



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO



***DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM QUEIJO DE
COALHO PRODUZIDO NO ESTADO DE ALAGOAS***

VICTOR VASCONCELOS CARNAÚBA LIMA

MACEIÓ-2015

VICTOR VASCONCELOS CARNAÚBA LIMA

***DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM QUEIJO DE
COALHO PRODUZIDO NO ESTADO DE ALAGOAS***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Nutrição.

Orientador: **Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento**
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

Coorientadora: **Profa. Dra. Maria Cristina Delgado da Silva**
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

MACEIÓ-2015



**MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**



Câmpus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO**

**“DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM QUEIJO
DE COALHO PRODUZIDO NO ESTADO DE ALAGOAS”**

Por

Victor Vasconcelos Carnaúba Lima

A Banca Examinadora, reunida aos 15 dias do mês de junho do ano de 2015, considera o candidato:_____.

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
(Examinador)

Profa. Dra. Ana Flávia Oliveira Santos
Centro Universitário CESMAC/Maceió / Faculdade Maurício de Nassau
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela realização de mais um sonho e por guiar todos os meus passos. Aos meus pais Rosário e Marcos, pelo incentivo e apoio para o aprimoramento da minha educação e formação pessoal e profissional. Aos meus irmãos Marcos e Camila por todo apoio.

Agradeço especialmente ao meu orientador Ticiano Gomes do Nascimento, pelo exemplo de pesquisador, professor e por ter me acolhido e me motivado sempre. Sem ele eu não conseguiria realizar este projeto de vida. Agradeço pela paciência, compreensão e dedicação em todos os momentos da pesquisa.

A minha coorientadora e querida professora Cristina Delgado, pela colaboração fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos parceiros e colegas de laboratório Cantídio, Malu e Genildo pelo apoio e ensinamentos durante as diferentes fases do projeto.

Aos meus amigos queridos que sempre me incentivam a seguir em frente.

Agradeço também aos meus alunos, colegas e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização de mais essa etapa da minha vida.

RESUMO GERAL

Aminas biogênicas são bases orgânicas tóxicas de baixo peso molecular com estruturas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas, que podem ser encontradas em vários alimentos. Elas são, normalmente, produzidas através da descarboxilação de aminoácidos promovida por micro-organismos. O consumo de alimentos como queijos processados contendo grandes quantidades de aminas biogênicas podem resultar em reações alérgicas caracterizadas por dificuldade de respirar, urticária, vômito e hipertensão. Elas são também conhecidas como possíveis precursores de carcinógenos tais como as *N*-nitrosaminas. As aminas biogênicas são frequentemente encontradas em altas concentrações nos alimentos e o seu conteúdo não pode ser reduzido por tratamentos térmicos, fato que dificulta a sua redução através dos métodos convencionais de preservação. Uma alternativa para a redução do teor destas substâncias é a determinação de métodos eficientes de detecção de aminas biogênicas em queijos e a implantação de boas práticas de fabricação e um bom controle de qualidade dos alimentos produzidos para reduzir significativamente a proliferação de microorganismos responsáveis pela produção das aminas biogênicas tornando os subprodutos mais seguros.

PALAVRAS-CHAVE

Aminas Biogênicas. Queijos de Coalho. Controle de Qualidade Microbiológico. CLAE-UV-FLUOR. Boas Práticas de Fabricação dos Alimentos. Segurança Alimentar.

ABSTRACT

Biogenic amines are toxic organic bases of low molecular weight aliphatic, aromatic or heterocyclic structures, which can be found in various foods. They are usually produced through decarboxylation of amino acids promoted by micro-organisms. The consumption of foods like processed cheese containing large amounts of biogenic amines can result in allergic reactions characterized by difficulty breathing, hives, vomiting and hypertension. They are also known to be potential carcinogens precursors such as N-nitrosamines. Biogenic amines are often found in high concentrations in foods and its contents can not be reduced by heat treatment, a fact that complicates their reduction through conventional conservation methods. An alternative to reducing the content of these substances is the determination of efficient methods of detection of biogenic amines in cheese and the implementation of good manufacturing practices and good control of quality of food produced to significantly reduce the proliferation of microorganisms responsible for producing biogenic amines making safer products.

KEYWORDS

Biogenic amines. Coalho Cheese. Microbiology Quality Control of Foods. HPLC-DAD-FLUOR. Good Manufacturing Practice of Foods. Food Safety.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB	Aminas Biogênicas
ACP	Análise do Componente Principal
AHC	Análise Hierárquica de Clusters
α -La	α -Lactoalbumina
β -Lb	β -Lactoglobulina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Ágar Batata Dextrose
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CPS	Concentrado Proteico do Soro
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
EC	<i>Escherichia coli</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Produções Agropecuárias
IFAL	Instituto Federal de Alagoas
IN	Instrução Normativa
LAT	Laticínio
LPD	Leite em pó desnatado
LST	Lauril Sulfato Triptose
μ L	Microlitro
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
NMP	Número Mais Provável
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo I - Revisão de literatura

Figura 1 – Estruturas químicas das aminas biogênicas (tiramina, feniletilamina, putrescina e cadaverina)..... 21

Figura 2 - Etapas do processo de produção de queijo de coalho..... 28

Artigo II - Artigo de Resultados

Figura 1 - Perfil cromatográfico dos padrões analíticos do pool de aminas biogênicas. (1) Tiramina, (2) 2 feniletilenodiamina, (3) putrescina (4) cadaverina na concentração de 2,18µg/mL..... 72

Figura 2 - Perfil cromatográfico dos queijos de coalho produzidos pelas indústrias DuCamp (A), Antunes (B) e Mainha (C). Detecção de traços de aminas biogênicas (1) Tiramina, (2) 2-feniletilamina (3) putrescina e (4) cadaverina..... 74

Figura 3 - Perfil cromatográfico dos queijos de coalho produzidos pelas indústrias Batalha (A), Desconhecido Major Izidoro (B) e Do Maia (C). Detecção de traços de aminas biogênicas (1) Tiramina, (2) 2-feniletilamina (3) putrescina e (4) cadaverina 75

Figura 4 - Análise do Componente Principal (PCA) para queijos coalhos comerciais de Alagoas. Dados de intensidades de respostas (áreas) obtidas por UPLC-Fluorescência em (A) Ex 320-Em450 (t1 x t14), (B) EX 334-Em450 (t1 x t10), (C) EX 334-Em495 (t1 x t12) e 9D) Ex 334-Em520 (t1 x t2) 81

LISTA DE TABELAS

Artigo I - Revisão de literatura

Tabela 1 - Aminas biogênicas, seus aminoácidos precursores e principais efeitos no organismo.....	20
Tabela 2 - Conteúdo de aminas biogênicas em diversos alimentos processados.	24
Tabela 3- Estratégias para a redução de toxinas em alimentos.	34

Artigo II - Artigo de Resultados

Tabela 1 - Avaliação microbiológica de amostras de queijo de coalho produzido em alguns laticínios do estado de Alagoas.	67
Tabela 2 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas em amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 320 nm e emissão 450 nm.	77
Tabela 3 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas nas amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 334 nm e emissão 450 nm.	78
Tabela 4 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas nas amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 334 nm e emissão 495 nm.	79
Tabela 5 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas nas amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 334 nm e emissão 520 nm.	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
	Artigo I: artigo de revisão de literatura	18
	RESUMO	19
	ABSTRACT	20
1	INTRODUÇÃO	21
2	DESENVOLVIMENTO	23
2.1	AMINAS BIOGÊNICAS	23
2.2	ORIGEM E FORMAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS	26
2.2	NOMENCLATURA E ESTRUTURAS QUÍMICAS	27
2.4	MICROORGANISMOS PRODUTORES	28
3	AMINAS EM ALIMENTOS IN NATURA E PROCESSADOS	28
3.1	EFEITOS TÓXICOS	23
4	QUEIJOS	33
4.1	QUEIJO DE COALHO	33
4.1.1	CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO QUEIJO DE COALHO	34
4.1.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO QUEIJO DE COALHO	35
4.1.3	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DO QUEIJO DE COALHO	35
4.2	ETAPAS DA PRODUÇÃO DO QUEIJO DE COALHO	36
4.3	BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO E CONTROLE MICROBIOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO	40
5	DESCONTAMINAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS	41
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43

Artigo II: artigo de resultados	50
RESUMO	51
ABSTRACT	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAIS E MÉTODOS	55
1 MATERIAIS	55
2 MÉTODOS	56
2.1 Análises microbiológicas.....	59
2.1.1 Enumeração de coliformes a 45°C pela técnica NMP	59
2.1.2 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	59
2.1.3 Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i>	60
2.1.4 Pesquisa de <i>Listeria Monocytogenes</i>	60
2.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS (CLAE-UV-FLUOR)	62
2.3 Método de determinação de aminas biogênicas em queijo coalho comercial e fortificados e condições UPLC-DAD-FLUOR.....	63
2.3.1 Coleta de amostras de queijo de coalho comerciais	63
2.3.2 Condições de derivatização.....	64
2.3.3 Reação de derivatização usando cloreto de dansila	64
2.3.4 Condições cromatográficas e de detecção usando detector de fluorescência	64
2.4 Análise estatística.....	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
3.1 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	65
3.1.2 Avaliação microbiológica de queijos de coalho comerciais produzidos em alguns laticínios do estado de Alagoas	68
3.2 CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	68
3.2.2 Perfil cromatográfico de queijo de coalho contaminados com aminas biogênicas	71
3.2.3 Análise do Componente Principal (PCA) de queijos de coalho contaminados com aminas biogênicas	81

4 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES	95
APÊNDICE A	95
APÊNDICE B	98

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 como os laticínios e embutidos cárneos. Estes fatores levaram ao crescimento da atenção para com a segurança dos alimentos (POLONIO e PERES, 2009).

O setor de laticínios tem grande importância socioeconômica, em especial na fabricação de queijos que podem variar de acordo com a região produzida. O queijo coalho é tipicamente nordestino e possui tecnologia relativamente simples e sua fabricação não exige equipamentos sofisticados. A falta de critérios de qualidade para a matéria-prima e para as técnicas de processamento permitem que produtos de baixa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como em relação aos padrões de qualidade específico do produto, aumentem os riscos de proliferação de microorganismos e a produção de seus metabólitos (DIAS, 2009).

Devido o processo de maturação decorrente do processamento tecnológico, os queijos produzem alterações de textura e sabor, associadas principalmente à proteólise da caseína, resultando em um aumento no teor de aminoácidos livres, que por ação de descarboxilases bacterianas produzem aminas biogênicas (SANTOS, 2010).

