

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL**

**DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM
QUEIJOS E FILÉS DE TILÁPIA POR
CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

FERNANDA LIMA CUNHA

NITERÓI

2012

FERNANDA LIMA CUNHA

**DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM DIFERENTES TIPOS DE
QUEIJOS E FILÉS DE TILÁPIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau Doutor em Medicina Veterinária - Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADORES: PROFESSOR DR. SÉRGIO BORGES MANO
PROFESSOR DR. CARLOS ADAM CONTE JÚNIOR
CO-ORIENTADORA PROFESSORA DRA.: ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO

Niterói
2012

FERNANDA LIMA CUNHA

DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM DIFERENTES TIPOS DE
QUEIJOS E FILÉS DE TILÁPIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária - Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 31 de outubro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Sérgio Borges Mano
UFF

Professor Dra. Eliane Teixeira Mársico
UFF

Professor Dr. Carlos Adam Conte Júnior
UFF

Professor Dr. Thiago da Silveira Alvarez
UFRJ

Dra. Claudia Emília Teixeira
PNPD/CAPES

Niterói
2012

Dedico este trabalho à minha família: meus pais
minha irmã, ao meu marido às minhas sobrinhas
os maiores incentivadores da busca pelos meus
objetivos, ao longo de toda a minha vida.

"O sucesso é a soma de pequenos esforços -
repetidos dia sim, e no outro dia também."

Robert Collier

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado coragem, inteligência e determinação para superar todas as dificuldades e conseguir alcançar o meu objetivo.

Aos meus pais, à minha irmã, que sempre me deram o exemplo, a força necessária, o carinho, a atenção e o apoio para vencer as dificuldades do dia-a-dia e para concluir o meu doutorado.

Ao meu marido Márcio Campista, pelo carinho, apoio e compreensão.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Sérgio Borges Mano e Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior pelo apoio, pela atenção, pelo carinho, pelo incentivo.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Eliane Teixeira Mársico, pelo apoio e atenção.

Aos queridos Drausio de Paiva Ferreira, Mariana Ferreira e André Luiz da Silva Veiga, secretários do Programa de Pós Graduação, pela disponibilidade, eficiência e amizade.

A todos os professores que tive durante o curso de doutorado, por demonstrarem interesse, profissionalismo, capacidade.

A todos os meus amigos, pelo companheirismo, carinho e amizade e por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos, em especial as minhas amigas Kênia de Fátima Karrijo, Carla da Silva Carneiro, Carla Grandin, Juliana Paulino Vieira, Roberta Rezende e Vivian Nagel.

A todos os meus colegas e amigos em especial ao César de La Torre, Maria Lúcia e Érica dos Santos pela cooperação e apoio.

Ao Dr. Jano Alves e a Dra Liane Reis por me ajudarem nesta fase da minha vida.

As bibliotecárias Ana e Ana Cláudia pelo apoio e carinho.

A Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

Fernanda Lima Cunha, brasileira, filha de Saul Pereira Cunha e Maria de Lourdes Lima Cunha, nasceu em 12 de fevereiro de 1980, na cidade do Rio de Janeiro. No ano de 1998, ingressou na Universidade Federal Fluminense, onde cursou Medicina Veterinária. No ano de 2005, ingressou no curso de Mestrado, em Higiene e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Em 2008 foi convocada para o concurso do Instituto de Defesa Agropecuária e Estadual do Espírito Santo, no mesmo ano ingressou no curso de Doutorado em Higiene e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Durante o Curso de Doutorado, desenvolveu pesquisas junto à equipe do Laboratório de Controle Físico-Químico de Produtos de Origem Animal, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, que foram enviadas para Revista Adolfo Lutz e Revista Brasileira de Medicina Veterinária. Participou de trabalhos em colaboração com outros alunos que foram enviados para a Revista Analytica Chimica Acta, Revista Brasileira de Ciência Veterinária, Revista Ciência e Agrotecnologia, Revista Brasileira de Medicina Veterinária. Além disso, participou dos Projeto de Extensão em Segurança dos Alimentos como palestrante e do Projeto de Extensão Ciclo de Palestras em Inspeção e Tecnologia de Alimentos como organizadora e palestrante. Participou da organização da II e III Mostras UFF de Tecnologia de Alimentos. Junto ao grupo do Laboratório de Controle Físico-Químico de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense enviou resumos para Congressos e Eventos relacionados (Apêndice).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS, p.9

RESUMO, p.10

ABSTRACT, p.1

1 INTRODUÇÃO, p.1

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.1

2.1

2.2

2.3 MASTITE, p.22

2.4 QUALIDADE DO LEITE, p. 24

2.4.1 Importância dos psicrotróficos, p.25

2.4.2 Métodos de referência para determinação da qualidade do leite , p.27

2.5 PROGRAMA DE PROCEDIMENTOS-PADRÃO DE HIGIENE OPERACIONAL E
PROGRAMA DE BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS, p.30

2.6 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE DE CABRA, p.31

2.7 PRODUTOS E PROCESSAMENTO, p.32

2.8 ASPECTOS IMPORTANTES DA LEGISLAÇÃO, p.33

3 DESENVOLVIMENTO, p.

3.1 , p.35

3.2 , p.37

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.

6 APÊNDICES, p.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Médias e desvios padrões das análises de leite de cabra, obtido em quatro propriedades (A, B, C e D) da região de Nova Friburgo-RJ, referentes aos valores de Gordura, Proteína, Lactose, Extrato Seco, CCS (Contagem de Células Somáticas), Densidade, Índice Crioscópico, Acidez Titulável, Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilos (UFC Mesófilos), Contagem de bactérias Psicotróficas (UFC Psicotróficas) utilizando-se determinações por metodologia Tradicional e Eletrônica, no período de setembro de 2006 a janeiro de 2007, p.43
Tabela 2	Médias e desvios padrões das determinações de Gordura, Proteína, Lactose, Extrato Seco, CCS (Contagem de Células Somáticas), Densidade, Índice Crioscópico, Acidez Titulável (Contagem UFC Mesófilo/ Psicotrófico) utilizando-se determinações por metodologia Tradicional e Eletrônica, no período de setembro de 2006 a janeiro de 2007, p. 44
Figura 1	Percentual de aprovação (gostou, não gostou e indiferente) de 69 pessoas entrevistadas em relação ao consumo do leite de cabra, p 51
Figura 2	Percentual de interesse à provação de 81 pessoas entrevistadas que gostariam ou não de experimentar o leite de cabra, p. 51
Apêndice 1	Questionário das propriedades, p. 63
Apêndice 2	Ordenha da propriedade A, p. 66
Apêndice 3	Teste da caneca telada, p.66
Apêndice 4	Ordenha da propriedade B, p.67
Apêndice 5	Ordenha da propriedade B p. 67
Apêndice 6	Sala de ordenha na propriedade B p. 68
Apêndice 7	Capril da propriedade C, p.69
Apêndice 8	Aparelho utilizado para contagem de células somáticas do leite e análises físico-químicas, p. 70
Apêndice 9	Questionário da verificação da atitude dos consumidores frente ao consumo de leite de cabra, p.71
Apêndice 10	Gráfico da contagem de bactérias aeróbias mesófilas UFC/mL do leite de cabra dos produtores A, B, C e D: comparação entre a metodologia tradicional e eletrônica, p.72
Apêndice 11	Gráfico da contagem de bactérias psicotróficas UFC/mL do leite de cabra dos produtores A, B, C e D, p. 72
Apêndice 12	Gráfico da contagem de células somáticas UFC/mL do leite de cabra dos produtores A, B, C e D. Metodologia eletrônica, p. 73

