vasodilatação. Esta diferença observada sugere-nos que a histamina não é eficientemente absorvida a partir do trato gastrointestinal (FAO/WHO, 2012).

A gravidade dos sintomas varia de acordo com os níveis de histamina ingeridos e também da sensibilidade do indivíduo à histamina. Algumas das manifestações descritas incluem sensação de queimadura na língua, associadas a um sabor metálico e picante e irritação cutâneas (Wilson *et al.*, 2012).

A contração do músculo liso do intestino provoca cólicas abdominais, diarreia e vômitos, sendo alguns dos sinais clínicos mais vulgares num caso de intoxicação por histamina (FAO/WHO, 2012).

Em termos neurológicos, a histamina estimula, através dos recetores H1, os neurónios motores e sensoriais, originando a sensação de dor e comichão presentes em casos de urticária, igualmente presente (FAO/WHO, 2012).

Como referido anteriormente, a cadaverina e a putrescina, presentes em peixes deteriorados, podem funcionar como potenciadores da toxicidade da histamina, pois estas aminas biogénicas inibem importantes enzimas no processo de degradação da histamina (Kung *et al.*, 2009).

A intoxicação *escombroides* nos peixes é um tipo de intoxicação alimentar com sintomas e formas de tratamento semelhantes às alergias associadas ao marisco (Hungerford, 2010). A manifestação de sintomas surge poucos minutos após a ingestão do peixe contaminado com toxinas *escombroides* (FAO/WHO, 2012).

Apesar dos sintomas persistirem durante alguns dias, a longo prazo, não se conhecem sequelas, sendo que a SFP não é considerada fatal (FAO/WHO, 2012).

Embora este tipo de intoxicação provocada pelos elevados níveis de histamina ($\geq 500\text{mg/kg}$) esteja intimamente associada ao consumo de peixes contaminados com histamina e outras aminas ativas, a patogénese ainda não foi totalmente definida (Lehane et al., 2000).

VIII. Ocorrência

A SFP é um problema de segurança alimentar a nível mundial (Figura 3). Em 2011, na UE, o peixe e os seus derivados foram responsáveis por cerca de 71 surtos em vários países: França (34), Espanha (19), Suécia (6), Dinamarca (5), Alemanha (3), Reino Unido (2), Polónia (1) e Bélgica (1). É de sublinhar que 65,2% dos casos graves foram provocados pela histamina, representando 57,8% sendo que 40,8% necessitaram de internamento hospitalar (EFSA, 2013).

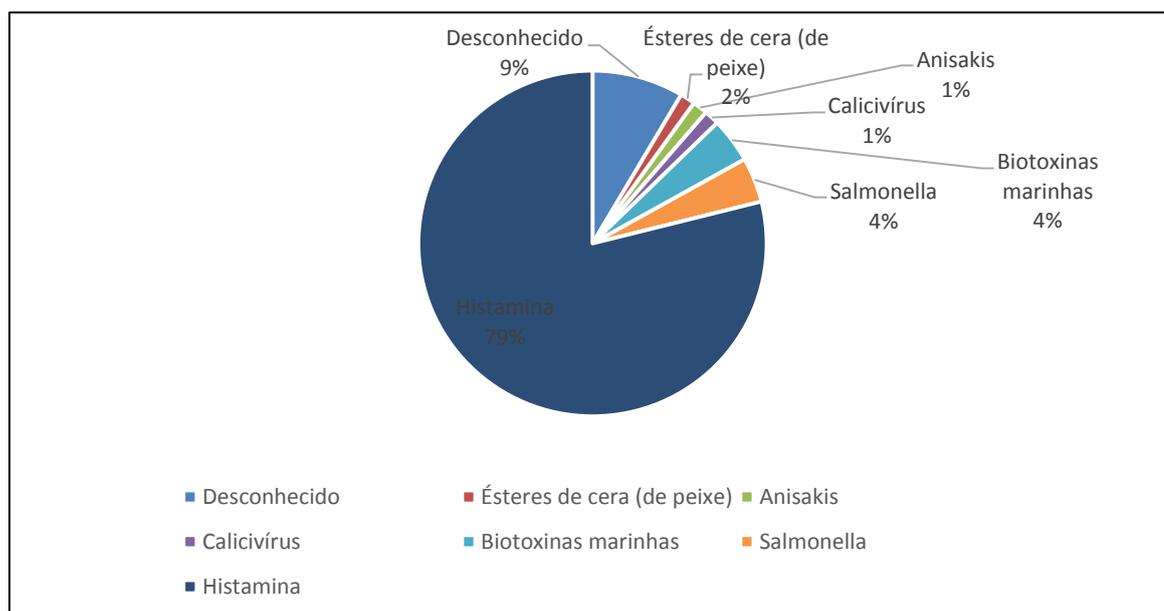


Figura 3 - Distribuição das causas de surtos alimentares associadas ao consumo de peixes e derivados de peixes, em 2011, na UE (adaptado de EFSA, 2013).