O queijo de coalho em particular é um produto não maturado de massa crua, semelhante ao queijo minas e obtido pela adição de coalho, fermento e cloreto de cálcio. É um tipo de queijo bastante consumido na região nordeste, e que muitas vezes é produzido e comercializado sem respeitar os padrões higiênico-sanitários, fundamentais para a segurança do produto final (MENDES et. al., 2002).

Tanto no queijo, 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). 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. (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 às exigências do consumidor e da indústria que desejam produtos seguros com maior validade comercial. (PINTADO et al.,2008).

O presente estudo teve como objetivo elaborar uma revisão sobre a inter-relação da contaminação do queijo coalho com as aminas biogênicas e determinar as aminas biogênicas (cadaverina, feniletilamina, putrescina e tiramina) em vinte diferentes tipos de queijos fabricados em Alagoas, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e verificar se o método utilizado é eficaz para a detecção das aminas biogênicas nos queijos analisados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença de aminas biogênicas em queijos de coalho produzidos em laticínios de pequeno e grande porte no estado de Alagoas, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Elaborar uma revisão da literatura sobre a problemática da contaminação de queijos de coalho e sua inter-relação com as aminas biogênicas e a saúde pública.

Determinar as aminas biogênicas (cadaverina, putrescina, feniletilamina, tiramina) presentes nas amostras de queijo de coalho produzidos em diferentes laticínios do Estado de Alagoas.

Avaliar a correlação entre a quantidade de aminas biogênicas presentes em queijo de coalho e quantidade de microrganismos presentes em queijo de coalho.

Realizar quimiométrico com estatística multifatorial para avaliar as amostras de queijo de coalho consideradas outliers (fora da margem de segurança).

Artigo I: artigo de revisão de literatura

LIMA, VVC; NASCIMENTO, TG; DELGADO, MC. Aminas biogênicas em queijos: uma preocupação para a saúde pública

Revista que será submetido: Ciência e Agrotecnologia – B2

RESUMO

Aminas biogênicas são bases orgânicas tóxicas de baixo peso molecular com estruturas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas, que podem ser encontradas em vários alimentos. Elas são, normalmente, produzidas através da descarboxilação de aminoácidos promovida por micro-organismos. O consumo de alimentos processados como os queijos, contendo grandes quantidades de aminas biogênicas, pode resultar em reações alérgicas caracterizadas por dificuldade de respirar, urticária, vômito e hipertensão. Elas são também conhecidas como possíveis precursores de carcinógenos tais como as *N*-nitrosaminas. As aminas biogênicas são frequentemente encontradas em altas concentrações nos alimentos e o seu conteúdo não pode ser reduzido por tratamentos térmicos, fato que dificulta a sua redução através dos métodos convencionais de preservação. Uma alternativa para a redução do teor destas substâncias é a determinação de métodos eficientes de detecção de aminas biogênicas em queijos e a implantação de boas práticas de fabricação e um bom controle de qualidade dos alimentos produzidos para reduzir significativamente a proliferação de microorganismos responsáveis pela produção das aminas biogênicas tornando os subprodutos mais seguros.

PALAVRAS-CHAVE

Aminas Biogênicas. Queijos de Coalho. Controle de Qualidade Microbiológico. CLAE-UV-FLUOR. Boas Práticas de Fabricação dos Alimentos. Segurança Alimentar.

ABSTRACT

Biogenic amines are toxic organic bases of low molecular weight aliphatic, aromatic or heterocyclic structures, which can be found in various foods. They are usually produced through decarboxylation of amino acids promoted by micro-organisms. The consumption of foods like processed cheese containing large amounts of biogenic amines can result in allergic reactions characterized by difficulty breathing, hives, vomiting and hypertension. They are also known to be potential carcinogens precursors such as N-nitrosamines. Biogenic amines are often found in high concentrations in foods and its contents can not be reduced by heat treatment, a fact that complicates their reduction through conventional conservation methods. An alternative to reducing the content of these substances is the determination of efficient methods of detection of biogenic amines in cheese and the implementation of good manufacturing practices and good control of quality of food produced to significantly reduce the proliferation of microorganisms responsible for producing biogenic amines making safer products.

KEYWORDS

Biogenic amines. Rennet cheeses. Microbiological Quality Control. HPLC-UV-FLUOR. Good Food Manufacturing Practices. Food Safety.

1 INTRODUÇÃO

No atual panorama mundial a garantia da segurança alimentar tem sido foco de ações nacionais e internacionais. Tanto os perigos químicos quanto os biológicos são motivos de preocupação. Na fronteira entre esses dois grupos estão as toxinas, que são substâncias químicas oriundas das atividades metabólicas de seres vivos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as toxinas têm se caracterizado como uma das principais causas de doenças de origem alimentar (PINTADO et. al.,2008).

Entre os diversos tipos de toxinas com potenciais riscos à segurança alimentar, se destacam as produzidas por microorganismos (MO) como fungos e bactérias. Os alimentos são frequentemente sujeitos à contaminação por MO e suas toxinas em todas as fases de seu processamento. Mesmo atentando para os conceitos de segurança alimentar, já difundidos atualmente, como o uso de boas práticas de fabricação dos alimentos e a avaliação e controle de riscos, é muito difícil impedir completamente a contaminação. Esse problema compromete o consumo, já que a ingestão de comida imprópria pode causar desde uma simples alergia até a morte do indivíduo (DIAS et. al., 2009).

A intoxicação alimentar é conceituada como a patologia causada pelo consumo de alimentos contaminados por MO ou pelas suas respectivas toxinas e sua forma aguda é uma das causas mais significativas de morbimortalidade em países em desenvolvimento. Estimativas recentes indicam que tal causa seja responsável por 76 milhões de episódios de doenças, 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes por ano nos EUA. No mundo, as mortes podem chegar até 1,8 milhões de casos por ano (POLONIO et. al., 2009).

Devido a essa preocupação constante, alimentos contaminados acima dos níveis aceitáveis para consumo humano e de animais são considerados impróprios e, por isso, descartados, levando a significativas perdas econômicas. Além disso, esse desperdício contribui para o aumento do problema da fome, já que, uma disponibilidade menor faz com que o alimento se torne menos acessível à população em um panorama mundial com crescente desequilíbrio entre a procura e a oferta de alimentos (SANTOS; HOFFMANN, 2010).

Para minimizar as perdas surge a necessidade do uso de métodos de conservação de alimentos. Os métodos convencionais fazem uso do calor, do frio e do controle de umidade, proporcionando uma inativação enzimática e microbiológica e prolongando consideravelmente a vida útil dos produtos. Entretanto, apesar de diminuir ou retardarem a contaminação por MO, esses métodos não são efetivos na diminuição do conteúdo de toxinas presentes nos alimentos (FERNANDEZ; NUNEZ, 2000).

Vários procedimentos de descontaminação desempenham um papel importante na prevenção à exposição às toxinas e seus efeitos. A detoxificação pode ser alcançada pela remoção, eliminação ou inativação das toxinas por métodos físicos, químicos ou biológicos.

Devido o crescimento da produção e do consumo de alimentos lácteos processados, o objetivo dessa revisão de literatura é realizar um levantamento geral sobre as aminas biogênicas presentes em queijos, com destaque para o queijo de coalho, e alertar sobre os riscos para a saúde pública, destacando sua origem e formação, métodos de análises, riscos à saúde e principais sintomas, além das medidas de controle.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 AMINAS BIOGÊNICAS

As aminas são compostos básicos nitrogenados formados normalmente pela substituição de um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia por grupos alquila e/ou arila. As aminas biogênicas (AB) são assim chamadas devido a sua origem biológica já que elas ocorrem naturalmente em MO, plantas e animais, atuando nos seus processos metabólicos com diferentes funções fisiológicas. No geral, elas possuem baixo peso molecular e sua formação é essencialmente resultado da descarboxilação enzimática de aminoácidos livres e da transaminação de aldeídos e cetonas (MARINÉ, 2005).

As AB podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina presentes e da estrutura química. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, elas se classificam em monoaminas (ex: tiramina e feniletilamina), diaminas (ex: histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (ex: espermidina, espermina e agmatina]. Quanto à estrutura química, as AB podem ser classificadas em alifáticas (ex: putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas [ex: tiramina, feniletilamina, sinefrina e heterocíclicas (ex: histamina, triptamina. As estruturas químicas destas AB são ilustradas na Figura 1 (PINTADO et al., 2008).

As AB são amplamente distribuídas na natureza, estando presentes nas células e nos tecidos como compostos essenciais ao crescimento, renovação e metabolismo. Elas podem desempenhar diversas funções celulares, entre as quais, o aumento da síntese do RNA, do DNA e de proteínas, além da estabilização de membranas. Nos vegetais participam ainda da floração, do desenvolvimento do fruto (do surgimento à senescência), da resposta ao estresse e da síntese de metabólitos secundários, podendo, portanto, ser encontradas naturalmente em alimentos como frutas e hortaliças (CARMO et al., 2010).

Os alimentos de origem animal são naturalmente ricos em aminoácidos livres e, com isso, são suscetíveis à contaminação por AB. Nas carnes e peixes o seu teor aumenta *post mortem*, devido à elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes no trato intestinal, combinada com o rápido processo autolítico (SILLA, 1996).

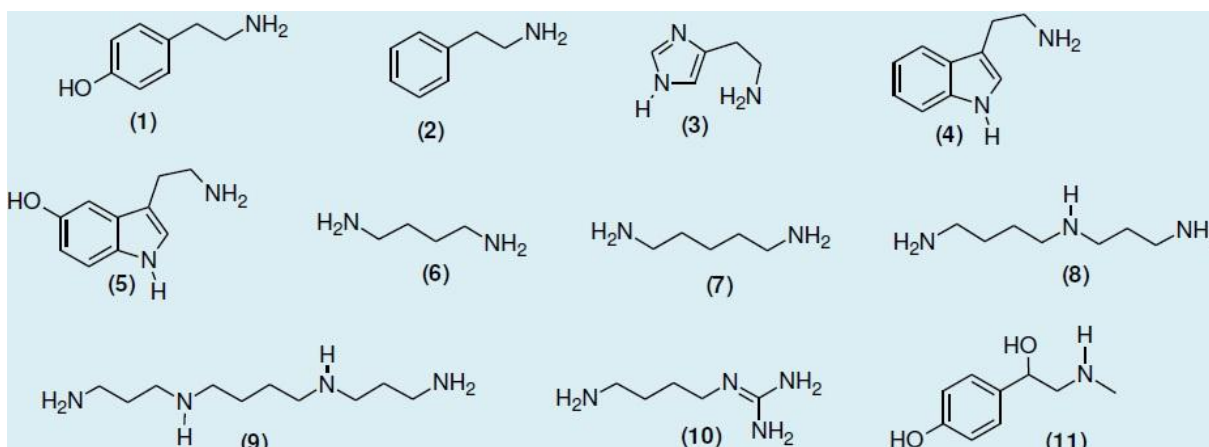


Figura 1. Estruturas químicas de: tiramina (1); feniletilamina (2), histamina (3), triptamina (4), serotonina (5), putrescina (6), cadaverina (7), espermidina (8), espermina (9), agmatina (10) e sinefrina (11). (PINTADO et al., 2008).

