

Congresso de Saúde de Bragança

Na rota da **promoção da saúde**

29-30 Abril 2005

Livro de Actas



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA

ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE



ESCOLA
SUPERIOR
DE TECNOLOGIA
DA SAÚDE
DE LISBOA

11º POSTER:

SEGURANÇA ALIMENTAR EM VINHOS: DETECÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS

Daniela M. Correia⁽¹⁾; Lillian Barros⁽¹⁾; João Verdial⁽¹⁾; António M. Peres^(1,2); Luís Dias⁽¹⁾

Resumo

As aminas biogénicas (AB) são bases orgânicas de baixo peso molecular, possuidoras de actividade biológica (Rivas et al., 2005). Estas, podem ser encontradas numa grande variedade de produtos alimentares de origem animal ou vegetal (Cinquina et al., 2004), especialmente em alimentos ricos em proteínas (peixe e carne), alimentos fermentados (queijo, salame) e bebidas alcoólicas (vinho, cerveja) (Kovacs et al., 1999).

As AB são compostos produzidos em alimentos através da descarboxilação de aminoácidos livres por acção bacteriana, sendo estas indesejáveis, porque a ingestão de alimentos com grande quantidade de algumas aminas (p.e. histamina, tiramina) podem levar a efeitos toxicológicos, como dores de cabeça, náuseas, insuficiência respiratória, palpitações, hiper ou hipotensão e síndrome de choque anafilático (Rodriguez et al., 2002; Csomós et al., 2003; Gardini et al., 2005). Alimentos com pequenas quantidades de AB são considerados seguros para consumo (Rodriguez et al., 2002).

No vinho as AB são um dos factores que contribui para a sua qualidade (Csomós et al., 2003). Estas podem estar presentes na uva e no mosto, devido à degradação enzimática ou a processos de fermentação, podendo ainda estar relacionadas com as más condições sanitárias na produção do vinho (Ngim et al., 2000; Héberger et al., 2003). Já se identificaram mais de 30 AB nos vinhos sendo as mais comuns: cadaverina, histamina, putrescina, tiramina, espermidina, espermina e agmatina (Busto et al., 1995; Ngim et al., 2000; Csomós et al., 2002). A sua concentração total pode variar de 1 a 50 mg/L (Busto et al., 1995; Ngim et al., 2000).

Apesar das implicações toxicológicas, não existe limite legal definido para AB em vinhos. Alguns países estabeleceram no entanto níveis máximos recomendados para a histamina, variando entre 2 mg/L na Alemanha e os 10 mg/L na Suíça. Para as restantes aminas presentes no vinho não existem recomendações quanto ao seu limite (Vidal-Carou et al., 2003).

No estudo preliminar efectuado pretendeu-se detectar e quantificar pelo método de TLC (cromatografia de camada fina) cinco AB (histamina, cadaverina, espermina, tiramina e 1,4-diaminobutanol) em 7 vinhos, divididos em três grupos: vinho branco, vinho tinto e vinho do Porto. Na preparação das

amostras seguiu-se o método de Romero *et al.* (2002), com algumas modificações.

Com a metodologia adoptada conseguiu-se detectar a presença das seguintes aminas nos diferentes vinhos analisados: 1,4-diaminobutanol, tiramina, espermina; sendo as amostras de vinho tinto as que apresentam menor concentração total de AB.

(1) CIMO, Escola Superior Agrária, 5301-855 Bragança, Portugal, email: ldias@ipb.pt,

(2) LSRE, Escola Superior Agrária, 5301-855 Bragança, Portugal, email: peres@ipb.pt.

Segurança alimentar em vinhos: detecção de Aminas Biogénicas

Daniela M. Correia¹; Lillian Barros¹; João Mendes¹; António M. Peres^{1,2}; Luis Dias¹

¹ CIMO, Escola Superior Agrária, 5301-854 Vila Real, Vila Real, Portugal, email: lldias@ipb.pt,

² LSRE, Escola Superior Agrária, 5301-854 Vila Real, Vila Real, Portugal, email: peres@ipb.pt,



Introdução

As aminas biogénicas (AB) são bases orgânicas de baixo peso molecular, possuidoras de actividade biológica [1]. Estas, podem ser encontradas numa grande variedade de produtos alimentares de origem animal ou vegetal [2], especialmente em alimentos ricos em proteínas (peixe e carne), alimentos fermentados (queijo, salame) e bebidas alcoólicas (vinho, cerveja) [3].