Desde 2008, o Sistema Rápido de Alerta para Alimentos e Rações (RASFF, 2014) identificou e notificou vários casos de intoxicações alimentares. Em 2013 registaram-se 52 casos de SFP, o que significa um aumento de 12 casos comparado com o ano anterior (Tabela 3).

Tabela 3 - Casos de surtos de SFP ocorridos, no mundo, em 2013 (adaptado de RASFF, 2014).

Data	Indivíduos Afetados	País de origem da alerta	Tipo de alerta	Informação
Janeiro	3	Itália	<i>Food - information for attention</i>	Histamina (4550mg/kg) em lombos de atum de Espanha.
Janeiro	4	Itália	<i>Food - information for attention</i>	Suspeita de surto (intoxicação por histamina) causada por atum refrigerado de Espanha.
Fevereiro	4	França	<i>Food - information for attention</i>	Histamina (>4375mg/kg) em atum congelado (<i>Thunnus albacares</i>) do Vietname.
Fevereiro	11*	Itália	<i>Food - alert</i>	Surto (histamina) suspeita de ser causada por atum refrigerado (<i>Thunnus albacares</i>) de Espanha.
Fevereiro	4*	Itália	<i>Food - information for attention</i>	Surto (histamina) suspeito de ser causada por atum fresco de Espanha.
Fevereiro	2	Itália	<i>Food - information for attention</i>	Histamina (2245;2493mg/kg) em bifos de atum refrigerados de Espanha.
Abril	1	Itália	<i>Food - alert</i>	Histamina (2690;2740;2481 mg/kg) em conserva de atum em azeite de França, com matéria-prima da Costa do Marfim.
Maio	5	Suíça	<i>Food - alert</i>	Histamina (290;4200mg/kg) em anchovas em azeite de Espanha.
Maio	2	Itália	<i>Food - information for attention</i>	Histamina (1323mg/kg) em sardinha refrigerada de Itália.
Dezembro	2	Itália	<i>Food - information for attention</i>	Histamina (\geq 1920mg/kg) em filetes de anchovas (<i>Engraulis encrasicolus</i>) em óleo de Marrocos.

*evidências inconclusivas entre os alimentos e os sintomas do paciente

Em Portugal os registos disponíveis são escassos, sendo que os que existem encontram-se dispersos entre hospitais, centros de saúde e alguns laboratórios estatais (Veiga *et al.*, 2012).

IX. Limites estabelecidos

A Agência de Segurança Alimentar Americana, *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu que o valor 500mg/kg corresponde ao limite a partir do qual se considera que o peixe se encontra deteriorado (FDA, 2011).

Na UE, com o Regulamento (CE) n° 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007, foi estabelecido para produtos da pesca de espécies de peixes associadas a um elevado teor de histamina (em especial em espécies das famílias *Scrombidae*, *Scromberososidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae* e *Pomatomidae*) o intervalo compreendido entre 100mg e 200mg para nove amostras (n), sendo que apenas duas amostras (c) podem apresentar valores dentro deste intervalo. O método de referência para a análise é a Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC) (CE, 2007), utilizando o detetor UV ou de fluorescência (Stroka et al., 2014). As análises devem ser efetuadas aos produtos quando estes são colocados no mercado durante o seu período de vida útil.

No caso de produtos de pesca que tenham sido submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura, fabricados a partir de espécies de peixe associadas a um elevado teor de histidina (em especial em espécies das famílias *Scrombidae*, *Scromberososidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae* e *Pomatomidae*), o mesmo regulamento estabeleceu o intervalo entre 200mg e 400mg para nove amostras (n), sendo que apenas duas amostras (c) podem apresentar valores dentro deste intervalo. O método de referência é igualmente a HPLC (CE, 2007), utilizando o detetor UV ou de fluorescência (Stroka et al., 2014). As análises devem ser efetuadas aos produtos quando estes são colocados no mercado durante o seu período de vida útil (CE, 2007).

Ainda segundo o mesmo regulamento, os resultados serão satisfatórios se o valor médio das amostras for inferior ao mínimo do intervalo do limite estabelecido. Por último, nenhum dos valores observados pode exceder o valor máximo permitido. Os resultados obtidos serão insatisfatórios se o valor médio exceder o limite mínimo ou mais do que c/n valores estiverem entre o intervalo de valores permitido ou se um ou mais valores estiverem acima do limite máximo (CE, 2007).

A Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) estabeleceu, em 2011, uma ingestão diária máxima de 50mg de histamina e 600mg de tiramina para adultos saudáveis. No entanto estes valores podem ser reduzidos em caso de intolerância. A histamina e a

tiramina são consideradas as toxinas *escromboides* mais tóxicas e mais relevantes (EFSA, 2011).