A descarboxilação de aminoácidos ocorre pela remoção do grupo α -carboxila para geração da amina correspondente. Nos alimentos, esse processo pode ocorrer por duas vias bioquímicas: através de enzimas descarboxilase endógenas, presentes, naturalmente, nos alimentos, ou através de enzimas descarboxilase exógenas liberadas por MO associados aos alimentos. No entanto, a produção endógena de aminas é muito pequena quando comparada com a via exógena. Por isso, uma grande quantidade de AB presentes em alimentos em geral indica que houve condições favoráveis para a proliferação de MO e a produção de enzimas, como nos processos de decomposição ou deterioração de alimentos. Sendo assim, as AB podem servir como indicativos da qualidade do alimento, já que grandes quantidades desses compostos podem ser encontradas antes mesmo do alimento apresentar sinais de que está estragado ou ter suas propriedades sensoriais alteradas (KOMPRDA et al., 2004).

Normalmente, as AB estão ausentes ou encontram-se em concentrações mínimas (<10 ppm) em alimentos frescos. Contudo, em alimentos como pescado, queijos, carnes, ovos e fermentados, podem estar presentes em concentrações significativas (> 50 ppm), sendo assim capazes de induzir uma intoxicação química, devido a sua associação com a ingestão de pescado (CRIACCHIERINI et al., 2005).

Apesar de serem necessárias em diferentes funções fisiológicas dos seres humanos e animais, as AB possuem diversos efeitos tóxicos. Contudo, esses efeitos só são observados quando elas são ingeridas em excesso (alimentos muito contaminados) ou quando os mecanismos naturais de seu catabolismo são inibidos ou geneticamente deficientes. Com base no modo de ação, as AB podem ser classificadas como aminas vasoativas ou psicoativas. Aminas psicoativas atuam nos transmissores nervosos do sistema nervoso central, enquanto que aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente

sobre o sistema vascular. A histamina (3), a putrescina (6) e cadaverina (7) são aminas psicoativas, enquanto que a tiramina (1), a triptamina (4) e a feniletilamina (2) são exemplos de aminas vasoativas (ONAL, 2007).

O envenenamento escombroide é um problema mundial, que ocorre após o consumo de alimentos contendo AB psicoativas, particularmente a histamina (3), em concentrações acima de 500 ppm. Ele se manifesta tipicamente como uma reação alérgica caracterizada por dificuldade em respirar, prurido, erupção cutânea, vômitos e febre. As ações dos compostos vasoativos [tiramina (1), triptamina (4) e feniletilamina (2)] causam principalmente crises hipertensivas incluindo também outros sintomas como dores de cabeça, enxaquecas, alterações do ritmo cardíaco e derrames. AB também são precursores de compostos cancerígenos como as *N*-nitrosaminas (SANTOS, HOFFMANN, 2010).

A Tabela 1 apresenta as principais AB normalmente encontradas como contaminantes de alimentos, seus respectivos aminoácidos precursores e os seus principais efeitos no organismo (DIAS, LOBATO & VERRUMA, 2009).

As principais formas de se impedir a contaminação por AB são a inibição do crescimento microbiano e/ou a redução da atividade da enzima descarboxilase. Para tanto, são necessários controle de temperatura, matérias-primas de qualidade, boas práticas de manuseio do material, uso de culturas não formadoras de aminas em produtos fermentados e o uso de embalagens e aditivos. Quanto à temperatura, o resfriamento inibe o crescimento e a ação bacteriana, enquanto que temperaturas elevadas eliminam MO. Contudo, uma vez formadas as AB no alimento, reduzir seu conteúdo é bastante difícil já que elas são termicamente estáveis mesmo em exposições prolongadas (SANTOS, 2010).

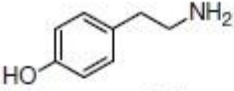
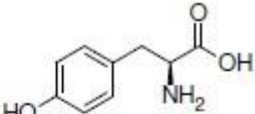
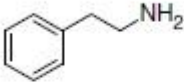
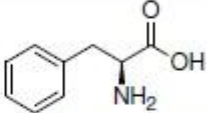
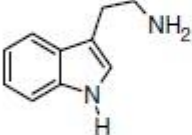
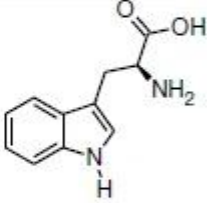

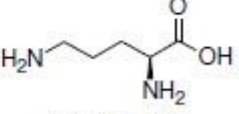

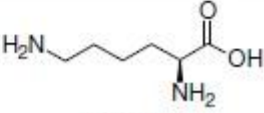
No caso específico do pescado a agência americana FDA (*Food and Drug Administration*) estabeleceu para a histamina um nível máximo de 500 mg por kg de alimento e recomenda a utilização dos seguintes níveis de segurança: <50 mg/kg seguro para consumo, 50-200 mg/kg possivelmente tóxico, 200-1000 mg/kg provavelmente tóxico e >1000 mg/kg tóxico e impróprio para o consumo humano (DIAS, LOBATO & VERRUMA, 2009).

Por outro lado, a União Europeia estabeleceu como aceitável que o conteúdo médio de histamina não deve exceder os 100-200 mg/kg para espécies pertencentes às famílias de peixes *Scomberesocidae* e *Scombridae* e sugeriu o estabelecimento de um limite máximo de 300 mg/kg para o total de AB presentes no pescado ou produtos de pesca. A legislação brasileira estabelece limites de até 100 mg/Kg de histamina para cada quilo de peixe pertencente a família rica em histidina, em conformidade com o recomendado pela literatura científica e os níveis estabelecidos internacionalmente (JOOSTEN & OLIEMAN, 1986).

Quanto às demais AB e produtos, atualmente não existem legislações específicas. Mesmo assim, são impostas barreiras comerciais a produtos contaminados acima dos

limites recomendados. São recomendados, por exemplo, 100 mg de tiramina e 30 mg de feniletilamina (2) para cada Kg de alimento. Com a crescente preocupação com a segurança alimentar e o crescimento dos mercados consumidores, a redução no teor de AB representa um novo desafio (HALÁSZ et al., 1994).

Tabela 1. Aminas biogênicas, seus aminoácidos precursores e principais efeitos no organismo (DIAS, LOBATO & VERRUMA, 2009).

 Tiramina (1)	 Tirosina (13)	Vasoconstrição, aumento do pulso cardíaco, da pressão sanguínea, da taxa respiratória e do nível de glicose no sangue, liberação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, lacrimação, salivação excessiva e derrames.
 Feniletilamina (2)	 Fenilalanina (14)	Liberação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, aumento da pressão arterial, vasoconstrição e derrames.
 Triptamina (4)	 Triptofano (15)	Aumento da pressão arterial e vasoconstrição.
 Putrescina (6)	 Ornitina (16)	Diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, tetania, paralisia nas extremidades, potencialização da toxidez das outras aminas.
 Cadaverina (7)	 Lisina (17)	

2.2 ORIGEM E FORMAÇÃO DAS AMINAS

Além da síntese a partir da amônia, as aminas podem ser formadas por transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados e decomposição térmica. Algumas aminas denominadas de poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) são formadas durante o processo bioquímico chamado *de novo* biossíntese, porém a principal via de formação destes compostos é a partir da descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas (LAPA-GUIMARÃES, 2005).

As aminas são classificadas em aminas naturais e aminas biogênicas quanto a sua origem. As aminas naturais (putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina) são formadas durante os processos metabólicos de plantas e animais à medida que são requeridas e, estarão presentes quando estes forem transformados em produtos alimentícios. Também podem ser formadas a partir dos aminoácidos ornitina e lisina por ação de enzimas descarboxilases produzidas por microrganismos (SANCHES-CASCADO, 2005; BOVER-CID et al., 2006).

Quanto às aminas espermidina e espermina, são formadas a partir de aminoácidos precursores (ornitina e arginina), sendo a putrescina um intermediário obrigatório (SANCHES-CASCADO, 2005).

As aminas biogênicas são substâncias formadas durante as fases de transformação dos alimentos pela ação de enzimas descarboxilases, produzidas por microrganismos sobre aminoácidos específicos. Neste grupo estão incluídas a tiramina, a histamina, a triptamina e a feniletilamina (KALAČ, 2006).

As atividades descarboxilases não estão distribuídas amplamente entre as bactérias, no entanto, as bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *pediococcus*, *lactococcus* e *leuconostoc*), as enterobactérias (*Morganella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*), *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, *Micrococcoccus* e *kocuria*, são descritos como capazes de produzir enzimas aminoácido-descarboxilases (PARENTE et al., 2001).

2.3 NOMENCLATURA E ESTRUTURA QUÍMICA

Na tecnologia de alimentos, a nomenclatura mais utilizada para designar as aminas biogênicas tem sido a partir dos nomes de aminoácidos precursores. Como exemplo, tem-se que a histamina, é uma amina originada a partir de histidina; tiramina uma amina originada a partir de tirosina, assim como a triptamina, a partir do triptofano (LIMA e GLÓRIA, 1999).

De acordo com o número de grupos amínicos, as aminas podem ser classificadas em monoaminas (tiramina, feniletilamina); diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina, cadaverina) e poliaminas (putrescina, espermina, espermidina). Quanto a sua estrutura química, são classificadas em três grandes grupos: aromáticas (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, serotonina, dopamina e octopamina); diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina); e poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina). Quanto à ação no organismo, as aminas são classificadas em vasoativas (tiramina, triptamina, feniletilamina, isoamilamina, histamina e serotonina) e psicoativas (noropinefrina, serotonina e dopamina) (SANCHES-CASCADO, 2005).

2.4 MICROORGANISMOS PRODUTORES

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 aminas 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 morgani*, *Klebsiella pneumonia*, e *Hafnia alvei* são consideradas importantes formadoras de histamina (KALAC, 2006).

A capacidade bacteriana para descarboxilação de aminoácidos tem sido descrita em diferentes gêneros, espécies e estirpes de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Alguns exemplos envolvem os gêneros *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e espécies do gênero *Pseudomonas* (LAPA-GUIMARÃES, 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, devido ao fato de que altas concentrações do íon H⁺ tornam-se prejudiciais ao microrganismo fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases. 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).