RESUMO

Palavras-chave:

ABSTRACT

Keywords:

1 INTRODUÇÃO

A vida moderna imprimiu um ritmo acelerado no cotidiano dos indivíduos; no aspecto relacionado à alimentação e teve como repercussão a mudança de hábitos alimentares, com a introdução de refeições rápidas e a utilização de alimentação fora do ambiente doméstico além da substituição de alimentos *in natura* por alimentos processados. Estes fatores levaram ao crescimento da atenção para com a segurança dos alimentos (BENEVIDES, 2004; POLONIO e PERES, 2009).

Desta forma, as mudanças dos hábitos alimentares do consumidor além da competitividade, a crescente busca e oferta de tecnologia das indústrias denota que as mesmas devem estar prontas para atender os desejos do consumidor (SILVA et al., 2008).

A produção de queijo no Brasil em 2010 foi de 40700 toneladas (FAO, 2012), apesar do consumo ainda ser baixo comparado a outros países, vem aumentando nos últimos anos. O setor de laticínios tem grande importância socioeconômica, em especial na fabricação de queijos. Este mercado ocupa atualmente o sexto lugar na produção mundial (SANTOS, 2010), oferecendo ainda uma infinidade de produtos lácteos atendendo aos interesses específicos de certos grupos de consumidores que buscam produtos saudáveis e que não causem risco à saúde dos mesmos (DIAS, 2009). Existem vários tipos diferentes de queijos, entre eles alguns sofrem o processo de maturação decorrente do processamento tecnológico, produz alterações de textura e sabor, associadas principalmente à proteólise da caseína, resultando em um aumento no teor de aminoácidos livres (Joosten, 1986), que por ação de descarboxilases bacterianas produzem aminas biogênicas (Halász et al., 1994; El-Sayed, 1996).

Outra atividade bastante importante no Brasil é a piscicultura e, o *Oreochromis niloticus* é a espécie de peixe mais produzida pela aquicultura nacional, podendo ser encontrada nos diferentes estados brasileiros. Em 2009, esta atividade representou 39% do total do pescado proveniente da piscicultura continental, totalizando 132,957 toneladas (Brasil, 2010).

Entretanto, o pescado apresenta aspectos fisiológicos e bioquímicos que propiciam condições intrínsecas favoráveis à multiplicação microbiana, como pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, altos teores de lipídeos insaturados, nutrientes facilmente utilizáveis por microrganismos, rápida

ação das enzimas autolíticas e alta atividade metabólica da microbiota (Mársico et al. 2006), sendo a ação bacteriana, a principal causa da decomposição do pescado. Esta matriz alimentar apresenta uma microbiota natural variada, principalmente presente no muco superficial, brânquias e trato digestivo. Contudo, tornam-se potencialmente perigosos para os consumidores quando os métodos de sanitização, higienização e conservação são inadequados (Minozzo; Maluf 2007), especialmente devido ao fato da ação microbiana originar inúmeros metabólitos (Rodrigues et al. 2012). Dentre estes alguns compostos apresentam potencial toxicológico a saúde humana, como as aminas biogênicas.

Tanto no queijo quanto no pescado assim como em outros alimentos podem produzir aminas biogênicas, sendo essas definidas como bases orgânicas de baixo peso molecular, de importância biológica em vegetais, animais e células microbianas, formadas principalmente por descarboxilação microbiana de aminoácidos e transaminação de aldeídos e cetonas (PINTADO et al., 2008). A presença de aminas biogênicas é uma condição inerente ao processamento tecnológico de vários alimentos que contenham proteínas ou aminoácidos livres e que estejam sujeitos a condições que permitam a atividade microbiana e/ou bioquímica (SILLA-SANTOS, 1996).

As aminas presentes nos alimentos são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação, ou mediante reações de oxidação por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO) (SMITH, 1981). Sendo assim, as aminas geralmente não apresentam risco à saúde humana. Entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das aminas é inibido, podem causar efeitos tóxicos como: reações alérgicas, caracterizadas pela dificuldade respiratória, prurido, erupção cutânea, vômitos, febre, e hipertensão. (HALÁSZ et al., 1994; LANGE et al., 2002).

Tradicionalmente, a formação de aminas biogênicas nos alimentos tem sido evitada, principalmente, limitando crescimento microbiano através de refrigeração e congelamento. No entanto, tornam-se necessárias outras medidas para prevenir a formação de aminas biogênicas em alimentos atender o consumidor e a indústria que desejam produtos seguros com maior validade comercial, e para reduzir seus níveis ou limitar o crescimento microbiano existe entre outras tecnologias a

irradiação, embalagem em atmosfera modificada que serão abordadas no presente trabalho.

O presente estudo teve como objetivo detectar e quantificar as aminas biogênicas (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) em quatro diferentes tipos de queijos encontrados, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), verificar se o método utilizado é eficaz para a detecção e quantificação das aminas biogênicas nos queijos analisados, além de avaliar a produção de aminas biogênicas durante o período de armazenamento de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) resfriados, embalados em atmosfera modificada e irradiados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AMINAS BIOGÊNICAS

As aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas de baixo peso molecular. São, também, definidas como compostos nitrogenados, em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia foram substituídos por grupos alquila ou arila, como a histamina, que é uma molécula hidrofílica, apresentando um anel imidazólico e um grupo amino conectados por dois grupos metileno. As aminas são formadas por processos bioquímicos e participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas. São encontradas em alimentos de origem animal, vegetal, bem como em alimentos fermentados (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994; CINQUINA et al., 2004a; GLÓRIA, 2005).

A maioria das aminas foi denominada de acordo com o aminoácido precursor, como por exemplo, a histamina, que é originada da histidina, a tiramina da tirosina, a triptamina do triptofano, e assim por diante. No entanto, os nomes cadaverina e putrescina estão associados à decomposição e putrefação, assim como espermina e espermidina com fluidos seminais onde elas foram encontradas pela primeira vez (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005; GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química, da via biossintética e das funções que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (GLÓRIA, 2005). Com relação à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Ainda, em relação à estrutura química, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas

(serotonina) e como imidazolaminas (histamina) (SMITH, 1980-81; BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996).

Quanto à via biossintética, as amins se classificam em naturais, que são formadas durante a biossíntese *in situ*, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina). Por outro lado, as amins biogênicas são formadas por reações de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de amins nos alimentos (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005)

Com relação à função que exercem, as amins bioativas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento, por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular e, em vasoativas e neuroativas, devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ et al., 1993).