X. Condições de armazenamento

A remoção das brânquias e das vísceras pode traduzir-se numa diminuição dos níveis de histamina, contudo não elimina as bactérias formadoras de histamina (FDA, 2014). Por outro lado, esta toxina não é desactivada pelo calor. Além disso, o peixe pode conter níveis tóxicos de histamina e, sensorialmente, não apresentar diferenças significativas (ASAE, 2009). O armazenamento a uma temperatura inferior a 4°C e uma reduzida manipulação à temperatura ambiente é uma medida preventiva para inibir a produção de histamina. Assim, no peixe submetido à temperatura ambiente, mesmo que seja num curto período de tempo, pode ocorrer a produção de histamina (Vosikis *et al.*, 2008). Mietz e Karmas (1997) propuseram um índice de qualidade que pretende avaliar a qualidade das conservas de atum, de acordo com a fórmula seguinte (Yeh *et al.*, 2004):

$$\text{Índice de Qualidade} = \frac{\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ histamina} + \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ putrescina} + \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ cadaverina}}{1 + \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ espermidina} + \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ espermina}}$$

XI. Métodos de determinação de histamina

Para a determinação de histamina em peixes e seus derivados existe uma grande variedade de métodos (Hungerford, 2010). Nas últimas décadas têm sido descritos vários métodos, designadamente ensaios com sensores de oxigénio, utilizando amina oxidase purificada, ensaio de quelação de cobre, imunoensaios enzimáticos, análise por electroforese capilar e também técnicas cromatográficas (Khezri *et al.*, 2014).

As normas do Codex Alimentarius propõem a utilização do método fluorimétrico ou, alternativamente, outros métodos que estejam validados cientificamente (Tabela 4; FAO/WHO, 2012).

Tabela 4 - Comparação dos métodos mais utilizados na determinação de histamina (Adaptado de AOAC 977.13; Duflos *et al.*, 1999; FAO/WHO, 2012; Sato *et al.*, 2005).

	AOAC (AOAC 977.13)	HPLC (Duflos <i>et al.</i> , 1999)	Espectrofluorimétrico (FAO/WHO, 2012)	ELISA (Sato <i>et al.</i> , 2005)	Colorimétrico (Sato <i>et al.</i> , 2005)
Tempo necessário (h)	1-2	1-2	1	1	1
Equipamento	Fluorimétrico	HPLC-UV ou HPLC-FD	Espectrofluorimétrico	Espectrofotômetro	Espectrofotômetro
Limites quantificação	1-5mg/kg	1,5-5mg/kg	0,0015mg/kg	2-5mg/kg	20mg/kg
Intervalo de quantificação	1-150mg/kg	5-2500mg/kg	0,0015mg/kg – 100mg/kg	0-500mg/kg	0,8-300mg/kg

O método de HPLC pode ser associado ao detetor UV (HPLC-UV) ou associado ao detetor por fluorescência (HPLC-FD), consoante os diferentes estudos que pretendemos realizar (Stroka *et al.*, 2014). A técnica de HPLC é importante pois consegue quantificar e diferenciar todas as aminas biogénicas, sendo preciso e exato. O método fluorimétrico é igualmente preciso e exato, sendo adicionalmente considerado um método económico. O método de ELISA é um método rápido e o preço do equipamento necessário para a análise é igualmente baixo. Além disso é possível efetuar vários testes em simultâneo. O método colorimétrico é igualmente rápido, o preço do equipamento é acessível, e existe a possibilidade de efetuar múltiplos testes em simultâneo, bem como avaliar visualmente de forma semi-quantitativa (FAO/WHO, 2012).

Apesar do método de HPLC (HPLC-UV ou HPLC-FD) ser o método oficial em vários países (Rodriguez *et al.*, 2013), o método imunoenzimático de ELISA (do Inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) pode ser uma boa alternativa, pela rapidez e fácil execução (Marcobal *et al.*, 2005). As vantagens e desvantagens dos métodos de HPLC e ELISA são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação das vantagens e desvantagens entre o método ELISA e HPLC (adaptado de Marcobal *et al.*, 2005; FAO/WHO, 2012).

Método de ELISA		Técnica de HPLC	
Vantagens	Desvantagens	Vantagens	Desvantagens
Método rápido e preço acessível.	Limite de quantificação.	Limite de quantificação.	Equipamento caro.
Fácil execução.	Intervalo de quantificação	Intervalo de quantificação	Mais demorado.
Grande número de amostras em simultâneo.	A mudança de cor enzimática reagirá indefinidamente (falsos positivos).	Mais sensível.	Não avalia um grande número de amostras em simultâneo.

O ELISA é utilizado tanto na área clínica como ambiental e alimentar. Este método tem por base a ligação do antígeno-anticorpo, permitindo a deteção de pequenas quantidades de anticorpo (no caso do ELISA indireto) ou de antígeno (no caso do ELISA sanduiche ou de competição), como sejam, proteínas, péptidos e hormonas. A marcação enzimática permitirá a deteção do analito através da determinação da intensidade de degradação do respectivo substrato (Gan *et al.*, 2013).

No caso do método de sanduiche, a superfície dos poços é revestida com uma quantidade conhecida de anticorpos (anticorpo de captura) para detetar o antígeno pretendido. As amostras que contêm o antígeno em estudo são adicionadas aos poços da placa. De seguida é adicionado o anticorpo de sinalização, marcado com uma enzima, e com afinidade para outro epítopo diferente do epítopo reconhecido pelo anticorpo de captura. Os conjugados anticorpo-enzima que não se ligaram são removidos, geralmente, por lavagem. A ligação do anticorpo-antígeno é observada através da coloração da amostra que pode ser quantificada (Gan *et al.*, 2013). Este método é adequado para amostras complexas, visto que o antígeno não precisa de ser purificado antes da sua utilização (Abdserotec, 2015).