3 AMINAS EM ALIMENTOS IN NATURA E PROCESSADOS

As aminas biogênicas têm sido descritas como naturalmente presentes nos alimentos *in natura*. Em alimentos processados via fermentação/maturação, tais como queijos, vinhos, cerveja e embutidos cárneos, a presença destes compostos tem sido descrita principalmente como resultado de ação das enzimas de microrganismos sobre aminoácidos específicos (LATORRE-MORATALLA et al., 2007).

Em alimentos frescos, aminas biogênicas podem ser geradas devido à ação de microrganismos descarboxilase positiva sobre aminoácidos livres em condições favoráveis à atividade enzimática, sendo esta considerada a principal via de formação em alimentos (LAPA-GUIMARÃES, 2005). A Tabela 2 ilustra o conteúdo de aminas biogênicas em diversos alimentos processados.

Tabela 2. conteúdo de aminas biogênicas em diversos alimentos processados. (LAPA-GUIMARÃES, 2005).

Alimento	Bactérias isoladas	Aminas encontradas
Peixes	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacteria erogenes</i> , <i>Vibro alginolytiens</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	tiramina (1), histamina (3), putrescina (6), cadaverina (7), espermidina (8), espermina (9), agmatina (10).
Queijos	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus 30a</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>propionibacterium</i>	tiramina (1), feniletilamina (2), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).
Carnes e derivados	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	tiramina (1), feniletilamina (2), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).
Vegetais fermentados	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococci sp.</i> , <i>Leuconostocmes enteroides</i>	tiramina (1), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).
Produtos fermentados de Soja	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	tiramina (1), histamina (3), triptamina (4), putrescina (6), cadaverina (7).

As aminas putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina, aumentando o seu transporte através da parede gastrointestinal. A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, queijos maturados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida sozinha (EL-SAYED, 1996).

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 (FERNANDEZ, NUNEZ, 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 (LATORRE-MORATALLA et al., 2007).

3.1 EFEITOS TÓXICOS

As AB são componentes endógenos indispensáveis às células vivas, fundamentais para a proliferação e a diferenciação celular, regulação das funções do núcleo, síntese de proteínas, desenvolvimento cerebral, regulação e manutenção do sistema nervoso. Devido à sua importância na fisiologia celular, as concentrações de AB presentes nas células e tecidos permanecem em equilíbrio, sendo reguladas nas etapas de biossíntese, catabolismo, captação e fluxo. (ROIG & HERNANDES, 2002).

A ingestão de alimentos ricos em AB poderia, infelizmente, alterar esse equilíbrio, iniciando processos compensatórios. Estudos com ratos adultos mostraram que, após a ingestão, as AB rapidamente aparecem no intestino, no sangue e em diversos outros órgãos. Além disso, vários estudos destacaram os efeitos toxicológicos de algumas AB, mesmo em pequenas quantidades, após administração oral. A ingestão desses compostos tóxicos pode provocar sintomas digestivos, circulatórios e respiratórios (FERNANDEZ, NUNEZ, 2000).

Os mamíferos possuem um sistema de detoxificação relativamente eficiente, capaz de metabolizar a ingestão diária normal de AB. A oxidação é a principal via de detoxificação de AB após a ingestão, embora processos de metilação e acetilação também estejam implicados na detoxificação da histamina. Nos humanos, em condições normais de saúde, as AB em excesso são rapidamente convertidas em seus produtos de degradação fisiologicamente inativos, principalmente pela ação de amino-oxidases (AO) específicas. Estas enzimas são geralmente classificadas como monoamino oxidases (MAO) ou diamino oxidases (DAO), dependendo do número de grupos amino preferencialmente oxidados. E as MAO são classificadas de acordo com os seus inibidores como MAO-A e MAO-B (MAH et al., 2002).

A MAO-A age na regulação de serotonina no sistema nervoso central e também é responsável, no sistema gastrointestinal, pela detoxificação das monoaminas ingeridas, como a tiramina e a triptamina. A MAO-B é encontrada principalmente no fígado e músculos atuando na desaminação da dopamina e da feniletilamina. Histamina e putrescina são desaminadas pela DAO no intestino, oferecendo proteção contra as concentrações normalmente presentes nos alimentos (INOCENTE et al., 2002).

A gravidade dos sintomas clínicos causados por AB depende da quantidade e variedade de AB ingeridas, da susceptibilidade e do nível de atividade de detoxificação

individuais. Esses fatores individuais podem diferir por razões genéticas ou pela ação de alguma doença. Pessoas com problemas respiratórios, cardíacos, ou carência de vitamina B12 são particularmente mais sensíveis. Indivíduos com problemas gástricos normalmente possuem menor atividade oxidativa intestinal e também se encontram no grupo de risco. Fumantes também podem apresentar uma redução significativa da atividade da MAO-A e da MAO-B chegando a 30% em alguns casos (SHALABY, 1995).

Contudo, um dos principais fatores é a influência de compostos inibitórios das enzimas AO. Esses inibidores agem especialmente no sistema nervoso central como antidepressivos e agentes anti-Parkinson, sendo considerados mais efetivos em alguns subgrupos como pessoas com crises ansiolíticas e idosos. Outros medicamentos inibidores da MAO e da DAO incluem os usados no tratamento da malária e tuberculose pulmonar, além de isoflavonas e seus metabólitos. A associação entre esses medicamentos e o consumo de alimentos aminados, mesmo em concentrações bem inferiores as recomendadas, pode levar a crises hipertensivas e alérgicas (PEREZ, 1987).

A ingestão concomitante de diferentes aminas também potencializa a toxicidade das mesmas já que as aminas menos tóxicas também inibem as AO. Além disso, outros compostos naturalmente presentes em alimentos também competem pelas AO, o que explica o fato de AB em pescados e em queijos curados serem mais tóxicas do que em solução. Analogamente, o etanol e o acetaldeído também agem potencializando os efeitos tóxicos das AB, aumentando a permeabilidade da parede intestinal a estes compostos. Este efeito é particularmente importante em bebidas alcoólicas fermentadas que podem ter altas concentrações de AB. Em geral, não são observados efeitos crônicos devido à ação de AB como agentes tóxicos nos organismos, dado que a normalização dos níveis de aminas ocorre num curto espaço de tempo. Contudo, cresce atualmente a preocupação de que as aminas reajam com os nitritos presentes em diversos aditivos alimentares com produção de nitrosaminas, compostos conhecidamente cancerígenos e prejudiciais ao homem (ONAL, 2007).

Estudos envolvendo animais domésticos alimentados com farinha de arenque conservada com nitrito mostraram o desenvolvimento de distúrbios hepáticos graves que foram atribuídos à presença de nitrosaminas. A formação de nitrosaminas também está associada ao aquecimento, sendo comum o aparecimento desses compostos após processos térmicos como cozimento, fritura e defumação. Os seres humanos podem também ser expostos a nitrosaminas através da nitrosação *in vivo* das aminas ingeridas, já que condições semelhantes às estomacais também são propícias à sua formação (STANDARA et al., 2000).

Dependendo da gravidade dos sintomas, os efeitos das AB podem ser descritos como reações de intolerância, intoxicação ou mesmo envenenamento. Os primeiros sintomas

incluem náuseas, sudorese, erupção cutânea, pequenas variações na pressão arterial e leve dor de cabeça. Nos casos de intoxicação, os sintomas são vômitos, diarreia, rubor facial, erupção de placas vermelhas, broncoespasmo, taquicardia, queimação oral, hipo ou hipertensão e enxaqueca. Em casos de envenenamento por AB, os maiores riscos envolvem uma crise hipertensiva (pressão arterial > 180/120 mmHg) que pode levar a lesões do coração ou do sistema nervoso central (MORET & CONTE, 1996).

4 QUEIJOS

A produção de queijos no mundo é um dos exemplos clássicos de conservação de alimentos, provavelmente antecedendo a era cristã. A conservação dos mais importantes constituintes do leite, como a gordura e as proteínas, na forma de queijos, explora dois princípios clássicos de conservação de alimentos, isto é, a fermentação láctica, a redução da atividade de água e a adição de sal (FOX, 2000). Mesmo com o aumento da produção de alguns alimentos fermentados em escala industrial, ainda existem regiões no mundo onde estes produtos são fabricados de maneira artesanal, incluindo vários queijos, carnes e vegetais fermentados. Na realidade, muitos destes produtos têm se destacado no mercado por conservar propriedades sensoriais características que, de acordo com muitos consumidores, desaparecem nos produtos quando industrializados (CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

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 (PERRY, 2004).

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).

4.1 QUEIJO DE COALHO

Dentre os queijos de fabricação artesanal no Brasil, o queijo de coalho se destaca como um dos principais e, seu consumo já faz parte do hábito alimentar da população, tanto no nordeste como, mais recentemente, nos grandes centros da região sudeste, destacando-se Rio de Janeiro e São Paulo, onde o produto tem excelente mercado (MANDACARU, 2009).

Na região nordeste a produção de queijo de coalho artesanal representa uma atividade de importância social, econômica e cultural. Apesar de não apresentar sofisticação tecnológica, esta produção inclui-se entre os poucos empreendimentos adequados para modificar perfil social e econômico de pequenos municípios da região. Além disso, desempenha importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar em pequenos municípios localizados nas bacias leiteiras (CERRI, 2002). A maior parte da produção de queijo coalho é obtida em pequenas e médias queijarias, as quais movimentam, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais, o que sinaliza essa atividade como importante no âmbito social e econômico (PEREZ, 2008). A maioria dos queijos de coalho é fabricada em pequenas fazendas rurais e/ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais (ANDRADE, 2006).

Atualmente, o estado de Alagoas dispõe de duas bacias leiteiras significativas. A primeira e maior delas, também conhecida como “Bacia Leiteira Tradicional”, situa-se na região do Agreste (compreende 5 municípios) e no Sertão Alagoano (compreende outros 13 municípios), tendo os municípios de Batalha e Major Izidoro como os maiores expoentes. A principal atividade do Arranjo Produtivo Local referente ao seguimento laticínios (APL-laticínio) é a produção de queijo de coalho, atingindo no ano de 2007 um total de 1985 toneladas. O queijo de coalho produzido no sertão alagoano apresenta forte tradição e reconhecida procedência e por isso os produtores locais e as entidades governamentais e empresariais têm buscado o resgate da qualidade, identidade e higiene dos queijos do sertão alagoano (SEBRAE/AL, 2008).