As amins biogênicas podem ser formadas por hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos (Figura 4), sendo a última a principal via de formação (MAIJALA et al., 1993; BARDÓCZ, 1995).

A formação de amins biogênicas nos alimentos está condicionada à disponibilidade de aminoácidos livres, presença de microrganismos descarboxilase positivos e, também, às condições favoráveis para o crescimento bacteriano, síntese e ação de enzimas descarboxilantes (SHALABY, 1996).

Os microrganismos com atividade descarboxilante sobre os aminoácidos podem fazer parte da microbiota associada ao alimento, serem introduzidos para obtenção de produtos fermentados, ou ainda, por contaminação antes, durante ou depois do processamento. A quantidade e o tipo de amins nos alimentos em geral, dependem da natureza, origem, etapas de processamento e microrganismos presentes (HALÁSZ et al., 1994).

Dentre os gêneros bacterianos capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos estão incluídos *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Streptococcus*. Espécies de *Enterobacteriaceae* produzem histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (MARINO et al., 2000). Em peixes, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Hafnia alvei* são consideradas importantes formadoras de histamina (GLÓRIA, 2005).

Fatores como temperatura, pH do meio, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e coenzimas, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis podem influenciar na produção de aminas pelos microrganismos. Em meio ácido (pH 2,5 a 6,5), a produção de aminas é estimulada como mecanismo de proteção da bactéria (GLÓRIA, 2005), devido ao fato de que altas concentrações do íon H⁺ tornam-se prejudiciais ao microrganismo fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases (SILLA-SANTOS, 1996). Com relação à temperatura, as descarboxilases são mais ativas em temperaturas inferiores a 30 °C, acima de 40 °C são inativadas e, na faixa de 0 a 10 °C, a atividade dependerá da microbiota presente (HALÁSZ et al., 1994).

As aminas em alimentos podem estar naturalmente presentes no produto, ou serem formadas por microrganismos adicionados (culturas iniciadoras) ou contaminantes, introduzidos devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitárias durante a fabricação de certos produtos (HALÁSZ et al., 1994; KALAČ et al., 2002; GLÓRIA, 2005).

Para formação das poliaminas, os aminoácidos ornitina e arginina são os precursores, sendo a putrescina um composto intermediário obrigatório. Para formar a putrescina, a arginina é transformada em ornitina pela ação da enzima arginase e, em seguida, a ornitina sofre a ação da ornitina descarboxilase (ODC) formando a putrescina (HILLARY & PEGG, 2003; MOINARD et al., 2005). A putrescina pode ser formada por diferentes vias dependendo do organismo vivo. Em animais e fungos a

formação da putrescina ocorre via descarboxilação da ornitina. Células bacterianas possuem uma via alternativa, a descarboxilação da arginina formando agmatina. Em vegetais, a síntese pode ocorrer tanto via agmatina quanto via ornitina (BARDÓCZ, 1995).

Na síntese da espermidina, é adicionado à putrescina um grupo aminopropil derivado da metionina, via S-adenosilmetionina (SAM), e este mesmo grupo é adicionado à espermidina para formar a espermina. As enzimas espermidina e espermina sintases e SAM descarboxilase participam destas reações (GLÓRIA, 2005).

Estudos com microrganismos, animais e plantas têm demonstrado a importância das aminas bioativas no metabolismo e crescimento (SMITH, 1984). As aminas atuam como reservas de nitrogênio, substâncias naturais de crescimento de microrganismos e de vegetais, como hormônios ou fatores de crescimento, aceleram o processo metabólico, participam na regulação da secreção gástrica, na contração e relaxamento do músculo liso, são biomoduladoras e estimulam os neurônios sensoriais, motores e cardiovasculares (SMITH, 1980-1981; STRATTON et al., 1991; BAUZA et al., 1995).

As poliaminas são indispensáveis às células vivas, desempenhando papel importante em diversas funções fisiológicas de humanos e animais (KALAČ & KRAUSOVÁ, 2005). Essas possuem várias interações eletrostáticas com macromoléculas, especialmente DNA (ácido desoxirribonucléico), RNA (ácido ribonucléico) e proteínas, e estão envolvidas na regulação e estimulação de suas sínteses. Estimulam a diferenciação celular, interagindo e moldando vários sistemas intracelulares. São importantes na permeabilidade e estabilidade das membranas celulares e reduzem a permeabilidade da mucosa a macromoléculas e proteínas alergênicas, prevenindo alergias alimentares (DROLET et al., 1986; BARDÓCZ, 1995; LÖSER 2000). De acordo com DROLET et al. (1986) e BARDÓCZ (1995), a espermina e espermidina, assim como as diaminas putrescina e cadaverina, são eficientes sequestradoras de radicais livres em sistemas enzimáticos, químicos e *in vitro*; podem inibir peroxidação de lipídeos e prevenir a senescência. Espermina e

espermidina também têm implicações na renovação e funcionalidade do trato digestivo e na maturação da mucosa intestinal (BARDÓCZ et al., 1993; MOINARD et al., 2005).

Algumas aminas são psicoativas ou vasoativas. A histamina, serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina são psicoativas e atuam como neurotransmissoras no sistema nervoso central. Os neurônios que contêm histamina podem participar na regulação da ingestão de água, da temperatura corporal e da secreção de hormônio antidiurético, bem como no controle da pressão arterial e da percepção da dor (GOODMAN & GILMAN, 2003). As aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras (pressoras) ou vasodilatadoras. Tiramina, feniletilamina, isoamilamina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e triptamina causam um aumento na pressão sangüínea por constrição do sistema vascular e aumento da velocidade e da força da contração cardíaca. A serotonina é vaso e bronco-constritora, está envolvida na regulação de inúmeras funções importantes, incluindo sono, sede, fome, humor e atividade sexual (GLÓRIA, 2005).

Tipicamente, a histamina provoca dilatação dos pequenos vasos sanguíneos, resultando em rubor, diminuição da resistência periférica total, redução da pressão arterial sistêmica, aumento da contração e velocidade do batimento cardíaco e aumento da permeabilidade capilar (GOODMAN & GILMAN, 2003). Além disso, atua na contração e relaxamento do músculo liso, na regulação da secreção gástrica e como estimulante dos neurônios dos sistemas motor e sensorial (SMITH, 1980-1981; TAYLOR, 1986; STRATTON et al., 1991; GLÓRIA, 2005).

Algumas aminas podem ter papel protetor contra predadores. Outras aminas são importantes como precursoras de componentes biológicos importantes, como por exemplo, o hormônio de plantas, ácido indol-3-acético, e o ácido fenilacético que são derivados da triptamina e feniletilamina, respectivamente (COUTTS, 1986).

As aminas bioativas são substâncias importantes na dieta humana, pois desempenham funções fisiológicas essenciais. As aminas presentes nos alimentos são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação, ou mediante reações

de oxidação por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO) (SMITH, 1980-1981). Sendo assim, as amins geralmente não apresentam risco à saúde humana. Entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das amins é inibido, podem causar efeitos tóxicos (HALÁSZ et al., 1994; LANGE et al., 2002).