O formato de competição é indicado para casos de analitos pequenos (Abdserotec, 2015). O anticorpo primário é incubado com o antígeno da amostra e com o complexo antígeno-anticorpo. Depois de um período de incubação o anticorpo que não se ligar ao antígeno será removido na lavagem. Quanto maior for a concentração do antígeno na

amostra, maior será o número de ligações entre o anticorpo primário e o antígeno da amostra. Por isso haverá uma pequena porção de anticorpo primário disponível para se ligar ao antígeno presente nos poços. O anticorpo secundário conjugado com uma enzima é adicionado, e posteriormente um substrato cromogénico para induzir cor à amostra. A ausência de cor significa a presença de antígeno na amostra. A principal vantagem deste método é a sua alta sensibilidade em amostras complexas, mesmo quando o antígeno está presente em quantidades relativamente pequenas (Gan *et al.*, 2013).

II. Trabalho original

I. Objetivos

Em Portugal os dados são escassos relativamente à ocorrência de histamina nos peixes, desta forma seria importante a criação de uma base de dados nacional com a informação de intoxicações e infecções alimentares (Veiga *et al.*, 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar qual o risco para o consumidor de potenciais produtos alimentares à base de conservas que contenham histamina em doses acima do permitido por lei.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem

As 40 amostras analisadas corresponderam a conservas de peixe e patês, conforme segue: conservas de atum (n=17), conservas de cavala (n=5), conservas de sardinha (n=7), conserva de petingas (n=1), patês de atum (n=4), patês de sardinha (n=3), patês de camarão (n=2) e patê de cavala (n=1). Das 17 amostras de atum correspondiam conforme segue: atum em óleo vegetal (n=15), atum em óleo girassol (n=1) e atum em azeite (n=1); Das cinco amostras de conservas de cavala: em tomate (n=2), em filete (n=2) e em óleo (n=1). Das sete conservas de sardinha: em óleo (n=6) e em azeite (n=1). As amostras eram de origem Portuguesa (n=36) e Espanhola (n=4).

A amostragem foi realizada durante o mês de fevereiro de 2015, em várias superfícies comerciais de forma a garantir uma maior representatividade dos produtos disponíveis no mercado. A informação disponibilizada foi obtida através dos respetivos rótulos da embalagem. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade.

2.2. Procedimento

A determinação da histamina foi efectuada de acordo com as instruções inclusas no kit de ELISA (de competição) comercial utilizado (RIDASCREEN® Histamin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), o qual estava dentro do prazo de validade.

a. Preparação das amostras

No caso das conservas foram homogeneizadas 10g de cada amostra. Adicionou-se 9mL de água destilada a 1g de amostra homogeneizada, agitou-se bem. Centrifugou-se durante 5 minutos a 2500g à temperatura ambiente (20 - 25°C). Removeu-se a camada lipídica. Misturou-se 1mL de sobrenadante com 9mL de água e agitou-se. Diluiu-se 200µL desta solução com 9,8mL de água destilada e agitou-se. Aplicou-se 100µL da solução nos tubos.

No caso dos patês de peixe, misturou-se 1g de patê a 200mL de água destilada, agitar durante 15 minutos. Centrifugou-se durante 5 minutos a 2500g à temperatura ambiente (20 - 25°C). Diluiu-se 200µL de sobrenadante com 200mL de água destilada. Aplicou-se 100µL da solução nos tubos.

b. Procedimento para a derivatização

Adicionou-se 100µL de cada solução-padrão, controlo ou amostra preparada aos tubos de derivatização, em duplicado. Adicionou-se 25µL do reagente de derivatização a cada tubo. Adicionou-se 200µL do tampão de derivatização a cada tubo, agitou-se suavemente e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente (20 - 25°C). Utilizou-se 25µL para o método de ELISA.

c. Procedimento para o método de ELISA

Inseriu-se um número suficiente de microplacas em duplicado para as soluções-padrão, controlo e amostras. Adicionou-se 25µL da solução padrão, controlo e das amostras, após a derivatização a cada poço separadamente. Adicionou-se 100µL do soro (anticorpos anti-histamina) a cada poço, agitou-se suavemente a placa e incubou-se durante 40 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se à fase de lavagem que consiste em adicionar a solução lavagem a cada poço após remoção completa do seu conteúdo.

