

# PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA HISTAMINA PARA ANÁLISES QUALITATIVAS DE PEIXES E FRUTOS DO MAR<sup>1</sup>

KEILA MARIA RONCATO DUARTE<sup>2</sup>, LUIZ HUMBERTO GOMES<sup>3</sup>, ANA MARIA BRANCALION GIACOMELLI<sup>3</sup>, BRUNA OLIVEIRA<sup>4</sup>, NATÁLIA ALEXANDRINO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 11/08/08. Aceito para publicação em 13/10/08.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal (CPDGRA), Laboratório de Biotecnologia aplicada à Produção Animal, Insituto de Zootecnia (IZ), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Rua Heitor Pentead, 56. 13460-000. Nova Odessa, SP, Brasil. E-mail: [keila@iz.sp.gov.br](mailto:keila@iz.sp.gov.br)

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Laboratório de Genética de Leveduras, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Caixa postal 83, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba, SP

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo a produção de anticorpos policlonais contra histamina, que é uma amina biogênica produzida pela decarboxilação do aminoácido histidina. A análise qualitativa e quantitativa da histamina em peixes e frutos do mar comercializados torna-se importante devido ao fato desta ser tóxica ao organismo humano quando coexistente com as aminas biogênicas cadaverina e putrescina, também produzidas por decarboxilação de aminoácidos no processo *pós-mortem*. Os anticorpos policlonais produzidos foram utilizados em ensaios do tipo PTA-ELISA (“plate trapped antigen - enzyme linked immunosorbent assay”) para avaliação da presença de histamina em peixes (pescada, tilápia, manjuba, sardinha, salmão e pintado) e em frutos do mar (lula e camarão) durante o processo de armazenamento. Os anticorpos mostraram sensibilidade na detecção de 1 ng de histamina por grama de amostra analisada. A histamina apresentou picos de liberação nos diferentes materiais analisados por 50 horas, mantidos sobre o gelo e foi também verificada a presença de 14 bactérias contaminando e degradando aminoácidos na superfície das amostras, ao longo do teste. O ELISA se mostrou bastante eficiente e sensível para determinação da presença de histamina nos alimentos.

Palavras-chave: anticorpo policlonal, histamina, PTA-ELISA.

## FISH AND SEAFOOD QUALITATIVE ANALYSIS USING ANTI-HISTAMINE POLYCLONAL ANTIBODIES

ABSTRACT: This paper had the objective to produce polyclonal antibodies against histamine, which is a biogenic amine produced by the histidin aminoacid decarboxilation. The qualitative analysis of histamine in commercialized fish and seafood is very important for human health, once the histamine presence is followed by cadaverine, spermidine and putrescine, all produced during the *post-mortem* process. Polyclonal antibodies were raised against histamine and used in PTA-ELISA tests (“plate trapped antigen - enzyme linked immunosorbent assay”) to evaluate the presence of histamine in frozen fish (“pescada”, cat fish, sardines, salmon, “manjuba”, tilapia fillets) and for seafood (shrimp and common squid) during storage process. The antibodies showed sensibility up to 1 ng of histamine per gram of samples. Histamine appears as picks during the 50 hours of analysis, for the fish and seafood samples, maintained on the top of crushed ice. Bacterial growth was also determined, being identified 14 species transforming aminoacids on the samples surface during the process of analysis. ELISA showed to be an efficient and sensible test for the hitamine presence.

Key words: polyclonal antibody, histamine, PTA-ELISA.

## INTRODUÇÃO

A histamina (4-(2-aminoethyl)imidazole) é uma amina biogênica formada pelo processo de descarboxilação do aminoácido histidina (SERRAR *et al.*, 1995). Este processo ocorre de duas maneiras bioquímicas: endógena (ocorrência natural) ou decomposição exógena realizada por enzimas produzidas pela microflora associada (WENDAHOON e SAKAGUSHI, 1992).