Indivíduos saudáveis podem metabolizar as amins presentes nos alimentos por acetilação e oxidação. Amins biogênicas são oxidadas pelas MAO e DAO. Poliaminas, em geral, são primeiramente acetiladas e depois oxidadas pelas PAO (GLÓRIA, 2005).

Entretanto, problemas podem ocorrer, caso uma quantidade excessiva seja ingerida e/ou os mecanismos naturais para o catabolismo das amins sejam geneticamente deficientes ou prejudicados por alguma doença ou ação de fármacos. Indivíduos com problemas respiratórios ou coronarianos, hipertensão, com deficiência em vitaminas B12 e com problemas gastrintestinais (gastrite, síndrome do intestino irritado, doença de Crohn, úlcera de estômago) são um grupo de risco, uma vez que a atividade das aminoxidases em seus intestinos é geralmente menor do que em indivíduos saudáveis. Pacientes tomando medicamentos inibidores da MAO, DAO e PAO podem também ser afetados, pelo fato dessas drogas impedirem o catabolismo de amins (Figura 5). Os inibidores de MAO e DAO são usados no tratamento de estresse, depressão, doença de Alzheimer e Parkinson, síndrome do pânico e fobia social (FUZIKAWA et al., 1999; GLÓRIA, 2005).

Segundo BAUZA et al. (1995), o etanol também pode atuar como inibidor da MAO, intervindo no metabolismo das catecolaminas, tiramina e feniletilamina. Altos níveis de amins biogênicas estão relacionados a numerosos episódios de intoxicação, particularmente por histamina e tiramina. A intoxicação por histamina se manifesta de poucos minutos a várias horas após a ingestão do alimento contendo esta amina. Primeiramente, rubor facial e no pescoço é observado, acompanhado por uma sensação de calor, gosto metálico e desconforto. Frequentemente, observa-se uma intensa e pulsante dor de cabeça. Outros sintomas podem ser palpitações cardíacas,

tontura e fraqueza, sede, inchaço dos lábios, urticária, pulsação rápida e fraca e distúrbios gastrointestinais. No entanto, os sintomas mais comuns são urticária, diarreia e dor de cabeça. Em casos severos, bronco espasmos, sufocação e respiração difícil são reportados. A recuperação, em geral, ocorre 8 h após a ingestão (TAYLOR, 1986; SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005; LANDETE et al., 2007).

A histamina pode ser catabolizada por diferentes reações (Figura 6). As duas principais rotas são a oxidação a imidazol-acetaldeído, pela DAO e metilação a 1,4-metil-histamina, pela histamina N-metil-transferase (HMT). Em mamíferos, 60 a 80% dos metabólitos de histamina são derivados da desaminação oxidativa. As aminoxidases estão envolvidas em ambas as rotas; convertem 1,4-metil-histamina ao aldeído correspondente e têm um menor papel na conversão de histamina a imidazol-acetaldeído. Inibidores da MAO podem interferir em qualquer destes estágios, embora o metabolismo da 1,4-metil-histamina seja um dos mais afetados, já que a DAO está primariamente envolvida na conversão de histamina a imidazol-acetaldeído. Esses metabólitos têm pouca ou nenhuma atividade e são excretados na urina (GLÓRIA, 2005).

As aminas putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO, aumentando o seu transporte através da parede gastrintestinal (TAYLOR, 1986). A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados e queijos maturados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida sozinha (SOARES & GLÓRIA, 1994; GLÓRIA, 2005). Após liberação dos grânulos de armazenamento, a histamina exerce um papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas. As ações sobre o músculo liso brônquico e sobre os vasos sanguíneos respondem por muitos sintomas da reação alérgica (GOODMAN & GILMAN, 2003).

As poliaminas espermidina e espermina podem acelerar o crescimento de tumores. Sendo assim, para pacientes em tratamento de câncer recomenda-se uma dieta com reduzidos teores destas substâncias de forma a diminuir o crescimento e progresso do tumor (BARDÓCZ, 1995; LIMA & GLÓRIA, 1999). A espermidina, espermina,

putrescina e cadaverina podem reagir com nitrito sob condições ácidas para formar N-nitrosaminas, muitas das quais apresentam atividade cancerígena (HALÁSZ et al., 1994; SILLA-SANTOS, 1996; ELIASSEN et al., 2002).

A tiramina é outra amina envolvida em intoxicação. Quando alimentos contendo tiramina em altos níveis são ingeridos, uma grande quantidade desta amina não metabolizada pode atingir a corrente sanguínea. Este fato leva à liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático, acarretando em uma variedade de reações fisiológicas. Ocorre um aumento na pressão sanguínea pela vasoconstrição periférica e aumento da potência cardíaca. A tiramina pode também dilatar as pupilas, causando lacrimação, promover salivação, febre, vômito, dor de cabeça e aumento na taxa de respiração e teor de açúcar no sangue.

Quando consomem alimentos ricos em tiramina, aproximadamente 30% dos indivíduos com enxaqueca clássica podem ter crise (GLÓRIA & VIEIRA, 2007). Em pacientes em tratamento com inibidores da MAO, a tiramina pode causar enxaqueca, induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (MAGA, 1978; SMITH, 1980-1981; MAIJALA et al., 1993; LEHANE & OLLEY, 2000). Vários casos de intoxicação por tiramina foram reportados pela ingestão de queijos e bebidas alcoólicas. Os sintomas duram de 10 minutos a 6 horas, durante os quais quadros de hipertensão e dor de cabeça variam. Podem ocorrer também alterações visuais, vômitos, contração muscular, confusão mental ou excitação. Dores no peito simulando angina pectorial, falha coronariana grave, edema pulmonar e hemorragia cerebral já foram descritos. Incidentes fatais foram reportados na literatura (SHALABY, 1996; GLÓRIA & VIEIRA, 2007). A Tabela 4 apresenta diversos efeitos tóxicos relacionados as aminas bioativas.

As aminas podem ser empregadas como índice ou critério de qualidade (DONHAUSER et al., 1993), refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênicas prevalentes durante a produção, processamento e armazenamento de certos produtos (TAYLOR, 1986; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997). Podem também ser usadas como um indicador do alimento deteriorado, uma vez que a deterioração microbiana pode ser acompanhada pelo

aumento da produção de descarboxilases (HALÁSZ et al., 1994). Uma vantagem do uso de aminas como critério de qualidade reside no fato destas serem termo-resistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico (LIMA & GLÓRIA, 1999).

2.2 QUEIJOS

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996), entende-se por queijo, o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Entende-se ainda por queijo fresco, aquele que está pronto para consumo logo após sua fabricação.

A prática de fabricação de queijos, originalmente, foi concebida com o objetivo de estender o prazo de validade comercial do leite e conservar seus componentes nutricionais (BERESFORD, 2001).

Nem todos os componentes do leite estão presentes no queijo, pois a caseína ao aglutinar-se separa a fase sólida da água resultando em um concentrado protéico gorduroso. As globulinas, albuminas, lactose e algumas vitaminas e sais permanecem na fase líquida formando junto com a água, o soro. Com relação aos sais minerais, os queijos fabricados através de coagulação enzimática retêm mais da metade do cálcio e do fósforo existente no leite (CRUZ e GOMES, 2001).