Repetindo-se o processo três vezes de forma a garantir a remoção completa do líquido dos poços. Adicionou-se 100µL da solução de conjugado a cada poço. Agitou-se manualmente a placa e incubou-se durante 20 minutos. Voltou-se a repetir o processo de lavagem, tal como referido acima. Seguidamente, adicionou-se 100µL da solução de substrato/ cromogénio a cada poço. Misturou-se suavemente, agitou-se manualmente e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente (20 - 25°C) protegida da luz. Adicionou-se 100µL da solução Stop a cada poço. Misturou-se suavemente, agitou-se manualmente e mediu-se a absorvância a 450nm, 10 minutos após a adição da solução Stop.

d. Quantificação da histamina

Foi construída a curva de calibração através das seis concentrações-padrão (0mg/kg, 0,0005mg/kg, 0,00015mg/kg, 0,005mg/kg, 0,015mg/kg, 0,050mg/kg), com determinações em duplicado. A absorvância de cada padrão, controlo ou amostra foi convertida em percentagem de absorvância, considerando que a solução padrão 0mg/kg correspondia a um sinal de 100%. Os valores obtidos foram introduzidos num gráfico semi-logarítmico. Para o cálculo da concentração de histamina foi utilizada a equação da curva resultante, conforme segue: $y=78,935e^{-0,022x}$, em que “y” corresponde ao valor da percentagem de absorvância e “x” à concentração de histamina na amostra. No caso das conservas, o fator de diluição foi 5000 e, no caso dos patês, 200 000.

De acordo com o fabricante, o limite de deteção para conservas de peixe era 2,5mg/kg e, para patês, 100mg/kg.

e. Cálculo da Ingestão diária estimada

A Ingestão Diária Estimada (EDI) é calculada através da seguinte fórmula:

$$EDI = (\sum c) (CN^{-1} D^{-1} K^{-1})$$

Em que ($\sum c$) representa o somatório da concentração de histamina presente na amostra; (C) o consumo médio anual estimado *per capita*; (N; Conservas de atum=2,98g/dia; Conservas de sardinha=0,41g/dia; Teixeira *et al.*, 2013) o número de amostras positivas, (D; 365) o número de dias no ano e por último, (K; 65kg), o peso corporal médio.

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação pelo método de ELISA

O método utilizado para a determinação de histamina neste trabalho foi o método de ELISA (de competição). Este método é de rápida execução, a extração da amostra é simples e possui baixos limites de detecção (Duarte *et al.*, 2013). Este permite a detecção de todo o tipo de moléculas biológicas em concentrações relativamente baixas. Apesar das suas limitações, é uma ferramenta útil para a investigação alimentar (Gan *et al.*, 2013), particularmente como um método de “*screening*” para determinar quantitativamente a concentração de histamina em peixes (Khezri *et al.*, 2014).

No presente estudo, a histamina não foi detetada em nenhuma das amostras analisadas. Os resultados sugerem que a produção das conservas e patés analisados é segura, no que diz respeito à prevenção da contaminação por histamina.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos reportados, em estudos anteriores, conforme ilustrado na Tabela 6.

Alguns autores defendem que a utilização de peixe de má qualidade bem como o manei incorreto do mesmo são as principais causas da elevada concentração de histamina em conservas de peixe impróprias para consumo (Khezri *et al.*, 2014).

Considera-se que um peixe de boa qualidade apresente menos de 10mg/kg de histamina. Entre os 10 e 30mg/kg o peixe já apresenta uma deterioração significativa. Acima dos 50mg/kg o peixe já apresenta uma evidente decomposição. Apesar destas recomendações, Rabie e col. (2009) observaram, em peixes fermentados, valores de histamina até 210mg/kg, após 60 dias de armazenamento, o que constitui um problema de saúde para o consumidor.

Os peixes devem ser conservados no gelo ou na água do mar a uma temperatura de 4°C (Mahmoudi *et al.*, 2014). As indústrias deverão ter implementadas medidas de controlo de qualidade rejeitando o peixe em más condições e/ou contaminado (Tao *et al.*, 2010). Um sistema de segurança alimentar, como é o caso do HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) é insuficiente para proteger a saúde pública, as autoridades de segurança alimentar devem atuar de forma a minimizar os riscos (Vosikis *et al.*, 2008).

Alguns estudos sugerem que existe uma variação sazonal da concentração de histamina nos peixes. Mahmoudi e col., (2014) observaram níveis significativamente maiores de histamina na primavera e no verão, comparativamente com o inverno e o outono. As diferenças observadas podem dever-se à variedade de espécies, condições de captura e de higiene durante o transporte e armazenamento, bem como às condições de refrigeração a que o peixe é sujeito. No atum há um aumento do risco dos níveis tóxicos de histamina quando as condições de armazenamento não são favoráveis e também em caso de incorreto manuseamento durante o seu processamento (Mahmoudi *et al.*, 2014). Durante o verão, o peixe e a água encontram-se a uma temperatura mais elevada, o que propicia a formação de histamina. Razão pela qual os surtos e intoxicações provocadas por histamina ocorrem grande parte das vezes no verão (Oliveira *et al.*, 2012).

Silva e col. (2011) observaram que uma concentração de histamina superior em conservas de atum comparativamente ao atum fresco. Esta diferença pode justificar-se com algum procedimento adicional que possa existir ou com a manipulação por parte dos manipuladores. Em relação ao atum, no peixe manipulado, a área de superfície é superior, o que pode levar à contaminação e à interação enzima-substrato. Amostras com sal e água apresentaram um valor de histamina menor comparado com as amostras com óleo. Neste mesmo estudo, as conservas de atum com molho de tomate registaram uma maior percentagem de histamina. O tomate pode conter naturalmente histamina o que faz aumentar os níveis de histamina (Silva *et al.*, 2011).