A histamina endógena desempenha importante papel em vários processos biológicos incluindo vasodilatação, anafilaxia e secreção gástrica (SERRAR *et al.*, 1995), já a exógena ocorre nos processos *pós-mortem*, principalmente de peixes e frutos do mar, sendo resultado das descarboxilases produzidas pelo crescimento bacteriano. Neste processo também são formadas as diaminas cadaverina e putrecina, a partir dos aminoácidos Lisina e Ornitina (Figura 1), as quais desenvolvem papel vital no crescimento de algumas bactérias (RAWLES *et al.*, 1996).

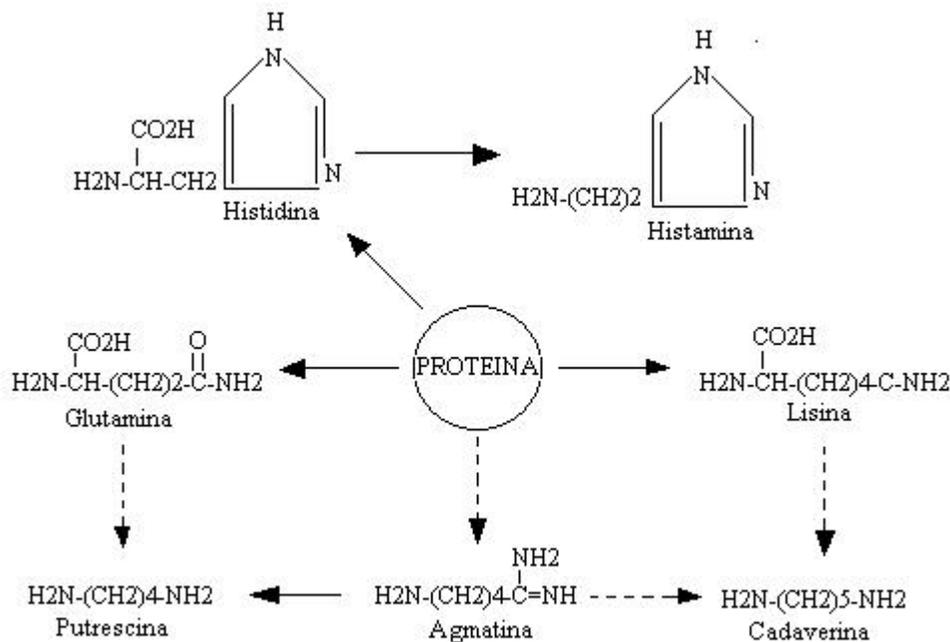


Figura 1. Rotas biológicas para formação de Histamina, Cadaverina e Putrescina a partir de proteína (Adaptado de RAWLES *et al.*, 1996)

O consumo de altas quantidades destas aminas pode resultar em sintomas de intoxicação com dores de cabeça, náuseas, coceira, hipo ou hipertensão (KOVÁCS *et al.*, 1999).

Quando isolada, a histamina é detoxificada por enzimas diamina-oxidase e *N*-metiltransferase existentes no intestino, no entanto, a presença de cadaverina e putrecina interferem nesse sistema de detoxicação normal da histamina, de modo que a histamina passa a ter potencial nocivo ao organismo humano (RAWLES *et al.*, 1996). Deste modo torna-se importante a existência de métodos de análise

qualitativa e quantitativa de histamina em alimentos como peixes e frutos do mar.

RAWLES *et al.* (1996) relataram oito métodos de determinação de aminas biogênicas em peixes empregando diferentes técnicas analíticas, dentre elas: cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), testes imunoenzimáticos e eletroforese capilar.

KOVÁCS *et al.* (1999) determinaram sete aminas biogênicas pelo método de eletroforese capilar, dentre as quais a histamina, e concluíram que o método

é rápido, simples e reprodutível, porém de custo elevado.