2.3 TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), dentre as espécies cultivadas, obteve maior destaque na piscicultura por suas características sensoriais, bom rendimento de filé,

alta produtividade e rusticidade (Marengoni 2006), tornando-se bastante atraente em todo o país por demonstrar boa adaptabilidade em diversas condições ambientais, boa conversão alimentar e carne de textura firme (Wagner et al. 2004), com qualidade superior e sem espinhos, o que facilita o trabalho de filetagem, além de apresentar boa aceitação no mercado (Figueiredo; Valente 2008). Este fato, bem como o sabor, valor nutritivo e baixo custo vêm impulsionando a expansão da tilápia no Brasil. Além disso, devido sua facilidade de cultivo, os piscicultores despertaram atenção para esta espécie o que, conseqüentemente, manifestou o interesse das indústrias em processar este peixe (Simões et al. 2007). Atualmente, o *Oreochromis niloticus* é a espécie de peixe mais produzida pela aquicultura nacional, podendo ser encontrada nos diferentes estados brasileiros. Em 2009, esta atividade representou 39% do total do pescado proveniente da piscicultura continental, totalizando 132,957 toneladas (Brasil 2010).

2.4 EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA

2.5 IRRADIAÇÃO

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Determinação de aminas biogênicas em diferentes tipos de queijos por cromatografia líquida de alta eficiência

Determination of biogenic amines in different cheeses kinds by high-performance liquid chromatography

Fernanda Lima CUNHA^{1*}, Carlos Adam CONTE JUNIOR¹, César Aquiles LÁZARO¹, Lucas Rabaça dos SANTOS¹, Eliane Teixeira MÁRSICO¹, Sérgio Borges MANO¹

* Endereço para correspondência: Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64. Niterói – RJ. CEP 24.230-340. E-mail: nandavetuff@yahoo.com.br

¹Departamento de Tecnologia dos Alimentos - Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

RESUMO

As aminas biogênicas (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) foram determinadas e quantificadas em quatro diferentes tipos de queijos utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para realizar o estudo, foram adquiridas 10 amostras de cada tipo de queijo: gouda, minas frescal, mussarela e prato no mercado varejista do Rio de Janeiro. As 40 amostras passaram pelas etapas de extração e derivatização das aminas biogênicas, as quais foram detectadas e quantificadas por CLAE-UV. Para avaliar as diferenças entre os queijos foi aplicada à análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Dentre os queijos estudados, o minas frescal apresentou os mais baixos teores de aminas biogênicas (24,26 mg Kg⁻¹), e os teores mais elevados (489,15 mg Kg⁻¹) foram detectados no gouda. Das aminas biogênicas analisadas, a tiramina foi a que demonstrou concentrações mais elevadas (623,60 mg Kg⁻¹) e a espermidina as menores concentrações (0,80 mg Kg⁻¹), considerando-se os quatro tipos de queijos estudados. O queijo gouda parece ser o que requer

maiores cuidados com relação ao monitoramento da presença de aminas biogênicas. A metodologia utilizada mostrou ser eficaz para efetuar a detecção e quantificação das aminas biogênicas nos queijos analisados.

Palavras-chave. queijos, aminas biogênicas, CLAE

ABSTRACT

This study aimed at detecting and quantifying the biogenic amines (cadaverine, spermidine, histamine, putrescine and tyramine) in four different kinds of cheeses, using high performance liquid chromatography (HPLC). For this study, ten samples of kinds of cheese: gouda, *minas*, mozzarella and *prato* were purchased in the retail market of Rio de Janeiro. Biogenic amines were previously extracted and derivatized; there after, these amines were detected and quantified by HPLC-UV. For assessing the differences among the analyzed cheeses, the data were applied to ANOVA and Tukey's test. Among the analyzed cheeses, *minas* cheese showed the lowest amounts of amine (24.26 mg Kg^{-1}), and the highest contents ($489.15 \text{ mg Kg}^{-1}$) were found in gouda cheese. As for the investigated biogenic amines, tyramine showed the highest concentrations ($623.60 \text{ mg kg}^{-1}$) and spermidine was found at the lowest concentration (0.80 mg Kg^{-1}) in four types of cheese. This study points out that the gouda cheese seems to demand much more careful processing for monitoring the biogenic amines. Also, the used methodology was effective for detecting and quantifying the biogenic amines in analyzed cheeses samples.

Keywords. cheeses, biogenic amines, HPLC

INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular, de importância biológica em vegetais, animais e células microbianas, formadas principalmente por descarboxilação microbiana de aminoácidos e transaminação de aldeídos e cetonas¹. A presença de aminas biogênicas é uma condição inerente ao processamento tecnológico de

vários alimentos que contenham proteínas ou aminoácidos livres e que estejam sujeitos a condições que permitam a atividade microbiana e/ou bioquímica².

As aminas podem ser classificadas de acordo com o número de grupos amínicos em: monoaminas, diaminas e poliaminas. Quanto à estrutura química, são classificadas em aromáticas (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, serotonina, dopamina e octopamina); diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina); poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina) e heterocíclicas (histamina, triptamina, serotonina)³.

O estudo de aminas biogênicas em alimentos, apresenta correlação direta com a qualidade da matriz alimentar e a saúde do consumidor. Questões relacionadas à saúde envolvem, em particular, a intoxicação histamínica, com sintomatologia variada de acordo com a quantidade ingerida e a sensibilidade do indivíduo. Os principais sintomas são: náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, edema cutâneo, urticária, hipotensão, cefaléia, vertigens, rubor e ardência na boca⁴. Em casos graves, em curto espaço de tempo, podem ocorrer dores torácicas e distúrbios respiratórios⁵. Na presença de nitritos as aminas podem formar N-nitrosaminas, as quais têm ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica⁶.

Entre as aminas biogênicas, a ação da tiramina é particularmente importante, uma vez que a intoxicação por essa amina desencadeia crises hipertensivas e enxaquecóides, náuseas, vômito, angústia respiratória e palpitação⁷. Os riscos da ingestão de alimentos com aminas biogênicas podem ser maiores se os sistemas enzimáticos estiverem bloqueados por inibidores da mono ou diamino oxidase ou, se o indivíduo for portador de doenças gastrointestinais, deficiências genéticas, ou fatores de potencialização, como o consumo de álcool⁸.

No Brasil, o setor de laticínios tem grande importância socioeconômica, em especial na fabricação de queijos. Este mercado ocupa atualmente o sexto lugar na produção mundial⁹, oferecendo ainda uma infinidade de produtos lácteos atendendo aos interesses específicos de

certos grupos de consumidores que buscam produtos saudáveis e que não causem risco à saúde dos mesmos ¹⁰.