Tabela 6 - Estudos realizados para a determinação de histamina.

País	Ano	Amostra	n	Método	% Positivo	LD e LQ	[mín- máx]	Referência
Irão	2012-2013	Conservas de atum	n=60	ELISA	[59,02–383,41mg/kg]: 4 (6,67%); <50mg/kg: 56 (93,33%).	n.d	[3,40-383,41]mg/kg	Khezri et al., (2014)
Portugal	2011	Conservas de peixe	n=356	n.d	[≥50-<100]mg/kg: 17 (4,8%); [≥100-<200]mg/kg: 35 (9,8%); [≥200-<500]mg/kg: 20 (5,6%); ≥500mg/kg: 7 (2,0%).	n.d	n.d	FAO/WHO, (2012)
Portugal	2010	Conservas de peixe	n=154	n.d	[≥50-<100]mg/kg: 8 (5,2%); [≥100-<200]mg/kg: 5 (3,2%); [≥200-<500]mg/kg: 4 (2,6%);	n.d	n.d	FAO/WHO, (2012)
Canadá	2009	Conservas de atum	n=64	n.d	[≥50-<100]mg/kg: 7 (10,9%).	n.d	Máx: 84 mg/kg	FAO/WHO, (2012)

(continuação)

Portugal	2009	Conservas de peixe	n=135	n.d	[≥ 100 -<200]mg/kg: 2(1,5%); [≥ 200 -<500]mg/kg: 1 (0,7%); ≥ 500 mg/kg: 2 (1,5%).	n.d	n.d	FAO/WHO, (2012)
Grécia	2008	Atum fresco e em conservas. Sardinhas frescas e em conservas. Peixe-espada congelado. Cavala congelada. Anchovas. Arenque.	125 Amostras: HPLC=55 ELISA=106 HPLC /ELISA=36	HPLC e ELISA	HPLC: maior concentração de histamina em arenque e anchova. 8 > 50mg/kg ELISA: 16 > limite permitido.	LD: ELISA: 2,5 mg/kg HPLC: 2,7 mg/kg	HPLC: [3- 3,7mg.kg] ELISA: [3-3,3mg/kg]	Vosikis et al, (2008)
Brasil	2007-2008	Atum e conservas de atum	n=414	HPLC	≈ 192 (46,3%); >100mg/kg: 9 (2,2%); >50mg/kg: 15 (3,7%).	LD: 0,56 mg/kg	Conservas de atum: [0,45-83,73 mg/kg]	Silva et al, (2011)
Brasil	2007-2008	Atum	n=180	HPLC	9 (5%) Média das 9: 5,48mg/kg LOD: 0,56mg/kg	LD: 0,56 mg/kg	[4,92-6,90]mg/kg	Oliveira et al, (2012)
Taiwan	2006	Tuna Dumpling	n=150g da amostra contaminada + 5	HPLC	Amostra contaminada: 1608 \pm 59mg/kg; Restantes amostras: 86 \pm	n.d	[86-1608]mg/kg	Chen et al, (2008)

(continuação)

			amostras		16mg/kg e 104 ± 21mg/kg)			
Fiji, Alemanha , Noruega, Holanda, China, Japão, Tailândia e Cambodja	2002- 2007	Peixe	n=159	HPLC	35(≈21%): <50mg/kg: 15(9%); >500mg/kg: 5(3%); >1000mg/kg: 2(1,2%).	n.d	[12-1580]mg/kg	Tao et al, (2011)
Cyprus	2003 2004 2005 2006	Peixe vendido no mercado.	-180 Amostras; -21 grupos de 9 amostras; 66 lotes de 9 amostras -43 Lotes de 9 amostras	HPLC	-2 amostras (1,11%); -0%; -1 lote (1,51%); -1 lote (2,33%);	n.d	n.d	Yiannopoulos et al, (2006)

(continuação)

Kuwait	n.d	3 espécies de peixe (Hammour, Negrule, Zubaiði)	n=54	HPLC	<u>Hammour</u> 33±12mg/kg; <u>Negrule</u> 123 ± 19mg/kg; 29 ± 3mg/kg; <u>Zubaidi</u> 104 ± 3 mg/kg.	n.d	n.d	Anderson, (2008)
USA	n.d	Conservas de peixes (vários)	n=116	n.d	0%	n.d	n.d	FAO/WHO, (2012)
USA	n.d	Conservas de sardinhas	n=20	n.d	0%	n.d	Máx: 77mg/kg	FAO/WHO, (2012)

(ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC, Cromatografia Líquida de Elevada EficiênciaLD., Limite de deteção; LQ., Limite de Quantificação Máx., máximo; n., número de amostras; n.d., não disponível).

4. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo determinar a presença de histamina em conservas de peixe e patês comercializadas tanto nos supermercados como nas grandes superfícies de comércio.