As AB são compostos produzidos em alimentos através da descarboxilação de aminoácidos livres por acção bacteriana, sendo estas indesejáveis porque a ingestão de alimentos com grande quantidade de algumas aminas (p.e. histamina, tiramina) podem levar a efeitos toxicológicos, como dores de cabeça, náuseas, insuficiência respiratória, palpitações, hiper ou hipotensão e síndrome de choque anafilático [4,5,6]. Alimentos com pequenas quantidades de AB são considerados seguros para consumo [4].

No vinho a composição em AB é um dos factores que contribui para a sua qualidade [5]. Estas podem estar presentes na uva e no mosto, devido à degradação enzimática ou a processos de fermentação, podendo ainda estar relacionadas com as más condições sanitárias na produção do vinho [7,8]. Já se identificaram mais de 30 AB nos vinhos sendo as mais comuns: cadaverina, histamina, putrescina, tiramina, espermidina, espermina e agmatina (Figura 1) [5, 7, 9]. A sua concentração total pode variar de 1 a 50 mg/L [7,9].

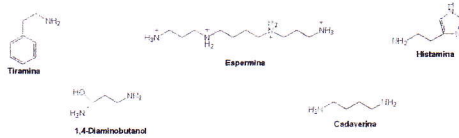


Figura 1 – Estrutura química das AB.

Apesar das implicações toxicológicas, não existe limite legal definido para AB em vinhos. Alguns países estabeleceram, no entanto, níveis máximos recomendados só para a histamina, variando entre 2 mg/L na Alemanha e os 10 mg/L na Suíça [10]. A detecção destes compostos em alimentos é dificultada pela complexidade da matriz e pela falta de um método rápido e simples para a sua detecção [11, 12]. Vários métodos têm sido utilizados para a sua detecção e quantificação como técnicas fluorimétricas, enzimáticas e cromatográficas [11]. Das técnicas cromatográficas, o HPLC (Cromatografia Líquida de alta resolução) e o TLC (Cromatografia de camada fina) são as mais utilizadas. O TLC tem várias vantagens que incluem a sua fácil utilização, detecção, quantificação e o baixo custo, visto que se conseguem analisar várias amostras numa só placa [13].

Palavras – chave: Vinho, Aminas biogénicas, TLC.

Objectivos

Pretendeu-se otimizar a detecção e quantificação, pelo método de TLC, de cinco AB (histamina - HIS, cadaverina - CAD, espermina - ESP, tiramina - TIR e 1,4-diaminobutanol - DIA) em 7 vinhos divididos em três grupos: vinho branco, vinho tinto e vinho do Porto.

Metodologia

Preparação das amostras: Seguiu-se o método de Romero *et al.* (2002), com algumas modificações. As amostras foram filtradas e o pH ajustado a 8,2 com Na₂CO₃. Ajustou-se com água desionizada, agitou-se em vórtex e efectuou-se derivatização.

Derivatização:

Adicionou-se 1 mL de cloreto de dansyl
↓
Agitou-se em vórtex
↓
Incubou-se a 70°C, 20'
↓
Centrifugou-se a 3400 rpm, 10'
↓
Filtrou-se através de membrana 0,20µm

Preparação das aminas padrão:

Pesaram-se as aminas (DIA, CAD, HIS, ESP e TIR), dissolveram-se em acetonitrilo e misturaram-se de forma a obter uma concentração final ~2 mg/µL. A derivatização da mistura de padrões foi semelhante à derivatização das amostras.

Preparação do TLC: Utilizaram-se placas TLC ALUGRAM SIL G/UV 254, 0,20 mm. Na placa de TLC foram colocados 20µL de cada amostra. Para se efectuar a recta de calibração aplicaram-se volumes num intervalo de 1 a 20 µL de mistura de padrões. A placa foi colocada numa câmara cromatográfica. O eluente utilizado foi: clorofórmio: tolueno: trietilamina (63:1:36v/v/v).

Bibliografia:

[1] Rivas *et al.*, (2005) *FEMS Microbiology Letters* 244, 367-372. [2] Cinquina *et al.*, (2004) *Journal of Chromatography A*, 1032, 73-77. [3] Kovacs *et al.*, (1998) *Journal of Chromatography A*, 836, 305-313. [4] Rodriguez *et al.*, (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50, 7288-7292. [5] Cosmo *et al.*, (2002) *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* 46, No. 1-2, 73-81. [6] Gardini *et al.*, (2005) *Food Control* 16, 609-616. [7] Ngim *et al.*, (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48, 3311-3316. [8] Heiberger *et al.*, (2003) *J. Agric. Food Chem.* 48, 3311-3316. [9] Busto *et al.*, (1995) *Journal of Chromatography A* 718, 309-317. [10] Vidal-Carou *et al.*, (2003) *Journal of Chromatography A* 998, 235-241. [11] Shalaby *et al.*, (2001) *Food Chemistry* 75, 255-259. [12] Shalaby, (1995) *Journal of Chromatography A* 998, 235-241. [13] Lapa-Guimarães e Pickova (2004) *Journal of Chromatography A* 1045 223-232. [14] Romero *et al.* (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50, 4713-4717.