O processo de maturação decorrente do processamento tecnológico, produz alterações de textura e sabor, associadas principalmente à proteólise da caseína, resultando em um aumento no teor de aminoácidos livres¹¹, que por ação de descarboxilases bacterianas produzem aminas biogênicas^{12,13}. Microrganismos com atividade descarboxilase podem estar relacionados a utilização de culturas “starter”¹⁴ ou, microrganismos contaminantes provenientes do leite ou do processo de obtenção tecnológica do queijo¹⁵. É possível também utilizar a determinação de aminas biogênicas como um parâmetro de qualidade no processo de fabricação¹⁶ ou como, indicador do grau de proteólise, característico de alguns tipos de queijos especiais¹⁷.

Várias técnicas analíticas como eletroforese capilar (EC), cromatografia em camada delgada (CCD)¹⁸, cromatografia gasosa (CG)¹⁹, cromatografia de troca iônica²⁰ e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)¹⁶ têm sido propostas para a determinação de aminas biogênicas em matrizes alimentares. Dentre as técnicas citadas, a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa é considerada a mais adequada²¹.

Este trabalho justifica-se devido à importância da determinação e quantificação das aminas biogênicas em queijos para saúde pública e pela carência de literatura abordando esse tema no Brasil. Com isso, os resultados obtidos neste estudo irão fornecer à comunidade técnico-científica informações sobre qual dos queijos estudados possui maior risco ao consumidor, assim como, qual das aminas biogênicas está presente em maior quantidade em cada tipo de queijo estudado. O presente estudo teve como objetivo detectar e quantificar as aminas biogênicas (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) em quatro diferentes tipos de queijos encontrados, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE), além de verificar se o método utilizado é eficaz para a detecção e quantificação das aminas biogênicas nos queijos analisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e Reagentes

Os padrões utilizados de cadaverina, putrescina, tiramina, espermidina e histamina foram obtidos do Sigma Aldrich; acetonitrila, ácido perclórico, hidróxido de sódio, éter dietílico da Tedia; e água ultrapura obtida pelo Sistema Simplicity UV Milli-Q (Millipore).

Equipamentos

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu[®] modelo LC/10 AS acoplado ao detector UV SPD/10 AV, com integrador C-R6A Chromatopack. Empregou-se uma coluna Teknokroma, TR-016057 N26243 Tracer Extrasil ODS2 (15 x 0,46 cm, id. 5µm) e pré-coluna Supelco, Ascentis C18 (2 x 0,40 cm, id. 5µm). Homogenizador Certomat[®] MV, B. Braun Biotech International, centrífuga Hermle Z 360 K, banho ultrasônico Cleaner USC 2800 A, filtro Whatman N^o1 de 150 mm, potenciômetro digital de bancada marca Digimed[®] modelo DM 22 e seringa Hamilton microliter, modelo TM 705 de 50 µl.

Condições cromatográficas

Foi utilizado um fluxo de 1 mL min⁻¹, com fase móvel isocrática de acetonitrila:água 42:58 (v:v). O volume de injeção foi de 20 µL. O detector UV foi programado a 198 nm. O tempo de corrida para cada amostra foi de 15 minutos.

Validação do método

O limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e a recuperação foram realizados de acordo com as Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial²².

Obtenção das amostras

Foram analisadas dez amostras de quatro diferentes tipos de queijo: gouda, minas frescal, mussarela e prato, totalizando 40 amostras no período de janeiro a março de 2011, as quais foram adquiridas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro e transportadas em caixa isotérmica com gelo até o laboratório onde permaneceram sob refrigeração até o início das análises.

Extração e derivatização das aminas biogênicas

Para o processo de extração das aminas, foram pesadas cinco gramas da amostra, adicionadas de solução à 5% de HClO_4 , 1:1 (v:p) e vigorosamente homogeneizadas por dois minutos. A mistura foi mantida por uma hora sob refrigeração ($4\pm 2^\circ\text{C}$), com agitação periódica e, em seguida, centrifugada por 503g por dez minutos a $4\pm 1^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi submetido a uma primeira filtração (Whatman n^o.1) seguida da adição de hidróxido de sódio 2N até atingir $\text{pH}>6$. Logo após, a mistura permaneceu em banho de gelo por 20 minutos e realizou-se uma segunda filtragem em condições similares. As amostras foram adicionadas de hidróxido de sódio 2N até $\text{pH}>12$ e, em seguida, realizou-se a derivatização com adição de 40 μL de cloreto de benzoila. A mistura foi homogenizada por 15 segundos e mantida em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 mL de éter dietílico, por duas vezes consecutivas, aproveitando-se a fase etérea (sobrenadante). Evaporou-se o éter em corrente de nitrogênio e ressuspendeu-se em 500 μL da fase móvel.

Quantificação das aminas biogênicas

Foi realizado o método de padrão externo, para o qual as soluções estoque dos padrões de cada amina biogênica (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) foram preparadas em HCl 0,1N e em seguida realizou-se a derivatização e análise dos padrões conforme realizado com as amostras.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA) e posterior diferença de média pelo teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No método utilizado foram obtidos os seguintes tempos de retenção em minutos para cada amina: tiramina (3,3); putrescina (4,3); cadaverina (5,3); espermidina (6,5); e histamina (11,4). O LOD e o LOQ para as aminas estudadas variaram de 0,03 a 1,30 mg L⁻¹ e de 0,20 a 5,00 mg L⁻¹, respectivamente. A recuperação para estas aminas variou de 91 a 107%.

A Tabela 1 apresenta a média e as porcentagens das aminas biogênicas dos queijos gouda, mussarela, prato e minas frescal. O queijo minas frescal apresentou baixos teores de aminas. Esta ocorrência parece estar relacionada principalmente com o fato de não ser um produto maturado, fator esse, que não favorece a formação de aminas sendo a produção limitada às etapas de transporte e estocagem²³.

Na Figura 1 pode ser visualizado o teor médio de aminas por tipo de queijo em mg Kg⁻¹. Comparando-se a concentração das aminas em cada tipo de queijo analisado, observou-se que a concentração de putrescina do queijo gouda foi estatisticamente ($P < 0,01$) superior ao queijo minas, mussarela e prato. Outro resultado expressivo foi observado na concentração de tiramina (361,99 mg Kg⁻¹) e histamina (79,13 mg Kg⁻¹) no queijo gouda. A tiramina presente neste queijo foi estatisticamente ($P < 0,01$) superior, tanto com relação à concentração das demais aminas presentes (73,84%), como em relação à concentração de tiramina dos queijos minas frescal e mussarela. Importante salientar que as aminas biogênicas em concentrações de 100-1000 mg Kg⁻¹ ou superiores podem ter consequências para a saúde dos consumidores, principalmente em pacientes submetidos a tratamento com medicamentos inibidores da mono ou diamino oxidase²³. Outros autores encontraram resultados semelhantes de histamina analisando queijo gouda (76,5 mg Kg⁻¹), no entanto encontraram resultados inferiores de

tiramina ($95,5 \text{ mg Kg}^{-1}$) analisando o mesmo tipo de queijo²⁴. Esta diferença pode ser explicada primeiramente pelas condições higiênicas desse leite, uma vez que estes microrganismos, com atividade descarboxilase, podem contaminar o leite na sua obtenção assim como no processamento tecnológico do queijo¹⁵, outra possível causa seria a utilização de culturas “starter” diferentes¹⁴. Outra justificativa para os diferentes resultados seria a variação da composição proteica do leite que pode ocorrer devido a estação do ano, nutrição, sanidade animal e estágio de lactação^{25,26}.