O principal problema da histamina prende-se com o facto de esta não ser eliminada no processo de pasteurização e esterilização (processos utilizados na produção de conservas de peixe e patês), visto esta ser bastante estável ao calor.

O consumo de conservas de atum e também o consumo de sardinha tem vindo a aumentar ao longo dos anos, é por isso essencial que haja um controlo contínuo da concentração de histamina no produto, visto ser uma substância prejudicial para o produto e consequentemente para o consumidor. Níveis acima do permitido podem provocar um grave problema de saúde pública.

Apesar do reduzido número de amostras analisadas podemos concluir que as conservas e patês analisadas cumprem com os requisitos europeus. Das quarenta amostras nenhuma apresentou valores positivos de histamina.

Assim sendo, os parâmetros de qualidade e segurança alimentar exigidos a uma empresa do ramo alimentar, neste caso, empresas ligadas ao comércio de peixe cumprem com as normas exigidas por lei.

Apesar dos estudos realizados nesta área serem escassos, tanto a nível Europeu como a nível Nacional, os valores verificados neste trabalho sugerem que os produtos Portugueses são de qualidade quando comparados com os valores obtidos em estudos anteriores noutros países.

Para trabalhos futuros seria interessante e pertinente o estudo mais aprofundado de todo o processo de fabrico das conservas de peixe, de forma a verificar quais são os pontos críticos do processo e por sua vez os que são determinantes para a formação de histamina.

5. Bibliografia

ABDSEROTEC - **ELISA Formats - Direct, Indirect, Sandwich and Competition or Inhibition ELISA.** [acedido em 12.05.2015]. Disponível na Internet: <https://www.abdserotec.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>.

ALMEIDA, Cheila - **Seafood consumption in Portugal: Patterns, drivers and sustainability.** Thesis for the degree in Doctor of Sea Sciences. Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal. 2014.

ANDERSON, K. Alfred - **Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets.** Food Chemistry. 107, (2008), p. 761-767.

AOAC Official Method 977.13 - **Histamine in Seafood Fluorometric Method.** (2012)

ASAE, www.asae.pt [acedido em 13.03.2015].

CARDOSO, Carlos., *et al* - **Survey into the seafood consumption preferences and patterns in the portuguese population. Gender and regional variability.** Appetite. Appetite 64, (2013), p. 20-31.

CASTRO E MELO - Associação Nacional dos Industriais de Conservas de Peixe. - **A Indústria Conserveira em Portugal: Um mercado em crescimento.** [acedido em 16 de março de 2014].

CE, 2007. Regulamento (CE) n° 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007. Altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia.

CHEN, Hwi-Chang., *et al* - **Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning.** Food Chemistry. 106 (2008) p. 612-618.

DABROWSKI, Waldemar M., ZDZISLAW, E - **Toxins in food.** Book reviews / Trends in Food Science & Technology. 16 (2005) p. 513-518.

DATAPESCAS, n°103. janeiro a dezembro 2014.

DIAS, João., GUILLOTREAU, Patrice. - **Fish canning industries of France and Portugal**. *Economia Global e Gestão*. Lisboa: INDEG-ISCTE. Vol. X N° 2 (2005), p. 61-79.

DUARTE, S.C., *et al* - **Aflatoxin M₁ in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure**. *Food Control*. 30 (2013) p. 411- 417.

DUFLOS, Guillaume., *et al* - **Relevance of Matrix Effect in Determination of Biogenic Amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*)**. *Journal of AOAC International*. 82, 5 (1999), p. 1097-1101.

EFSA - European Food Safety Authority, ECDC - **Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods**. *EFSA Journal*. 9 (2011), p. 1-93.

EFSA - European Food Safety Authority, ECDC - **European Centre for Disease Prevention and Control - The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011**. *EFSA Journal*. 11, 4 (2013).

EFSA - European Food Safety Authority, ECDC - Scientific report of EFSA: **Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level**. *EFSA Journal* 13, 7: 4162 (2015).

EUMOFA - European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products. **The EU fish market**. (2014).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO - World Health Organization - **Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products**. (2012).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - **Food and Nutrition in Numbers**. (2014).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - **FAO Global Capture Production database updated to 2012 Summary information**. Fisheries and Aquaculture Department, (2014) p. 1-5.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - **Globefish research programme - World Tuna Markets**. 74 (2004).

FDA - Food and Drug Administration's - **Scombrototoxin (Histamine) Formation**. Capítulo 7, (2011).

GAN, Stephanie D., PATEL, Kruti R - **Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**. Journal of Investigative Dermatology. 133 (2013) p. 1-3.

GLITNIR - **European Union Seafood Industry Report**. Glitnir Seafood Research. Germany (2008)

HUNGEEFORD, James - **Scombroid poisoning: A review**. Toxicon. 56 (2010) p. 231-243.

HSU, Hsiu Hua., *et al.* - **Histamine content and histamine-forming bacteria in dried milkfish (Chanos chanos) products**. Food Chemistry. 114 (2009) p. 933-938.

Instituto Nacional de Estatística (INE) - **Boletim Mensal de Agricultura e Pesca**. (2015). ISSN - 1647-1040. 16-18.