SERRAR *et al.* (1995) desenvolveram anticorpos monoclonais (MAbs) para determinação de histamina em produtos alimentícios oriundos da pesca, e compararam sua aplicação com análises envolvendo HPLC para o mesmo fim, concluindo que o imunoenensaio com MAbs é mais vantajoso por ser mais rápido e não exigir laboratórios com equipamentos muito caros, embora ambos apresentem alta especificidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Material e animais:** A histamina utilizada para as imunizações e para as análises, foi adquirida da SIGMA (H-7125). A cadaverina e espermidina utilizadas para os testes de reação cruzada foram também da Sigma (respectivamente C-1541 e S-2626).

**Obtenção dos anticorpos policlonais:** Camundongos singênicos da linhagem BALB/c mantidos no Biotério do Laboratório de Genética de Leveduras - Depto. de Genética - ESALQ/USP, foram utilizados para as imunizações, as quais foram executadas conforme metodologia adaptada por DUARTE *et al.* (2002). O acoplamento da histamina com BSA foi feito de acordo com HARLOW e LANE (1988), de forma a torná-la imunogênica.

Quatro camundongos fêmeas BALB/c foram imunizados com 0,2mL de solução de histamina conjugada a BSA na concentração de 5mg mL<sup>-1</sup> e PBS na proporção de 1:3 (v/v). As imunizações foram feitas na forma de injeções subcutâneas em dois sítios, tendo sido as duas primeiras imunizações complementadas com Adjuvante Completo de Freund (F5881-SIGMA). As imunizações foram realizadas em intervalos de 15 dias, num total de seis imunizações em cada animal. A titulação dos soros dos animais foi realizada por teste indireto de ELISA (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

**ELISA:** A titulação dos soros de camundongo foram feitas através de ensaio imunoenzimático do tipo PTA- ELISA indireto (CROWTHER, 1995), incubados a 37°C, revelado com peroxidase e/ou fosfatase alcalina, lidos a comprimentos de onda de 492nm e/ou 405nm respectivamente.

**Coleta das amostras para ensaio piloto:** Filés de

pescada com pele foram submetidos a duas temperaturas de armazenamento: temperatura ambiente e sob refrigeração (ao redor de 10°C). Uma quantidade de 2g de amostra foram coletadas diariamente para a pescada refrigerada e a cada duas horas para a pescada à temperatura ambiente. As amostras foram cortadas com estilete estéril, congeladas a -20°C. Ao final da coleta, todas as amostras foram trituradas (Triturador Heidolph DiAx 900, TYP10G) com tampão 0,05mol L<sup>-1</sup> fosfato de sódio, pH 7,5 e incubados 2 horas a 37°C. A mistura foi centrifugada a 3.000 G por 30 minutos, o sobrenadante coletado e, novamente centrifugado a 10.000g por 10 minutos antes do ensaio (ROSSELOT *et al.*, 1996). Para os ELISA, 50µL deste sobrenadante foram adicionados à placa.

**Amostras de peixes e frutos do mar:** Foram adquiridos de uma grande rede de supermercados, peixes e frutos do mar dispostos sobre o gelo, tomando-se o cuidado de obter as amostras no dia de chegada do material ao supermercado. As amostras utilizadas foram: sardinha fresca; filé de tilápia; lula; manjuba; postas de salmão; postas de pintado e; camarão cinza.

Estes materiais foram mantidos no gelo, semelhante à condição do supermercado e após 18; 24; 35 e 50 horas, triturados e utilizados no ELISA conforme citado anteriormente.

**Caracterização de microrganismos presentes nas amostras:** para caracterização de microrganismos presentes nas amostras coletadas foram utilizadas amostras também coletadas a zero hora; 18; 24; 35 e 50 horas de armazenamento, utilizando 13 provas bioquímicas (FRANK *et al.*, 1985) .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ensaio imunoenzimático

Entre os quatro camundongos imunizados, escolheu-se o camundongo 3 pois este apresentou melhor evolução de Título dos soros coletados no decorrer do período de imunizações. A curva de calibração do soro do camundongo 3 pode ser observada na Figura 2.