INSERIR TABELA 1

Assim como outros queijos maturados, o queijo gouda contém altos níveis de aminas biogênicas e está entre os queijos mais frequentemente envolvidos em episódios de intoxicação histamínica. Queijos contendo 10mg de histamina em 100 g de amostra pode causar intoxicação por histamina, 10-80 mg de tiramina pode causar "a reação do queijo" (6 mg se o paciente estiver sendo tratado com inibidores da MAO)^{12,27}. A “reação do queijo” pode ser definida como uma crise hipertensiva, acompanhada de severa dor de cabeça, observada após a ingestão de alimentos ricos em tiramina²⁸.

INSERIR FIGURA 1

A Figura 2 apresenta a porcentagem de aminas biogênicas (tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e histamina) por queijo estudado. No queijo mussarela, entre as aminas determinadas, 56,70% foi tiramina ($96,28 \text{ mg Kg}^{-1}$) e 42,23% de histamina ($71,70 \text{ mg Kg}^{-1}$). No queijo prato, foi observado 81,62% de tiramina ($152,91 \text{ mg Kg}^{-1}$). Estes resultados permitem estabelecer uma correlação com dados da literatura referentes a surtos de intoxicação por histamina relatados após o consumo de queijo e peixe². A histamina é considerada a amina mais tóxica detectada nos alimentos²⁹. Essa amina exerce seu efeito tóxico, ao interagir com dois tipos de receptores (H e Hz) nas membranas celulares dos seres humanos e outras espécies. A histamina causa dilatação dos vasos sanguíneos periféricos,

vasos capilares e artérias, resultando em hipotensão, rubor e cefaléia³⁰. Essa amina induz a contração da musculatura lisa intestinal mediada por receptores H, responsáveis por cólicas abdominais, diarreia e vômito³¹. Os efeitos toxicológicos dependem da concentração de histamina ingerida, da presença de outras amins, da atividade amino-oxidase e da fisiologia intestinal do indivíduo³².

INSERIR FIGURA 2

Outro achado importante foi a alta concentração de tiramina encontrada nos queijos de maior maturação como gouda, prato e mussarela (361,19 mg Kg⁻¹, 152,91 mg Kg⁻¹ e 96,28 mg Kg⁻¹, respectivamente). A tiramina do ponto de vista toxicológico é uma importante amina biogênica, formada pela ação da tirosina descarboxilase, produzida por bactérias presentes em alimentos. Contudo, os mecanismos de desintoxicação no homem podem ser insuficientes nos casos de alta ingestão, por pessoas alérgicas, pacientes que fazem uso de drogas como, os medicamentos anti-parkinsonianos e antidepressivos².

Quando estudado os totais de amins biogênicas presentes nos queijos analisados, observou-se diferença estatística ($P < 0,05$) entre os mesmos. Conforme pode ser verificada na Tabela 1, o queijo gouda apresenta maiores quantidades de amins ($P < 0,05$) quando comparado aos outros queijos estudados. Essa diferença pode ser explicada porque este é o queijo que possui maior tempo de maturação entre os queijos analisados (mínimo de 60 dias de maturação)³³. Os queijos minas e mussarela, assim como, os queijos mussarela e prato, não apresentaram diferença significativa. Contudo quando comparados os queijos minas e prato, estes apresentaram quantidades totais de amins diferentes ($P < 0,05$). Este fato pode também ser explicado devido à diferença do processamento tecnológico destes queijos. O queijo minas é um produto fresco e não sofre maturação³³, já o queijo mussarela tem um período de maturação mínimo de 24 horas³⁴. Por outro lado, o queijo prato apresenta tempo de maturação mínimo de 25 dias³⁵.

A tiramina está incluída no grupo das aminas vasoativas, atuando indiretamente na liberação de noradrenalina do sistema nervoso simpático, provocando um aumento da pressão arterial periférica, vasoconstrição e aumento do débito cardíaco¹¹. Esta amina também provoca dilatação das pupilas, do tecido palpebral, lacrimejamento, salivação, aumento da respiração e dos níveis de glicose sanguínea. A enzima monoamino oxidase desempenha um papel importante na degradação das aminas biogênicas³⁶. No homem, o uso de medicamentos para o tratamento de transtornos mentais e depressão eliminam esse processo de desintoxicação. Assim, altas concentrações de aminas como a tiramina proveniente de alimentos e acumuladas no sangue podem levar a uma crise hipertensiva desses pacientes³⁷.

A espermidina foi encontrada em baixas concentrações em todos os queijos e não houve diferença estatística entre os mesmos. As poliaminas como putrescina, espermidina, espermina e cadaverina são componentes indispensáveis as células vivas, importantes na regulação da função dos ácidos nucléicos, na síntese de proteínas e na estabilização de membranas¹². Poliaminas, como a putrescina, espermidina e cadaverina, não são comumente relacionadas com efeitos adversos sobre a saúde. No entanto, estas aminas podem reagir com nitrito dando origem a nitrosaminas (substâncias com atividade carcinogênica) e estão relacionadas com a perda de qualidade pela degradação dos aminoácidos precursores, sendo indicadores de deterioração ou maturação³⁸. Estas aminas também favorecem a absorção intestinal e diminuem o catabolismo da histamina, potencializando sua toxicidade³⁹.

CONCLUSÃO

O método utilizado mostrou-se eficaz para a detecção e quantificação das aminas biogênicas nos queijos analisados, podendo ser usado no controle de qualidade e/ou fiscalização, para que sejam produzidos e comercializados alimentos dentro dos limites seguros.

Dentre os queijos estudados, o gouda parece ser o que requer maiores cuidados com relação à monitorização da presença de amins biogênicas, sendo a tiramina a amina que apresentou os maiores teores neste tipo de queijo. Além disso, este estudo demonstrou que a tiramina também apresentou elevadas concentrações quando comparadas as outras amins biogênicas nos outros queijos analisados.

A identificação e quantificação de amins biogênicas em queijos são de fundamental importância, para se evitar possíveis casos de intoxicação de indivíduos que venham a consumir estes produtos. Aliado a isso, é necessário a divulgação das consequências da ingestão de queijos contendo amins biogênicas para prevenir doenças crônicas como o câncer ou, agudas como crises enxaquecóides, principalmente em indivíduos mais sensíveis, alérgicos ou, que estejam fazendo uso de medicamentos inibidores da MAO.

REFERÊNCIAS

1. Pintado AIE, Pinho O, Ferreira IMPLVO, Pintado MME, Gomes AMP, Malcata FX. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *Int Dairy J.* 2008;18:631-40.
2. Silla-Santos M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol.* 1996;29:213-31.
3. Mariné-Font, A. Les amines biògenes en els aliments: història i recerca en el marc de les ciències de l'alimentació. Barcelona: Institut d'estudis Catalans; 2005.
4. Carmo FBT, Mársico ET, São Clemente SC, Carmo RP, Freitas MQ. Histamina em conservas de sardinha. *Ci Anim Bras.* 2010;11(1):174-80.

