

CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN QUESOS ARGENTINOS

Giménez, Paula

Instituto de Lactología Industrial, UNL/CONICET. Santiago del Estero 2829. 3000 Santa Fe, Argentina.

Área: Ingeniería

Sub-área: Alimentos

Grupo: Y

Palabras clave: aminas biógenas, quesos argentinos, inocuidad, HPLC.

INTRODUCCIÓN

Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos nitrogenados que se producen por la descarboxilación de aminoácidos (AA), en una reacción catalizada por enzimas descarboxilasas. Si bien algunas AB son producidas fisiológicamente en el organismo humano cumpliendo funciones importantes, el consumo de alimentos que contengan estos compuestos puede causar efectos tóxicos en los consumidores. Este efecto depende del nivel y toxicidad de cada AB, la sensibilidad de cada individuo y la coexistencia de factores potenciadores de los efectos (EFSA, 2011).

Las AB pueden formarse en un alimento si coexisten tres factores: presencia de AA precursores y microorganismos con actividad descarboxilasa, y condiciones ambientales adecuadas para la viabilidad microbiana y la actividad de las descarboxilasas. De esta manera, los productos fermentados y/o susceptibles de sufrir contaminación microbiana y que tienen condiciones para el desarrollo de microorganismos son los más susceptibles a la formación *in situ* de AB; entre ellos se encuentran los quesos madurados. Los niveles de AB encontrados en quesos difiere ampliamente y depende de varios factores: variedad de queso, tiempo y temperatura de maduración, nivel de proteólisis, niveles de microorganismos y efecto sinérgico entre ellos, entre otros. En este sentido, los quesos elaborados a partir de leche cruda tienen una mayor probabilidad de contener AB, debido a la mayor carga microbiana que tienen en relación a aquellos elaborados con leche pasteurizada (Linares y col., 2012; Gardini y col., 2016).

Si bien existen trabajos de investigación que describen la presencia de AB en diversas variedades de queso, en nuestro país no se cuenta con información al respecto. Es importante tener en cuenta que en Argentina muchos tamberos elaboran y comercializan quesos artesanales de leche cruda, que se encuentran habitualmente en el mercado. Los objetivos del presente trabajo fueron optimizar e implementar una metodología para la cuantificación de AB en quesos y realizar un monitoreo del contenido de ocho AB en quesos argentinos de origen artesanal e industrial.

METODOLOGIA

Proyecto CAI+D 2016 Tipo III: Tecnologías de membrana y fermentos adjuntos para mejorar la calidad de quesos argentinos

Director del proyecto: Erica Hynes/Carina Bergamini

Director del becario/tesista: Erica Hynes/Carina Bergamini

Reactivos

Se prepararon soluciones stock (1mg/mL) de cada estándar de AB: tiramina (Tir), histamina (His), putrescina (Put), cadaverina (Cad), triptamina (Trip), 2-feniletilamina (2-fen), espermina (Esp) y espermidina (Espd) utilizando las sales hidrocioradas de las mismas. Para las curvas de calibrado, se prepararon diluciones con HCl 0,1M en un rango de concentración de 0,5 a 10 µg/mL. Como estándar interno se utilizó 1,7 diaminoheptano (1mg/mL). El reactivo de derivatización fue cloruro de dansilo, que fue preparado inmediatamente antes de su uso en una concentración de 5 y 10 mg/mL en acetona.

Quesos y preparación de muestras

Se analizaron 15 quesos artesanales provenientes de pequeños establecimientos queseros de Entre Ríos, Córdoba y Santa Fe, elaborados en su mayoría con leche cruda, y 35 quesos comerciales, adquiridos en comercios de Santa Fe. La mayoría de los quesos fueron de pasta semidura y dura de mediana y larga maduración, y elaborados con leche de vaca, aunque también se analizaron quesos blandos y de leche de cabra. Para la extracción de las AB, se preparó un extracto ácido de queso (EQ). Para ello, una muestra de 5g fue homogeneizada en un homogeneizador Ultra-turrax T25 (IKA®, Estados Unidos), utilizando HCl 0,1 M como solvente de extracción, y centrifugada (10000g/20 min/4°C). La fase acuosa soluble se llevó a un volumen final de 50 mL con HCl 0,1M. Luego se filtró con papel Whatman N° 42 y se almacenó a -20°C hasta su análisis. Durante la extracción, cada muestra fue adicionada de 500 µL de la solución del estándar interno. El análisis de las AB en las muestras de quesos se realizó por duplicado.

Reacción de derivatización

La reacción de derivatización se realizó de acuerdo a Martuscelli y col. (2005), con algunas modificaciones. Un volumen de 500 µL de solución estándar de AB diluida ó 500 µL del EQ se mezcló con 150 µL NaHCO₃ 1M y 50 µL NaOH 2M. Se agregó 500 µL de solución de cloruro de dansilo (5 ó 10 mg/mL) y se incubó en un baño termostatzado a 40°C por 1 hora. El cloruro de dansilo residual fue eliminado por la adición de 50 µL de solución de NH₄OH. Se dejó reposar por 30 min, y finalmente se añadió 750 µL de acetonitrilo, se centrifugó (2500 rpm/5min/10°C) y filtró con filtros de 0,45 µm (Millipore, San Pablo, Brasil), e inmediatamente se analizó por HPLC.