Embora o processo de fabricação do queijo de coalho seja regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, observa-se uma grande variação nos atributos sensoriais desse produto devido, principalmente, ao tipo de leite utilizado, cru ou pasteurizado, quando o produto é obtido por processo artesanal ou industrial respectivamente (CABEZAS *et al.*, 2007). Contudo, outros fatores intrínsecos de cada laticínio podem exercer influência sobre o produto.

O queijo de coalho, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, constante da Instrução Normativa nº 30, de 26/06/011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é o “queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação” (BRASIL, 2005).

O queijo de coalho é um queijo de média a alta umidade, de massa semicozida ou cozida e apresenta um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35% e 60%. Esse produto pode ainda ser adicionado de condimentos. Uma de suas principais características é a firmeza depois de assado (FEITOSA, et. al., 2003).

O queijo de coalho é um produto tipicamente nordestino e muito popular, amplamente consumido pela população local, seja na forma natural, assado ou frito, como também muito utilizado em preparações culinárias, sendo, atualmente, muito difundido em todo o território brasileiro. É produzido principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (MANDACARU, 2009).

A produção rural de queijo de coalho é extremamente significativa na formação de renda dos produtores de leite estabelecidos principalmente na zonal rural, em especial daqueles que não têm acesso às usinas de beneficiamento, representando uma importante atividade econômica e social (CABEZAS *et al.*, 2007).

É um queijo cuja tecnologia é relativamente simples e cuja fabricação não exige equipamentos sofisticados. A diversificação da metodologia para a manufatura do queijo de coalho pode ser constatada na produção de vários fabricantes. A falta de critérios de qualidade para a matéria-prima e para as técnicas de processamento permitem que produtos de baixa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como em relação aos padrões do produto, atinjam o mercado, dificultando sua comercialização. (EMBRAPA, 2005).

4.1.1 Características sensoriais do queijo de coalho

Com relação aos atributos sensoriais do queijo de coalho, os consumidores têm buscado sabores originais que é proporcionado pela microbiota natural do leite cru. No entanto, quando o leite é pasteurizado grande parte desta microbiota é removida, influenciando negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo (GRAPPIN & BEUVIER, 1997).

Mendes *et al.* (2002) compararam sensorialmente o queijo de coalho produzido de acordo com as seguinte técnicas: A – leite cru, B - leite pasteurizado e o C - leite pasteurizado e adição de fermento láctico. Nenhum desses queijos foi considerado ideal

quanto aos atributos avaliados, sendo o queijo A o de melhor aparência, o queijo B o de melhor aroma e o queijo C o de melhor textura. Segundo Peláez & Requena (2005), as diferenças entre a qualidade sensorial de amostras de queijos fabricados com leite pasteurizado e com leite cru dependem, principalmente, da complexidade e da diversidade da microbiota láctica presente.

Perez (2005) visando comparar a aceitação entre amostras de queijos de coalho comercializados no município de Campinas-SP demonstrou que as marcas avaliadas apresentaram perfis sensoriais distintos e suas características foram marcantes e bem definidas. A marca C foi a preferida pelos provadores que declararam ser o sabor, a característica mais apreciada nesse queijo.

4.1.2. Características físico-químicas do queijo de coalho

Mesmo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001a) que define alguns parâmetros para fabricação do queijo de coalho, ainda existe hoje, uma falta de padronização no processo, acarretando diferenças nas características físico-químicas deste produto, refletindo assim a falta de identidade e qualidade do mesmo. As diferenças na sua composição físico-química podem ser verificadas em várias regiões do nordeste, como no estado do Ceará, onde o queijo é classificado como extra gordo ou duplo creme, gordo e de média umidade com teor médio de proteína em 25,02%, acidez 0,26% e pH 5,2 (NASSU *et al.*, 2001a).

A falta de uniformidade nas características físico-químicas do queijo de coalho se deve a composição do leite, o qual não sofre nenhum tipo de padronização, e as variáveis do processo que são as principais fontes de variação com importância tecnológica que exercem influência na qualidade e nas características do produto final (PEREZ, 2005).

4.1.3. Características microbiológicas do queijo de coalho

Os queijos são considerados um veículo freqüente de bactérias patogênicas de origem alimentar e, em especial os queijos produzidos de forma artesanal. Dentre estes, destaca-se o queijo de coalho por ser comumente elaborado a partir de leite cru e sob condições insatisfatórias de higiene em pequenas queijarias que não adotam de forma plena as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Portanto, a contaminação microbiológica deste produto assume destacada relevância para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (BORGES, 2006).

Vários estudos têm classificado o queijo de coalho, principalmente o artesanal, como impróprio para o consumo humano devido ao elevado nível de contaminação por bactérias patogênicas, dentre estas, a *E. coli* enteropatogênica, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus coagulase positiva* (FEITOSA *et al.*, 2003).

Contagens elevadas de microrganismos do grupo coliformes termotolerantes são frequentemente observadas no queijo de coalho, sugerindo que foram produzidos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. A presença desses coliformes no alimento é indicativa de que houve contato direto com material fecal. O *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar pela enterotoxina estafilocócica (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

Salmonella spp., bactéria responsável por casos de toxinfecções alimentares, é comumente detectada em amostras de queijo de coalho. Esta bactéria é encontrada no trato intestinal de animais domésticos e silvestres, especialmente aves e répteis e tem como principal veículo de disseminação os alimentos e a água (FEITOSA *et al.*, 2003)

A presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo de coalho deve servir de alerta às autoridades sanitárias quanto ao perigo do consumo deste produto por parte da população. O risco aumenta quando o produto é consumido sem prévio tratamento térmico (BRANCO *et al.*, 2003).

As vias de contaminação do queijo de coalho, podem ser o leite, o manipulador e o ambiente de processamento. No leite cru, a principal fonte de contaminação provém da mastite bovina, na qual *S. aureus* é o principal agente etiológico. Estudos realizados nas indústrias revelaram que a contaminação cruzada após a pasteurização do leite é a fonte mais relevante de contaminação dos queijos por patógenos (BORGES, 2006).

4.2 ETAPAS DA PRODUÇÃO DO QUEIJO DE COALHO

A tecnologia descrita baseia-se em diferentes observações de produtores de queijo de coalho. É importante ressaltar que modificações podem ser introduzidas, conforme a situação de cada produtor e as características desejadas no produto final (BRASIL, 2005).

1. RECEPÇÃO DO LEITE

O leite deve ser de boa qualidade, de preferência o recém ordenhado. Se não for possível, guardar sob refrigeração, até a temperatura de 12°C. Antes de ser processado, o leite deve ser pesado e em seguida filtrado ou coado em equipamentos ou utensílios destinados para esse fim, para eliminar eventuais sujidades.

2. PASTEURIZAÇÃO

A pasteurização é um processo que elimina os microrganismos patogênicos, que causam doenças. O leite deve ser pasteurizado à temperatura de 62°C a 65°C, durante 30 minutos (pasteurização lenta) ou à temperatura de 72°C, durante 15 segundos (pasteurização rápida). O leite deve ser resfriado à temperatura de 32°C a 35°C, em tanques encamisados, com circulação de água fria, ou em tachos, em banho-maria.

3. ADIÇÃO DE FERMENTO, CLORETO DE CÁLCIO E COALHO

Adicionar os ingredientes de modo que o coalho seja sempre o último. Utilizar sempre coalho industrial em pó ou líquido e seguir as recomendações do fabricante. A adição de fermento e cloreto de cálcio é opcional.

Caso o queijeiro opte por acrescentar o fermento e o cloreto de cálcio, a quantidade de fermento depende do tipo de cultura a ser utilizada e das instruções do fabricante. Em relação ao cloreto de cálcio, a recomendação é de 40 mL para cada 100 L de leite.

A adição do cloreto de cálcio serve para complementar a quantidade de cálcio perdido durante a pasteurização, mantendo o rendimento, enquanto que a cultura láctica serve para a obtenção de sabor e de aroma, mas deve-se tomar precauções para que o pH do produto não seja inferior a 5,8.

4. COAGULAÇÃO

Deixar o leite em repouso, durante 40 a 60 minutos, para a formação da coalhada. O ideal é que a coagulação seja feita em tanque de aço inoxidável, por causa da facilidade de limpeza e por ser um material inerte.

5. CORTE DA COALHADA

Quando a coalhada estiver no ponto de corte (firme e brilhante), romper a coalhada com liras, que são utensílios formados por lâminas ou fios cortantes, dispostos paralelamente e igualmente distantes entre si. Utilizar a lira vertical e em seguida a horizontal, obtendo-se cubos de 1,5 a 2 cm de aresta. Após o corte, deixar em repouso durante 3 a 5 minutos.

6. MEXEDURA

A mexedura é feita para evitar que os cubos venham a se precipitar ou fundir, entre si, o que dificultaria a retirada do soro. Realizar a mexedura lentamente, com garfo ou pá, aumentando ligeiramente a velocidade à medida que os grãos forem se agrupando, durante 10 a 20 minutos. Deixe repousar novamente até que toda a massa se deposite no fundo do tanque.

7. COZIMENTO DA MASSA

Para facilitar a etapa de cozimento da massa, retirar uma parte do soro (primeira dessoragem). Aquecer a massa, em tanque encamisado, até a temperatura de 45°C a 55°C, agitando sempre até os grãos ficarem consistentes (no ponto). O cozimento também pode ser feito adicionando o soro previamente retirado e fervido à temperatura de aproximadamente 75°C.

O final do cozimento, denominado de ponto de massa, pode ser determinado comprimindo um pouco da massa na mão até formar um aglomerado. Estará no ponto quando esse aglomerado se quebrar sob a pressão dos dedos e formar pequenos grãos que se desagregam com facilidade.

8. SALGA

Após a verificação do ponto dos grãos (consistentes e brilhantes), retirar todo o soro restante (segunda dessoragem). Adicionar o sal (dissolvido em soro) à massa, com meximento constante para desagregar os grãos. A quantidade de sal deve ser de 1% a 2% do volume de leite.

9. ENFORMAGEM

Colocar a massa em fôrmas cilíndricas ou retangulares, preferencialmente de material plástico, forradas com dessoradores (Fig. 1), para evitar que a massa do queijo venha a se prender na parede e, também, para facilitar a saída do soro durante a prensagem.

10. PRENSAGEM E VIRAGEM

A prensagem deve ser realizada em prensas manuais, individuais ou coletivas. Após um tempo predeterminado, os queijos devem ser virados, retirando-se as aparas, e colocados de volta na prensa. O tempo de prensagem e o número de viragens podem variar conforme o produtor e a característica desejada do queijo.