5. Russel FE, Maretic Z. Scombroid Poisoning: mini review case histories. *Toxicon*. 1986. 24(10): 967-73.
6. Komprda T, Smělá D, Pechová P, Kalhotka L, Štencel J, Klejdus B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci*. 2004; 67(4): 607-16.
7. Chiacchierini ED, Restuccia D. and Vinci G. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*. 2005; 69(3): 548-55.
8. Onal A, A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem*. 2007; 103: 1475–86.
9. Santos VAQ, Hoffmann FL. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos minas frescal e ricota. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010; 69(1):38-46.
10. Dias SS, Lobato V, Verruma-Bernardi MR. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(3):327-33.
11. Joosten HMLG, Olieman C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection. *J Chromatogr*. 1986; 356, 311-19.

12. Halász A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol.*1994; 5,(2):42-9.
13. El-Sayed MM. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *Int Dairy J.* 1996; 6, (11-12); 1079-86.
14. Fernandez-Garcia EJT, Nunez M. Formation of biogenic amines in raw milk hispanico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J Food Prot.* 2000;63: 1551-55.
15. Roig-Sagues AX, Molina AP and Hernandez-Herrero MM. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur Food Res Technol.* 2002; 215: 96–100.
16. Mah JH, Han HK, Oh YJ, Kim MG, Hwang HJSD. Biogenic amines in jetkoals korean salted and fermented fish products. *Food Chem.* 2002;79: 239-43.
17. Innocente N, D'Agostin P. Formation of biogenic amines in typical semi hard Italian cheese. *J Food Prot.* 2002; 65:1498-01.
18. Shalaby AR. Multidetecction semi quantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem.*1995;52:367-72.
19. Perez-Martin RI, Franco J M, Molist P, Gallardo J M. Gas chromatographic method for the determination of volatile amines in sea foods. *Int J Food Sci Tech.* 1987; 5: 509-14.

20. Standara S, Vesela ME, Drdak M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*. 2000;44:28-31.
21. Moret SE, Conte L. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatogr.* 1996;729:363-69.
22. Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 03, 2010, 20 p.
23. Custódio FB. Eficiência e seletividade de diferentes métodos de extração, purificação e detecção de histamina e tiramina em queijo ralado [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
24. Ibrahim EMA and Amer AM-A. Comparison of biogenic amines levels in different processed cheese varieties with regulatory specifications. *WJ Dairy Food Sci.* 2010; 5(2):127-33.
25. Heck JML, Schennink A, Van Valenberg HJF, Bovenhuis H, Visker MHPW, van Arendonk, JAM. and van Hooijdonk ACM. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J Dairy Sci.* 2009;92:1192-02.
26. Golinelli LP, Conte-Junior CA, Paschoalin VMF and Silva JT. Proteomic analysis of whey from bovine colostrum and mature milk. *Braz Arch Biol Technol.* 2011;54(4):761-68.

27. Chang SF, Ayres, JW and Sandine WE. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophan. *J Dairy Sci.* 1985;68:2840- 6.
28. Dadáková E, Krízek M, Pelikánová T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem.* 2009; 116: 365-70.
29. Brink B, Ten D, Joosten HMLJ and Huis IV. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbial.* 1990;11:73-84.
30. Stratton JE, Hutkins RW and Taylor SL. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A review. *J Food Prot.* 1991; 54:460-70.
31. Taylor SL. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit Rev Toxicol.*1986;17:91-128.
32. Clifford MN, Walker R, Wright J, Hardy R. and Murray CK. Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis. *J Sci Food Agric.* 1989; 47:365-75.
33. Perry KSP. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos *Quim. Nova.* 2004; 27(2): 293-300.
34. Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 364, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). 1997.

35. Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Prato. 1997.
36. Joosten HMLG. The biogenic amine contents of dutch cheese and their toxicological significance. *Neth Milk Dairy J.* 1988;42(1) 25-42.
37. Til HP, Falke HE, Prinsen MK e Willems M.I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem Toxicol.* 1997;35:337-48.
38. Hernandez-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogues MT, Marine-Font AE, Vidal-Carou MC. Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products. *J Agric Food Chem.* 1997;45: 2098-102.
39. Bardócz S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci Technol.* 1995; 6(10):341-6.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Aminas biogênicas apresentou potencial de ser utilizada como parâmetro de qualidade dos queijos e dos filés de tilápia
- A técnica utilizada mostrou-se eficaz para aplicação no estudo de aminas nas matrizes avaliadas
-

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENEVIDES, CLICIA M. J; LOVATTI, REGINA CELE COTTA. Segurança alimentar em estabelecimentos processadores de alimentos *Rev.Hig. aliment*;18(125):24-27, out. 2004.

POLONIO, Maria Lúcia Teixeira; PERES, Frederico. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 8, Aug. 2009.

SILVA, L.P.; LOPES, M.M.; MANO, S.B.; MÁRSICO, E.T.; CONTE-JUNIOR, C.A.;TEODORO, A.J.; GUEDES, W.S. Influência da adição de polifosfato em linguiça de frango. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*,v.15,p.50-55.2008.

FAO

Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, 2010. 101p.

Santos VAQ, Hoffmann FL. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos minas frescal e ricota. *Rev Inst Adolfo Lutz.*, 69(1):38-46. 2010.

DIAS S.S, LOBATO V., VERRUMA-BERNARDI MR. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev Inst Adolfo Lutz* ; 68(3):327-33. 2009.

MÁRSICO, E.T. et al. Avaliação da qualidade de sushis e sashimis comercializados em shopping centers. *Higiene Alimentar*, v.20, p.63-65, 2006.

MINOZZO, M. G.; MALUF, M. L. F. Indicadores de qualidade higiênico-sanitárias no processamento da tilápia. Cap. XIII. In: BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Industrialização de tilápias,173p. 2007.

RODRIGUES, BRUNA LEAL ; SANTOS, LUCAS RABAÇA ; MÁRSICO, E. T.; CAMARINHA, C.C. ; MANO, S.B. ; CONTE JUNIOR, CARLOS ADAM . Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. *Semina. Ciências Agrárias* (Impresso), v. 33, p. 1849-1856, 2012.

Halász A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol.*; 5,(2):42-9. 1994.

El-Sayed MM. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *Int Dairy J.*; 6, (11-12); 1079-86. 1996.

PINTADO AIE, PINHO O, FERREIRA IMPLVO, PINTADO MME, GOMES AMP, MALCATA FX. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *Int Dairy J.*;18:631-40. 2008.

SILLA-SANTOS M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol.*:29;213-31. 1996.

LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMAN, C. Comparison of a capillary eletrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography*, v. 779, p. 229-239, 2002.

SMITH, T.A. Amines in food. *Food Chemistry*, v. 6, p. 169-200, 1980-81.

NAILA, 2010

Joosten HMLG, Olieman C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection. *J Chromatogr.* 1986; 356, 311-19.

7 APÊNDICES