Condiciones cromatográficas

La separación cromatográfica se realizó en un HPLC (Perkin Elmer Series 200, Norwalk, Estados Unidos) utilizando una columna Luna C18 RF 5µm, 100 Å, 250x4,6 mm con un guardacolumna C18 4x3 mm (Phenomenex, Estados Unidos). Como solventes se utilizó: A: agua y B: acetonitrilo, en un gradiente de elución según Moret y col. (2005) con algunas modificaciones. Las corridas se realizaron a un flujo de 0,8 mL/min y una temperatura de 40°C. La longitud de onda del detector fue 254 nm. Los datos fueron procesados con el software Chromera®.

Verificación del método

Se estudió la linealidad de la metodología analítica en un rango de concentraciones entre 0,5 y 10 µg/mL, y se determinaron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ). Hay que tener en cuenta que los AA, que están presentes en los EQ en niveles apreciables dependiendo del tipo de queso, son también derivatizados por el reactivo utilizado, lo que puede interferir en la reacción. Por ello, se realizó un estudio de recuperación de las ocho AB adicionadas a una muestra de queso; se evaluó el uso de 5 y 10 g para la preparación del EQ y dos concentraciones del reactivo de derivatización (5 y 10 mg/mL).

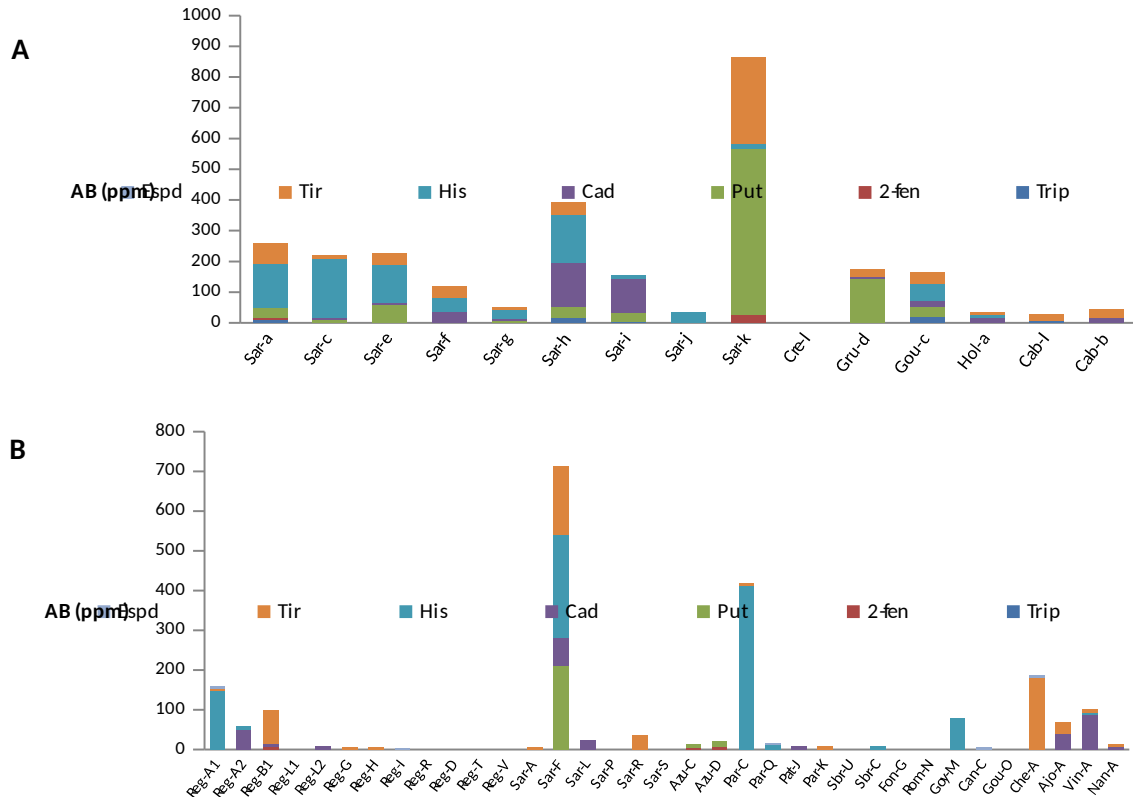
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Verificación de la metodología analítica de aminas biógenas

Las condiciones ensayadas en la separación cromatográfica en cuanto a solventes, gradiente y temperatura, permitieron la resolución de las ocho AB ensayadas, en 29 min. El coeficiente de determinación (R^2) del análisis de regresión lineal para todas las AB fue mayor a 0,99. Los valores de LD y LQ para todas las AB estuvieron entre 0,07 y 0,21 $\mu\text{g/mL}$ y 0,23 y 0,69 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los mejores valores de recuperación, entre 96,3 a 119,8%, fueron obtenidos al utilizar 10 mg/mL del reactivo derivatizante, con resultados similares para los dos niveles de muestra utilizados (5 y 10 g). El uso de 5 mg/mL del reactivo condujo a bajos y variables valores de recuperación, desde 20,3 a 121,5%, sugiriendo que dicha cantidad no fue suficiente para la derivatización cuantitativa y reproducible de las AB presentes, probablemente debido a la presencia de AA. De esta manera, se eligió trabajar con una muestra preparada con la menor cantidad de muestra (5g) y usar la mayor concentración del reactivo derivatizante (10 mg/mL).