11. MATURAÇÃO

Para desenvolver aroma e sabor, o queijo de coalho deve ser maturado em câmara refrigerada, à temperatura de 10°C a 12°C, durante 5 a 10 dias. Os queijos podem ser constantemente virados. Essa etapa é opcional.

12. EMBALAGEM

Acondicionar os queijos em embalagens de plástico. Colocar etiqueta contendo data de fabricação, data de validade, dados completos do produtor (nome, endereço, telefone, número de registro, etc.), conforme instruções da Resolução nº 259, de 20/9/20022 e da Portaria nº 371, de 4/9/19973 .

13. ARMAZENAMENTO

Estocar o produto sob refrigeração, à temperatura de 10°C a 12°C, até sua distribuição e comercialização.

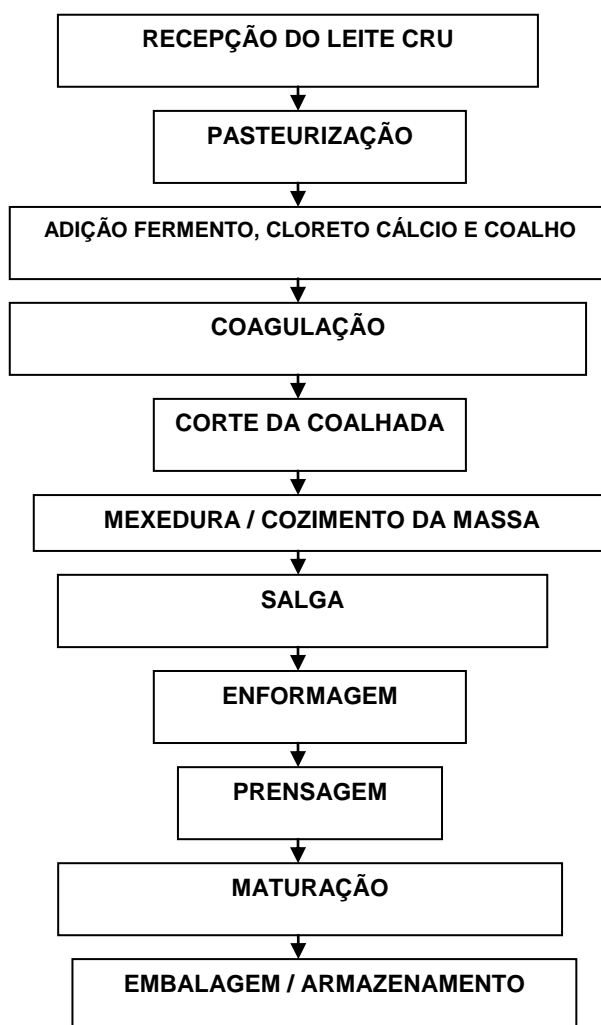


Figura 2. Etapas do processo de produção de queijo de coalho.

4.3 – BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO E CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NA PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO

Em diversos trabalhos científicos é relatado que a qualidade da matéria-prima, as condições de processamento e o processo de maturação dos queijos são imprescindíveis para a obtenção de produtos de qualidade e para a proteção da saúde do consumidor (FEITOSA et al., 2003).

Em algumas localidades, o leite ainda é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em conseqüência, apresenta elevado número de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico. Dessa forma, para o leite e seus derivados, cuidados higiênicos desde a ordenha até a obtenção do produto final devem ser empregados (CATAO E CEBALLOS, 2001).

O queijo-coalho, por ser elaborado em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias, que não adotam as boas práticas de fabricação, não apresenta segurança microbiológica e padronização de qualidade. A contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância para a saúde pública, pelo potencial risco de causar doenças transmitidas pelo alimento (FEITOSA et al., 2003).

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, a contaminação microbiana dos alimentos é indesejável e, inclusive, nociva. Esse aspecto é encarado com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, que implicariam em contaminação do alimento, busca-se averiguar a presença de microrganismos indicadores de má qualidade higiênica e de microrganismos patogênicos (CAVALCANTE, 2003).

Vários estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo-coalho relataram ocorrência de microrganismos patogênicos e contagem de microrganismos deterioradores em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação. Dentre as bactérias patogênicas observadas destacam-se *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e *Listeria* (CAVALCANTE et al., 2007).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria responsável por casos de doenças alimentares, é comumente observada em queijo-coalho, normalmente é encontrada no trato intestinal de animais domésticos e silvestres, especialmente aves e répteis e tem como principal veículo de disseminação os alimentos e a água (ÁVILA E GALLO, 1996; FEITOSA et al., 2003).

Contagens elevadas de microrganismos do grupo coliformes são freqüentemente observadas no queijo-coalho, sugerindo que foram produzidos em condições de higiene insatisfatória. A presença de coliformes fecais ou termotolerantes em alimento é indicativa

de que houve contato direto com material fecal (DUARTE et al., 2005). *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar pela enterotoxina estafilocócica (CUNHA NETO et al., 2002).

5 DESCONTAMINAÇÃO DAS AMINAS BIOGÊNICAS

Como a contaminação por toxinas é muitas vezes inevitável devem ser tomadas medidas de descontaminação para evitar riscos à saúde, prejuízos econômicos e a diminuição no fluxo de alimentos. Apesar de alguns tratamentos reduzirem os níveis de algumas toxinas específicas, nenhum método já desenvolvido é igualmente eficaz contra a grande variedade de toxinas que podem ocorrer em conjunto em vários produtos. Dessa forma, não há um método único para resgatar os alimentos contaminados para o uso na alimentação com a garantia de segurança (CUSTODIO, 2006).

O procedimento de descontaminação ideal deve: **1)** inativar completamente, destruir ou remover a toxina, reduzindo sua concentração a níveis aceitáveis; **2)** Não produzir ou deixar resíduos tóxicos, cancerígenos ou mutagênicos nos alimentos/rações; **3)** preservar o valor nutritivo dos alimentos/rações; **4)** não alterar a aceitabilidade ou as propriedades tecnológicas do produto; **5)** reduzir as cepas de MO que poderiam em certas condições proliferar e produzir novas toxinas recontaminando a amostra; **6)** ser integrados, se possível, ao processamento regular dos alimentos; **7)** ter boa relação custo-benefício; **8)** ser fácil de usar; **9)** não destruir, danificar equipamentos ou colocar em perigo a saúde dos operadores e **10)** ser aprovado pelos órgãos reguladores. (IBRAHIM, 2010)

Diferentes estratégias foram descritas para a redução do conteúdo de toxinas em produtos e alimentos conforme resumido na Tabela 3 (HECK et al., 2009).

Tabela 3. Estratégias para a redução de toxinas em alimentos (HECK et al., 2009).

	Remoção		Inativação		Biodegradação
	Física	Química	Física	Química	
Produção	Separação	Extração	Irradiação	Produtos Químicos	MO
↓	Moagem		Calor		Plantas
↓			Adsorção		
Alimento Pronto			Irradiação	Produtos Químicos	MO Plantas

Os métodos de descontaminação de toxinas podem ser processos físicos, químicos e biológicos. Os processos físicos incluem a remoção de toxinas pela separação de produtos contaminados de misturas ou por moagem e inativação por meios físicos, como calor, cozimento, torrefação, adsorção e irradiação. Os processos de degradação química

de toxinas envolvem a extração com o uso de diversos solventes e a detoxificação pelo uso de produtos como cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio, amônia e outros álcalis e ácidos com poder de destruição que ainda são objeto de estudo. Métodos biológicos usam enzimas, MO ou plantas que removem as toxinas dos substratos transformando-as em produtos menos tóxicos (GOLINELLI et al., 2011).

Métodos físicos como o aquecimento por micro-ondas e tratamentos por irradiação estão ganhando espaço em aplicações na indústria de alimentos como ferramentas de controle da segurança dos produtos, auxiliando na preservação e prevenção da deterioração. Por serem potenciais tratamentos de inativação de toxinas, eles também aliam mais um benefício a sua aplicação (MARINÉ, 2005).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho procurou-se fazer uma revisão sobre as aminas biogênicas presentes em alimentos processados como os queijos com ênfase em seus efeitos tóxicos e o problema que essa classe de substâncias representa para a saúde pública como contaminante de alimentos.

Também foram apresentadas e discutidas as principais formas de eliminar ou reduzir essas substâncias dos alimentos de forma a se garantir uma maior segurança alimentar e também aumentar a vida útil de alimentos num contexto mundial de crescente demanda alimentar.

Com a aplicação de métodos eficazes de determinação de aminas biogênicas em alimentos e das boas práticas de fabricação, é possível reduzir a produção das aminas biogênicas pelos microorganismos tornando o produto mais seguro.

Espera-se contribuir para o maior entendimento da importância e dos riscos para a saúde representados pelas aminas biogênicas, além de motivar novos estudos voltados para essa importante classe de substâncias nocivas à saúde.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. S. A., NASSU, R.T., RODRIGUES, M.C.P., SILVA, G.J.F., FERNANDES R.L.A., SILVA A.C. Desenvolvimento da terminologia descritiva de queijo de coalho, **Rev Inst Lat Candido Tostes**. 2006; 61(351): 314-7.

ÁVILA, C.R.; GALLO, C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado queijo tipo “minas frescal” comercializados no município de Piracicaba, SP. **Sci. Agric.**, v.53, p.159-163, 1996.

BARDÓCZ S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci Technol**. 1995; 6(10):341-6.

BOVER-CID, S. Identificación de variables y medidas de control de la acumulación de Aminas Biogenas en productos carnicos fermentados. Barcelona, 1999. **Universidad de Barcelona**. Disponível em:<http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_TECNOLOGICAS/TECNOLOGIA_DE_LOS_ALIMENTOS/ALIMENTOS_PROTEINICOS/3>.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E.A.T; BORGES, M.F.; SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n.2, p. 209-430, jul./dez. 2003.

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.

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.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. **Dispõe Sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos**. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2001b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo de coalho**. Diário oficial da União. Brasília, 16 de julho de 2001a.

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.

CABEZAS, L.; SÁNCHEZ, I.; POVEDA, J.M.; SESENA, S.; PALOPP, M.L.L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artesanal manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, v.18, p.11-17. 2007.

CABEZAS, L.; SÁNCHEZ, I.; POVEDA, J.M.; SESENA, S.; PALOPP, M.L.L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artesanal manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, v.18, p.11-17. 2007.

CARMO FBT, MÁRSICO ET, SÃO CLEMENTE SC, CARMO RP, FREITAS MQ. Histamina em conservas de sardinha. **Ci Anim Bras**. 2010;11(1):174-80.

CATAO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. Pesquisa de *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.21, p.281-287, 2001.