Podemos observar na Figura 3 que a produção de histamina mostra um pico de concentração por volta de 168 horas de armazenamento na geladeira, voltando rapidamente à condição inicial. Isto pode

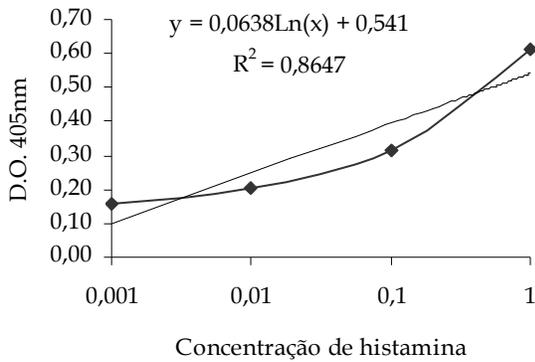


Figura 2. Curva de calibração de histamina, com soro na diluição de 1:200. Histamina na concentração de 1ng a 1ug

ser explicado pelo fato da histamina ser um dos passos metabólicos na deterioração de peixes, sendo portanto precursora de outras substâncias. Na Figura 4, a temperatura favoreceu o aparecimento da histamina após 48 horas, permanecendo alta até 72 horas, quando começou a baixar mas não chegou aos níveis de concentração encontrados na Figura 3.

Uma vez degradada a histidina em histamina, seja por via química ou microbiológica, esta transformação é o início de uma série de degradações que ocorrem em alimentos de origem protéica, no caso de peixes e frutos do mar, devido à alta friabilidade da proteína, dificultando a determina-

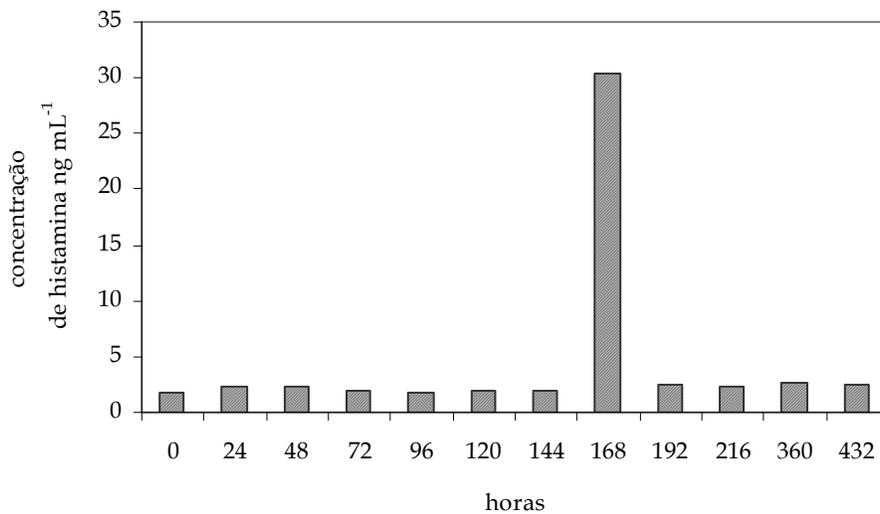


Figura 3. Quantificação de histamina, em ng mL<sup>-1</sup> de amostras de pescada armazenadas a 10°C