Análisis de AB en quesos

En la Figura 1A y 1B se muestran los resultados de AB en quesos artesanales y comerciales, respectivamente. Las muestras se rotularon con tres letras que indican el tipo de queso, y una cuarta letra que indica productor/industria.



Fi

Figura 1. Contenido de AB en quesos de origen artesanal (**A**): Sar:Sardo, Gru:Gruyere, Gou:Gouda, Hol:Holanda, Cab:Cabra, y comercial (**B**): Reg:Reggianito, Sar:Sardo, Azu:Azul, Par:Parmesano, Pat:Pategras, Sbr:Sbrinz, Goy:Goya, Can:Canestratto, Che:Cheddar, Ajo:Con ajo y pimienta, Vin:Vino y cenizas, Nan:con naranja.

De los 15 quesos artesanales analizados, 14 contenían niveles variables de AB, entre 28,3 y 864,6 ppm, y solamente en un queso (Cremoso) no se detectaron. En el 68% de los quesos comerciales analizados se encontraron AB, aunque solamente en el 37% de los mismos el nivel fue mayor a 15 ppm. Las cuatro AB que se detectaron con mayor frecuencia fueron: tiramina en el 50% del total de los quesos, histamina y cadaverina en el 38 %, y putrescina, en el 24%, siendo a su vez las que, en general, se encontraron en mayor concentración. La triptamina, 2-feniletilamina y espermidina se detectaron solamente en el 10% de los quesos analizados, siendo los valores menores a 27 ppm, mientras que la espermina no se detectó en ninguna de las muestras. La tendencia observada en cuanto a la predominancia de las distintas AB es similar a la informada previamente para otros quesos (Benkerroum, 2016).

Los resultados obtenidos en los quesos comerciales los podemos relacionar con una buena calidad microbiológica de la materia prima, la higiene en el proceso de producción y el uso de fermentos lácticos bien caracterizados. En el caso de los quesos artesanales, la mayor ocurrencia de AB puede explicarse por el mayor nivel y diversidad de microorganismos presentes debido al uso de leche cruda, posibles contaminaciones en el proceso por problemas de higiene, y uso de fermentos “naturales” o ningún fermento.

No hay normas que regulen el contenido de AB en alimentos, con excepción de la histamina en productos pesqueros. Como un avance a este tema, en 2011, investigadores de la EFSA (European Food Safety Authority), indicaron los niveles de ingesta de histamina y tiramina para los cuales no se detectaron efectos tóxicos tanto en personas sanas: 50 y 600 mg/día, respectivamente, como en individuos con problemas en los sistemas de detoxificación: límite menor al detectable para la histamina y 6-50 mg/día para tiramina (EFSA, 2011). En base a ello, y considerando un consumo de 50 g queso/día, 25 muestras presentaron niveles de histamina que pueden resultar tóxicos para personas con alguna alteración en los sistemas de detoxificación, mientras que sólo 3 muestras tuvieron niveles tóxicos de tiramina para dicha población sensible. Ninguna de las muestras tuvo niveles tóxicos de AB para personas sanas.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo brindan un primer panorama del contenido de AB en quesos comerciales y artesanales de la región, siendo la tiramina, histamina, putrescina y cadaverina las detectadas en mayor nivel y predominancia. Los resultados obtenidos aportan evidencia sobre la inocuidad de la mayoría de los quesos comerciales en relación a su bajo o indetectable contenido de AB, lo que se puede correlacionar con procesos de producción higiénicos y estandarizados. Por el contrario, el hallazgo de mayores valores en quesos artesanales elaborados con leche cruda, remarcan la necesidad de un mayor control de la calidad de la materia prima y del proceso de fermentación y maduración de estos productos para evitar la acumulación de AB tóxicas.

BIBLIOGRAFÍA BASICA

- Benkerroum N.**, 2016. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 801-826.
- EFSA**, 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J* 9/2393:1–93. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/2393>.
- Gardini F., Özogul Y., Suzzi G., Tabanelli G., Özogul F.**, 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1218.

- Linares D., del Río B., Ladero V., Martínez N., Fernandez M., Alvarez M.,** 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180.
- Martuscelli M., Gardini F., Torriani S., Mastrocola D., Serio A., Chaves-López C., Schirone M., Suzzi G.,** 2005. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 15, 571-578.
- Moret S., Smela D., Populin T., Conte LS.,** 2005. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, 89, 355-361.