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Isolamento de bactérias lácticas de leite cru da Região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 106-109, 2003.

CAVALCANTE, J.F.M.; ANDRADE, N.J.; FURTADO, M.M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.27, p.205-214, 2007.

CERRI, C. **Artesãos do futuro**. Globo Rural, Ed. Globo, n. 200, p. 36-49, junho 2002.

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.

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.

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.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 305, n. 53, p. 29-49, 1998.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.22, p.263-271, 2002.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.22, p.263-271, 2002.

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.

DADÁKOVÁ E, KRÍZEK M, PELIKÁNOVÁ T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chem.** 2009; 116: 365-70.

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.

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.

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, p.297-302, 2005.

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

FEITOSA T., BORGES M.F., NASSU R. T., AZEVEDO EHF, MUNIZ C.R., Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higienico-sanitarios em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Cienc Tecnol Aliment.** 2003; 23(Supl):162

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. suplemento, p. 162-165, dez. 2003.

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.

FOX, P. F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen Publishers, cap. 5, p. 54-97, 2000.

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.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E.; Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International of Dairy Journal**, Barking, v.7, p. 751-761, 1997.

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.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMONSARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 5, n. 2, p. 70-76, 1994.

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.

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.

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.

INNOCENTE N, D'AGOSTIN P. Formation of biogenic amines in typical semi hard Italian cheese. **J Food Prot.** 2002; 65:1498-01.

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.

JOOSTEN HMLG. The biogenic amine contents of dutch cheese and their toxicological significance. **Neth Milk Dairy J.** 1988;42(1) 25-42.

KALAČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: a review. **Meat Science**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 1-11, 2006.

KOMPRDA T, SMĚLÁ D, PECHOVÁ P, KALHOTKA L, ŠTENCL J, KLEJDUS B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. **Meat Science** 2004; 67(4): 607-16.

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.

LAPA-GUIMÃRES, J. Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado. Campinas, 2005. Tese (Doutorado) - **Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**.

LATORRE-MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S.; AYMERICH, T.; MARCOS, B.; VIDAL-CAROU, M. C.; GARRIGA, M. Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. **Meat Science**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 460-469, 2007.

LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

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.

MANDACARU. Queijo de coalho Mandacaru. **Disponível em** <<http://www.queijodecoalho.com.br>>, acesso em: 28/04/2015.

MARINÉ-FONT, A. Les amines biogènes en els aliments: història i recerca en el marc de les ciències de l'alimentació. **Barcelona: Institut d'estudis Catalans**; 2005.

MENDES, E. S. ; MENDES, P.P.; COELHO, M.I.S.; SOUZA, J.C.R.; CRUZ, M.C.S.; MOREIRA, R.T. Avaliação sensorial de queijos de coalho elaborados com diferentes técnicas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p.59-65, set. 2002.

MORET SE, CONTE L. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. Ananalysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **J. Chromatogr**. 1996;729:363-69.

NASCIMENTO, I.R., SILVA, E.S., FELIX, F.F. Estudo das condições de abastecimento de comercialização das características físico-químicas do queijo de coalho comercializado em Aracaju (SE). **Rev Inst Lat Candido Tostes**. 2002; 57: 250-4.

NASSU, R.T.; LIMA, J.R; BASTOS, M.S.R.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Revista Higiene alimentar**, São Paulo, v.15, n.89, p.28-36, out. 2001

ONAL A, A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chem.** 2007; 103: 1475–86.

PARENTE, E.; MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; GRIECO, S.; CRUDELE, M. A.; SUZZI, G. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. **Journal of Applied microbiology**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 882-891, 2001.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. Review. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 831-844. jun./set., 2005.

PEREZ, R. M. Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo coalho comercializado no município de Campinas, SP. 2005. 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. **Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo.

PEREZ, R.M., BOHITO, W.H. Propriedades funcionais e composição de queijos de coalho comerciais. **Rev Inst Lat Candido Tostes.** 2008;1:1-9.

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.

PERRY KSP. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova.** 2004; 27(2): 293-300.

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.

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.

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.

ROIG-SAGUES AX, MOLINA AP AND HERNANDES-HERRERO MM. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **Eur Food Res Technol.** 2002; 215: 96–100.

Russel FE, Maretic Z. Scombroid Poisoning: mini review case histories. **Toxicon.** 1986. 24(10): 967-73.

SANCHES-CASCADO, S. P. Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. España, 2005. Tese (Doutorado) - **Universitat de Barcelona** - UB.

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.

SHALABY AR. Multidetecção semi quantitativa method for determining biogenic amines in foods. **Food Chem.**1995;52:367-72.

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

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

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.

STANDARA S, VESELA ME, DRDAK M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. **Nahrung.** 2000;44:28-31.

STRATTON JE, HUTKINS RW AND TAYLOR SL. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A review. **J Food Prot.** 1991; 54:460-70.

TAYLOR SL. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Crit Rev Toxicol.**1986;17:91-128.

TESHIMA, E., VIANA A.C., ASSIS, M.M.S., FIGUEIREDO, H.M. Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho Comercializado em Feira de Santana. **Rev Inst Lat Candido Tostes.** 2004; 59 (339): 194-8.

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.

Artigo II: artigo de resultados

LIMA, VVC; DELGADO, MC; NASCIMENTO, TG;. Determinação de amins biogênicas em queijo de coalho produzidos em laticínios do Estado de Alagoas.

Revista que será submetido: Journal of the Science of food and agriculture - B1

RESUMO

Aminas biogênicas são formadas como resultado da descarboxilação de aminoácidos livres específicos. A análise desses metabólitos é de grande importância na determinação da qualidade e segurança de alimentos, como os queijos, visto que as aminas biogênicas estão relacionadas com episódios de intoxicação em humanos. A cromatografia é uma técnica de separação química usada para caracterizar aminas biogênicas. Variações da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência tem sido amplamente usadas, porém a complexidade da matriz alimentar do queijo coalho, faz com que sejam realizadas mudanças nos processos de extração, derivatização e detecção em concordância com cada grupo de alimento. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método mais utilizado na determinação de aminas biogênicas em alimentos. O objetivo deste trabalho é analisar a presença de aminas biogênicas em queijos do tipo coalho produzidos em laticínios do Estado de Alagoas. Um total de 20 amostras de queijo de coalho comerciais foram adquiridos no comércio de Maceió e Arapiraca no período entre janeiro, fevereiro e março de 2015. Foi desenvolvido um método cromatográfico (CLAE-FLUOR) com detecção de fluorescência para determinação de quatro aminas biogênicas (tiramina, feniletilamina, cadaverina e putrescina). Foram encontrados em todas as amostras avaliadas, baixos níveis das aminas biogênicas analisadas o que pode representar risco à saúde dos consumidores quando esses alimentos são ingeridos em grandes quantidades ou quando há uma susceptibilidade individual. Análise do componente principal demonstrou alguns laticínios com presença de outras aminas biogênicas, porém todos os laticínios apresentaram-se dentro da região elipsoidal com nível de significância de 95%, exceto para os queijos que foram forçados ao envelhecimento.

PALAVRAS-CHAVE

Aminas biogênicas, tiramina, cadaverina, putrescina, CLAE-Fluorescência, Queijo de coalho, padrão de qualidade microbiológico, Segurança alimentar.

ABSTRACT

Biogenic amines are formed as a result of specific free amino acid decarboxylation. The analysis of metabolites is of great importance in determining the quality and safety of food, such as cheese, as the biogenic amines are associated with episodes of toxicity in humans. Chromatography is a chemical separation technique used to characterize biogenic amines. Variations of Liquid Chromatography technique of high efficiency has been widely used, but the complexity of the food matrix curd cheese, makes changes are made in extraction processes, derivatization and detection in accordance with each food group. The high-performance liquid chromatography (HPLC) is the most widely used method in the determination of biogenic amines in foods. The objective of this study is to analyze the presence of biogenic amines in cheese curd dairy type produced in the State of Alagoas. A total of 20 commercial curd cheese samples were acquired in the trade of Maceió and Arapiraca between January, February and March 2015. curd cheese samples containing propolis extract (0.1%, 0.3% and 0.5%) were prepared in the dairy industry IFAL / Satuba and subjected to microbiological quality tests and biogenic amines. It developed a chromatographic method (HPLC-FLUOR) with fluorescence detection for the determination of 4 biogenic amines, which are: (tyramine, feniletilamine, cadaverine and putrescine). and they were found in all samples, low levels of biogenic amines, but can pose a risk to consumer health. Principal component analysis showed some dairy with presence of other biogenic amines, but all dairy products were within the ellipsoidal region with a 95% significance level, except for cheeses that have been forced to aging.

KEYWORDS

Biogenic amines, tyramine, cadaverine, putrescine, HPLC-Fluorescence, cheese curd, standard microbiological quality, food safety.

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 cetonas. 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 (DIAS, 2009).

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) (LANGE et al., 2002). Entre as aminas biogênicas, a ação da tiramina é particularmente importante, uma vez que a intoxicação por ela desencadeia crises hipertensivas e enxaquecoides, náuseas, vômito, angústia respiratória e palpitação. 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 houver fatores de potencialização, como o consumo de álcool (DADÁKÓVA, 2009). 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 boca. Em casos graves, em curto espaço de tempo, podem ocorrer dores torácicas e distúrbios respiratórios. Na presença de nitritos, as aminas podem formar N-nitrosaminas, as quais têm ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica (INNOCENTE, 2002).

Normalmente, as AB estão ausentes ou encontram-se em concentrações mínimas (<10 ppm) em alimentos frescos. Contudo, em alimentos como pescado, queijos, carnes, ovos e fermentados, podem estar presentes em concentrações significativas (> 50 ppm), sendo assim capazes de induzir uma intoxicação química, também conhecida historicamente por envenenamento escombróide, devido a sua associação com a ingestão de pescado (CRIACCHIERINI et al., 2005). Atualmente não existem legislações específicas. Mesmo assim, são impostas barreiras comerciais a produtos contaminados acima dos limites recomendados. São recomendados, por exemplo, 100 mg de tiramina e 30 mg de feniletilamina (2) para cada Kg de alimento. Com a crescente preocupação com a segurança

alimentar e o crescimento dos mercados consumidores, a redução no teor de AB representa um novo desafio (HALÁSZ et al., 1994). O envenenamento escombroide é um problema mundial, que ocorre após o consumo de alimentos contendo AB psicoativas, particularmente a histamina (3), em concentrações acima de 500 ppm. Ele se manifesta tipicamente como uma reação alérgica caracterizada por dificuldade em respirar, prurido, erupção cutânea, vômitos e febre. As ações dos compostos vasoativos [tiramina (1), triptamina (4) e feniletilamina (2)] causam principalmente crises hipertensivas incluindo também outros sintomas como dores de cabeça, enxaquecas, alterações do ritmo cardíaco e derrames. AB também são precursores de compostos cancerígenos como as *N*-nitrosaminas (SANTOS, HOFFMANN, 2010).