JEMINA, E., Angel, PREMA A., THANGAM, E Berla - **Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells**. Molecular Immunology. 62 (2014) p. 19-28.

KIM, Min-Ki., MAH, Jae-Hyung., HWANG, Han-Joon - **Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish**. Food Chemistry. 116 (2009) p. 87-95.

KHEZRI, Mohammad., *et al.* - **Determination of histamine in canned tuna using ELISA method**. DAMA International. Trends in life sciences. 3, 2 (2014) p. 95-101.

LEHANE, Leigh., OLLEY, June - **Histamine fish poisoning revisited**. International Journal of Food Microbiology. 58 (2000) 1-37.

MAHMOUDI, Razzagh., NORIAN, Reza - **Occurrence of histamine in canned tuna fish from Iran**. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 9 (2014) p. 133-136.

MAINTZ, Laura., NOVAK, Natalija - **Histamine and histamine intolerance**. The American Journal of Clinical Nutrition. 85 (2007) p. 1185-1196.

MARCOBAL, A., *et al.* - **Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines**. Food Research International. 38 (2005) p. 387-394.

MONGRUEL, Rémi., *et al.* - **Turning a fish into a brand: A Century of rent-seeking strategies in the tuna canning industry.** IIFET Montpellier Proceedings. (2010).

MORET, Sabrina., *et al.* - **A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables.** Food Chemistry. 89, (2005), p. 355-361.

OLIVEIRA, Rodrigo Barbosa Acioli., *et al.* - **Tuna fishing, capture and post-capture practices in the northeast of Brazil and their effects on histamine and other bioactive amines.** Food Control. 25 (2012) p. 64-68.

RABIE, Mohamed A., *et al.* - **Changes in biogenic amine contents throughout storage of canned fish products.** Pakistan Journal of Food Sciences, 24 (2014) p. 137-150.

RASFF - The Rapid Alert System for Food and Feed. **2013 Annual Report.** (2014).

RODRIGUEZ, Mariana Bacellar Ribas., *et al.* - **Bioactive Amines: Aspects of Quality and Safety in Food.** Food and Nutrition Sciences. 5 (2014) p. 138-146.

SATO, Tsuneo., HORIUCHI, Tatsuo., NISHIMURA, Ikuko - **Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium sp.*** Analytical Biochemistry. 346 (2005) p. 320–326.

SHAHID Mohammad., *et al.* - **Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review.** The Open Immunology Journal. 39 (2009) p. 1786-1800.

SHALABY, A - **Significance of biogenic amines to food safety and human health.** Food Research International. 29, 7 (1996) p. 675-690.

SILVA, A - **A I Guerra Mundial deu “lucros! muitos lucros!” à indústria das conservas.** Jornal Público. [acedido em 17 de março de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.publico.pt/culturaipsilon/noticia/a-i-guerra-mundial-deu-lucros-muitos-lucros-a-industria-das-conservas-1668065>

SILVA, Tarliane M., *et al.* - **Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna.** Food Control. 22 (2011) p. 323-327.

STROKA, Joerg., *et al.* - **Equivalence testing of histamine methods - Final Report.** Jcr Science Policy Report. (2014).

TAO, Zhihua., *et al.* - **A survey of histamine content in seafood sold in markets of nine countries.** Food Control. 22 (2011) p. 430-432.

TEIXEIRA A., *et al.* - **Fish and seafood in Portugal - a review of its availability and consumption.** Report for the IJUP 2012-2013 Project (2013).

TENGARRINHA, Margarida., *et al.* - **De Pé Sobre a Terra. Estudos Sobre a Indústria, o Trabalho e o Movimento Operário em Portugal.** 1ª Edição. 2013. ISBN 978-989-98170-1-2.

UNIÃO EUROPEIA - **Seafood Industry Report.** Glitnir Seafood Research. (2008).

VALIGRA, Lori - **The Father of Food Preservation.** Food Quality & Safety magazine. (2011) [acedido a 19 de março de 2014]. Disponível na internet: http://www.foodquality.com/details/article/1023773/The_Father_of_Food_Preservation.html

VEIGA, Alexandra., *et al.* - **Perfil de riscos dos principais alimentos consumidos em Portugal.** ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2012) 238-239.

VOSIKIS, V., *et al.* - **Survey of the histamine content in fish samples randomly selected from the Greek retail market.** Food Additives and Contaminants. 1, 2B, (2008) p. 122-129.

WILSON, Ben J., MUSTO, Richard J., GHALI, William A - **A Case of Histamine Fish Poisoning in a Young Atopic Woman.** JGIM. 27, 7 (2012) p. 878-81.

YIANNOPOULOS, S., *et al.* - **A survey for determining the presence of histamine in fishes of the Cyprus market.** (2006).

YEH, Chuan Yi., LIN, Shin Jung., HWANG, Deng-Fwu - **Biogenic Amines and Histamine of Marlin Fillet and Spotted Mackerel Fillet Sampled from Cafeteria and Anchovy from Fish Market in Keelung.** Journal of Food and Drug Analysis. 12, 2 (2004) p. 128-132.