Quantificação das aminas: As placas de TLC foram visualizadas a um comprimento de onda de 365 nm e foram fotografadas com máquina fotográfica Acuity CM4001 acoplada a um computador com o programa Mac Rail - Image Analyst (Figura 2). O tratamento de imagem foi efectuado com o programa Image J (Figura 3). Cada amina foi quantificada através de uma curva de calibração (Figura 4).

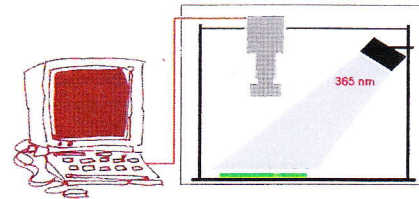


Figura 2 – Sistema utilizado para visualizar e fotografar as placas de TLC

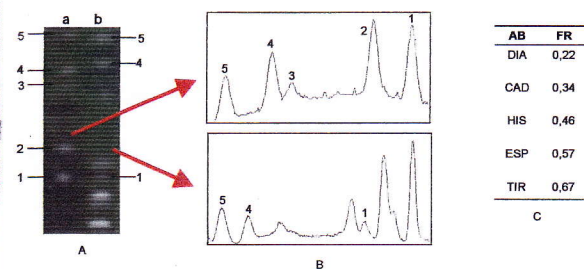


Figura 3 – Exemplo do tratamento de imagem no programa Image J. A - fotografia da separação das AB (a - Mistura de padrões; b - Amostra de vinho); B - cromatogramas da amostra e dos padrões; 1 - DIA, 2 - CAD, 3 - HIS, 4 - ESP e 5 - TIR; C - factores de retenção (FR) para as AB analisadas.

Resultados

As curvas de calibração foram ajustadas a uma função polinomial de 2º grau (Figura 4).

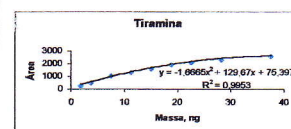


Figura 4 – Exemplo de curva de calibração.

Tabela 1 – Quantificação das AB para cada amostra analisada e entre parêntesis o desvio médio percentual.

Amostras de vinho	Aminas biogénicas (mg/L)		
	DIA	ESP	TIR
Branco 1	0,24 (2,1%)	< 0,13	0,67 (1,7%)
Branco 2	0,72 (0,8%)	< 0,13	0,77 (0,2%)
Tinto 1	0,24 (0,2%)	0,31 (3,8%)	0,67 (2,3%)
Tinto 2	0,20 (2,5%)	0,25 (0,8%)	0,55 (4,2%)
Tinto 3	0,65 (0,2%)	< 0,13	0,45 (12%)
Porto 1	0,47 (6,2%)	0,3 (8,8%)	0,36 (1,5%)
Porto 2	0,31 (6,8%)	0,81 (13%)	1,89 (0,4%)

Não foram detectados níveis de histamina (inferior ao limite de detecção, 0,05 mg/L) e de cadaverina (inferior ao limite de detecção, 0,04 mg/L), nos vinhos analisados.

A presença de espermina em vinhos brancos foi detectada mas não quantificada, em vinhos tintos apresenta valores inferiores a 0,3 mg/L e nos vinhos do Porto valores inferiores a 0,8 mg/L.

A amina biogénica DIA aparece em todos os vinhos analisados com valores inferiores ou iguais a 0,7 mg/L.

A tiramina foi quantificada em todos os vinhos estudados, apresentando valores inferiores a 1,9 mg/L. Em geral, é esta amina biogénica que apresenta valores superiores.

Como se pode inferir da figura 3, foi detectada por TLC a presença de outras aminas, as quais não foram identificadas.

Conclusões

O método adoptado neste trabalho (TLC) permitiu detectar e quantificar a presença de aminas biogénicas em dois vinhos brancos, três vinhos tintos e dois vinhos do Porto. Contudo, convém referir que, nesta fase do estudo, os resultados são semi-quantitativos, embora estejam a ser desenvolvidos esforços com o intuito de melhorar a precisão e exactidão do método.

Estes resultados preliminares mostram que os níveis de aminas biogénicas obtidos são da mesma ordem de grandeza dos esperados naturalmente.

D. M. C. agradece o apoio financeiro do Projecto AGRO 227