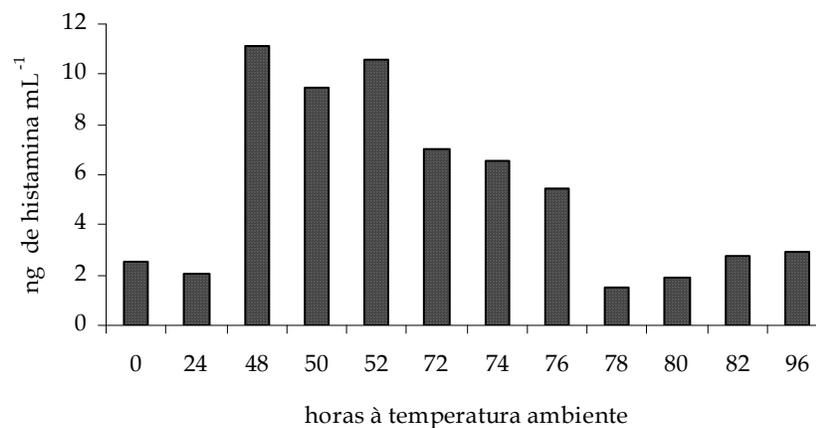


Figura 4. Quantificação de histamina, em ng mL<sup>-1</sup> de amostras de pescada armazenadas a temperatura ambiente

ção precoce do início de deterioração, o que pode levar a quadros alérgicos sérios, além do comprometimento da qualidade do produto.

O modo de disposição dos peixes e frutos do mar nos supermercados, adotados para melhor expor o alimento ao consumidor, permite que somente uma face do produto esteja em contato com o gelo moído, próximo de 0°C (Figura 5), ficando a outra face exposta a temperatura ambiente. Dependendo da espessura do material, esta temperatura chegou a 14°C, o que já implica na deterioração da histidina (NOLTKAMPER, 2008).

Nos ensaios de reação cruzada com cadaverina e espermidina, não houve diferença significativa nas análises realizadas (5% de significância no teste F).

As amostras de peixes e frutos do mar apresentaram níveis de concentração de histamina inferiores aos apresentados pela pescada (Tabela 1) mas com resultados altos no início - a zero hora e altos novamente após 18 horas para manjuba e tilápia, elevação da concentração com 24 horas para lula e 35 horas para manjuba, tilápia, salmão e sardinha. Exceções feitas para amostras de camarão e de pintado, onde não houve aumento considerável da concentração de histamina após a coleta. Esta oscilação pode ser explicada com a transformação de histidina em histamina (NOLTKAMPER, 2008) e depois esta histamina é biotransformada em outros compostos. Com a exposição de novos tecidos ao ambiente, novamente há picos de histamina nas amostras, que ao final das 50 horas, é praticamente biotransformada pela ação de microrganismos oportunistas.



Figura 5. Armazenamento semelhante às condições do supermercado (amostras sobre o gelo picado)

Tabela 1. Densidade Ótica (D.O. a 405 nm) das amostras de peixes, coletados em diferentes tempos, submetidos ao imunoenensaio (ELISA) para quantificação de histamina utilizando anticorpo policlonal

horas	Tipo de peixe e/ou fruto do mar							
	pescada	lula	camarão	manjuba	tilápia	pintado	salmão	sardinha
0	2,23	0,622	0,27	0,533	2,9	1,23	0,42	2,9
18	2,9	0,83	0,48	1,234	2,146	0,54	0,964	1,134
24	2,9	1,2	0,48	0,46	1,83	0,66	0,768	0,724
35	2,9	0,71	0,48	0,893	2,086	0,378	1,865	1,618
50	2,65	1,726	0,65	1,94	1,312	0,363	0,956	0,52

Pelas provas bioquímicas (TAYLOR e SPECKHARD, 1983) foi possível identificar 11 espécies e 3 gêneros (Tabela 2) presentes nas amostras, o que justifica os picos de histamina pela ação microbiológica na degradação de histidina nos tecidos dos peixes e frutos do mar amostrados (ALEXANDRINO et al., 2004).

**Tabela 2. Microrganismos isolados nas provas bioquímicas das amostras de peixes e frutos do mar, onde "n" é o número de vezes que este microrganismo apareceu nas amostras**

microrganismo identificado	n
<i>Proteus</i>	1
<i>Salmonella</i>	1
<i>Enterobacter</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	6
<i>E. coli</i>	4
<i>Proteus vulgaris</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	3
<i>Salmonella tipica</i>	3
<i>Enterobacter cloacea</i>	3
<i>Serratia liquefaciens</i>	1
<i>Salmonella typhi</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Hafnia alvei</i>	1

n: número de vezes que aparece nas amostras

## CONCLUSÕES

Pôde-se concluir com a análise dos resultados apresentados que as imunizações causaram reações imunológicas suficientes para a obtenção de células produtoras de anticorpos.

A pescada sob refrigeração apresentou deterioração a partir do quinto dia enquanto que as amostras à temperatura ambiente apresentaram alta quantidade de histamina já no segundo dia. Em grandes redes de supermercados, peixes e frutos do mar ficam sobre o gelo, apresentando uma variação muito grande de temperatura, que nunca deve exceder os 10°C (BRILLANTES e SAMOSORN, 2001), comprometendo a qualidade dos produtos a serem consumidos, uma vez que ficam expostos durante dias nesta condição.

Como considerações finais, podemos observar que o início da degradação química dos

aminoácidos, no caso de peixes e frutos do mar, é sempre precursora de contaminação bacteriana, o que agrava os quadros alérgicos e a qualidade do alimento. Níveis altos de histamina não só são indicativos de deterioração como levam a complicações bastante graves na população sensível, causando alergias que vão desde avermelhamentos superficiais até quadros graves de intoxicação. O uso de tecnologia que disponibilize testes rápidos e pouco onerosos para determinação de contaminantes é uma questão de saúde pública e devem ser priorizadas na pesquisa e na aplicação da tecnologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRINO, N. et al. Caracterização de microrganismos produtores de histamina em amostras de frutos do mar. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 12., 2004, Piracicaba. **Anais/CD-Rom...** Piracicaba: USP, 2004.

BRILLANTES, S.; SAMOSORN, W. Determination of histamine in fish sauce from Thailand using a solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Fisheries Science**, v.67, n. 6, p. 1163-1168, 2001.

CROWTHER, J.R. **ELISA: theory and practice**. Totowa: Humana Press, 1995. 223 p. (Methods in Molecular Biology, 42).

DUARTE, K.M.R. et al. Identificação do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) tobamovirus, por meio de anticorpos monoclonais. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 1, p. 107-112, 2002.

FRANK, H.A. et al. Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahimahi (*Coyphaena hippurus*) after incubation at 0 and 3°C. **Journal Food Microbiology**, v.2, p.331-340,1985.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies - a laboratory manual**. 2. ed.. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.

KOVÁCS, A.; SARKADI, L.S.; GANZLER, K.. Determination of Biogenic amines by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 836, p. 305-313, 1999.

NOLTKAMPER, D. **Toxicity, Marine - Histamine In Fish** <http://www.emedicine.com/ped/topic1012.htm> (acesso em: 05 de ago.2008)

OLIVEIRA, B.G. et al. Doses ideais de histamina para pro-

dução de anticorpos policlonais para análise quantitativa de alimentos de origem animal. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 12., 2004, Piracicaba. **Anais/CD-Rom...** Piracicaba: USP, 2004.

RAWLES, D.D.; FLICK, G.J.; MARTIN, R.E. Biogenic amines in fish and shellfish. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 39, p. 329-365, 1996.

ROSSELOT, G.I.; LOPEZ-LASTRA, M.; McMURTRY, J.P. Determination of gizzerosine activity in fish meal with a homologous radioimmunoassay. **Poultry Science**, v.75, p.873-880, 1996.

SERRAR, D. et al. The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay. **Food Chemistry**, v. 54, p. 85-91, 1995.

TAYLOR, S.L.; SPECKHARD, M.W. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. **Marine Fishery**, v. 45, p. 35-39, 1983.

WENDAKOON, C.N.; SAKAGUUCHI, M. Effects of spices on growth and biogenic amine formation by bacteria in fish muscle. In: HUSS, H.H. ; M.JAKOBSEN, J.; LISTON, J. (Eds). **Quality Assurance in the Fish Industry**. Amsterdam: Elsevier, 1999. v. 30. p. 305-313.