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 mundial, 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. O processo de maturação decorrente do processamento tecnológico produz alterações de textura e sabor, associadas principalmente à proteólise da caseína, resultando em aumento no teor de aminoácidos livres, que, por ação de descarboxilases bacterianas, produzem aminas biogênicas (PINTADO, 2008).

Microorganismos com atividade descarboxilase ou microorganismos contaminantes provenientes do leite ou do processo de obtenção tecnológica do queijo, podem estar relacionados com a formação de aminas biogênicas nesses alimentos. É possível também utilizar a determinação de aminas biogênicas como parâmetro de qualidade no processo de fabricação, ou como indicador do grau de proteólise, característico de alguns tipos de queijos especiais (DIAS, 2009).

Várias técnicas analíticas, como eletroforese capilar (EC), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia de troca iônica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), têm sido propostas para a determinação de aminas biogênicas em matrizes alimentares. Dentre as técnicas citadas, a CLAE em fase reversa é considerada a mais adequada (CHIACCHIERINI et al., 2005).

Alguns trabalhos científicos vêm sendo desenvolvidos para avaliar a qualidade de queijos. Leuschner e col. (1999) avaliaram a influência do tempo de 12 dias de maturação em queijo gouda com presença de *Enterococcus faecalis* $> 1 \times 10^9$ UFC/mL e presença da amina biogênica tiramina em concentrações de 477mg/Kg. Novella-Rodriguez e col. (2002) avaliaram o efeito de pressão hidrostática sobre o conteúdo de aminas biogênicas durante maturação de queijos de cabra. Alguns trabalhos avaliam a influência da dieta administrada aos animais e a formação de aminas biogênicas. Combarros-Fuertes e col. (2014) avaliaram a influência do leite cru e o leite pausterizado, e concluíram que o leite cru apresenta valores

de 400mg/kg de aminas biogênicas, principalmente, putrescina, espermidina e tiramina. Novella-Rodriguez e col. (2000) avaliaram a presença de aminas biogênicas em queijos maturados e não maturados e os resultados mostraram que queijos não maturados tem a presença de espermidina e espermina, enquanto queijos maturados tem a presença de tiramina, putrescina e cadaverina. Abellán e col. (2011) avaliou a presença de enzimas presentes nas flores de *Cynara cardunculus* usadas na produção e maturação de queijos de cabra tradicionais espanhóis e portugueses e que acelera o processo de maturação de queijos produzidos reduzindo assim processo de contaminação. Trabalhos semelhantes com Zhang e col. (2013), demonstram que alguns tipos de pastos como bagaço do talo de milho, feno de alfafa e *leymus chinensis* induz um tipo de microbiota e fermentação do rumem animal favorecendo a certo de de aminas biogênicas. Feno de alfafa diminui a concentração de putrescina, cadaverina e tiramina.

Este trabalho justifica-se devido à importância da determinação das aminas biogênicas em queijos de coalho para a saúde pública no Estado de Alagoas e pela carência de literatura abordando esse tema no Brasil. Com isso, os resultados obtidos neste estudo irão fornecer à comunidade técnico-científica informações exploratórias sobre os níveis de aminas biogênicas presentes nas amostras de queijo de coalho e sobre os riscos para saúde pública. Esse estudo teve como objetivo determinar aminas biogênicas (cadaverina, feniletilamina, putrescina e tiramina) em queijos de coalho produzidos em Alagoas, utilizando a técnica de CLAE/HPLC.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- MATERIAIS

- Para as análises cromatográficas foram adquiridos 20 amostras de queijos de coalho de diversas empresas/microempresas do estado de Alagoas.
- As amostras foram adquiridas no comércio de Maceió e Arapiraca no período entre janeiro, fevereiro e março de 2015.
- O critério de seleção foi baseado no programa de monitoramento contínuo da qualidade de queijo de coalho do Estado de Alagoas do SESC-AL e Casa da Indústria-AL, sob a coordenação de Marcos Peixoto.

2- MÉTODOS

2.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS (CLAE-UV)

2.1.1 Coleta de amostras de queijo de coalho comerciais

Amostras de queijo de coalho (fortificado com 0,1%; 0,3% e 0,5% de extrato de própolis vermelha) de produção piloto da indústria de laticínio IFAL do campus Satuba-AL foram produzidos entre 28 a 30 de janeiro de 2015. Queijos coalhos comerciais foram adquiridos em supermercados e hipermercados de Maceió e Arapiraca entre fevereiro e março de 2015.

Imediatamente após coleta nos locais comerciais, as amostras foram submetidas a congelamento em freezer (-20°C) até o momento da análise. No momento da análise as amostras eram retiradas do freezer e deixadas sob descongelamento natural por período de 6 a 12 horas na temperatura ambiente 20-25°C. Durante este período de descongelamento, havia a formação da dessoragem natural do queijo de coalho com volumes variáveis entre 1 e 3,5 mL. Alíquotas de 600µL eram utilizadas para ensaios de derivatização e análise usando CLAE-FLUOR.

2.1.2 Condições de derivatização

Os padrões analíticos de tiramina, histamina, feniletilamina, putrescina e cadaverina foram adquiridos da sigma-aldrich com pureza superior a 95%. Reagente derivatizante (cloreto de dansila) também foi adquirido da sigma-aldrich.

O reagente derivatizante cloreto de dansila foi preparado pesando 10 mg e solubilizando em acetona (10 mL) ou em etanol absoluto (10mL). Este último foi o preferido e armazenados em frasco âmbar em freezer -20°C por 5 dias. Os padrões analíticos (10,0 mg) foram pesados e transferidos para frascos tipo ampicilina e solubilizados com 6 mL de sistema de solvente etanol absoluto:água acidificada com HCl 0,1M (8:2; v/v). Em seguida as soluções eram transferidas para balão de 10 mL e completadas os volumes com o mesmo sistema de solvente. As soluções estoques foram estocadas em freezer (-20°C) por no máximo 5 dias.

2.1.3 Reação de derivatização usando cloreto de dansila

Soluções de trabalho entre 100,00 µg/mL e 333µg/mL foram utilizadas para estabelecer tempo de retenção dos padrões analíticos (tiramina, histamina, 2-feniletilenoamina, putrescina e cadaverina) na corrida analítica.

As soluções estoques recentemente preparadas (1mg/mL) foram diluídas para concentrações finais de 0,058 µg/mL; 0,100 µg/mL; 0,440µg/mL; 1,100µg/mL; 2,18 µg/mL e 4,00 µg/mL. O procedimento geral foi tomar alíquota de 600 µL da solução estoque ou solução de trabalho, 300µL do reagente derivatizante (cloreto de dansila) e 200 µL de

solução tampão de carbonato sódio (pH 9,0) para obter concentrações finais citadas de aminas biogênicas em soluções de trabalho. As amostras eram submetidas a um leve aquecimento em temperatura de 40 °C por 1 hora (promover a reação de derivatização), e em seguida eram filtradas em unidades filtrantes de 0,22 µm e injetadas (2µL) no UPLC-FLUOR. As amostras de queijos coalhos comerciais e fortificados sofreram o mesmo procedimento de derivatização.

2.1.4 Condições cromatográficas e de detecção usando detector de fluorescência

O sistema cromatográfico apresentava os seguintes módulos: bomba de alta pressão LC-20ADXR, degaseificador DGU-20A3R, auto injetor modelo SIL-20AXR, forno para coluna cromatográfica modelo júpiter C18 (250 x 4,60 mm; 5µm/120A) detector de fluorescência, modelo RF 20A e uma controladora CBM-20A e detector de fluorescência modelo RF-20A e software Labsolution da Shimadzu.

A separação dos cinco marcadores ocorreu no sistema cromatográfico utilizando uma coluna C18 Júpiter (250 x 4,6 mm, 5 µm) e uma pré-coluna C18 (10 x 4,6 mm, 5 µm) ambas da Phenomenex que estava aclimatada no forno a uma temperatura de 33°C. A fase móvel utilizada para eluição dos marcadores do extrato de queijo de coalho foi constituído de acetonitrila: água, num fluxo de 0,8 mL/min. A eluição aconteceu em modo gradiente. O detector de fluorescência está equipado para monitorar 4 comprimentos de excitação e 4 comprimentos de emissão simultaneamente, sendo eles: 320ex-450em; 334ex -450em; 334ex – 495em; 334ex-520em.

2.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da UFAL, segundo parâmetros recomendados pela Resolução RDC 12/2001 (BRASIL, 2001), que determina os seguintes microorganismos para queijos de alta umidade: Coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. Também foi determinada a umidade dos queijos.

2.2.1 Enumeração de Coliformes a 45°C pela técnica do NMP

Foram pesados assepticamente 25 gramas de queijo e adicionados em 225 mL de água peptonada tamponada. Em seguida homogeneizou-se em Stomacher e procedeu-se a preparação das diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Para enumeração de coliformes a 45°C utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos, com Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e caldo EC (*Escherichia coli*), ambos contendo tubos de Durham invertidos em seu interior. As amostras que evidenciaram retenção de gás e turvação em LST, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo EC e incubadas em banho-maria a 45°C/ 24 a 48h considerando-se positivos os que apresentaram gás no tubo de Durham.

2.2.2 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Utilizou-se as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} conforme descrita no item anterior e semeou-se inóculo de 0,1ml em placas de petri contendo Ágar Baird Parker. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24-48 horas e consideradas colônias típicas aquelas que apresentaram máximo 1,5 mm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por um halo transparente estendendo para além da zona opaca. Procedeu-se a contagem e confirmação das colônias através dos testes de coagulase e catalase.

2.2.3 Pesquisa de *Salmonella sp*

Para pesquisa de *Salmonella sp*, realizou-se inicialmente o pré-enriquecimento, que consiste na transferência de 25 mL da amostra para frasco contendo 225 mL de água peptonada tamponada e incubação à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Em seguida, realizou-se o enriquecimento secundário, que consiste na transferência de 0,1 mL e 1 mL da água peptonada a 0,1% para 10 mL de Caldo Rappaport-Vassilidis modificado (RV) e 10 mL de Caldo Selenito-Cistina (SC), respectivamente, e incubação em banho-maria a $41^{\circ}\pm 0,5\text{C}$ por 24 a 30 horas. A partir desses caldos, foram realizados o plaqueamento seletivo, através da técnica de esgotamento em placas de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e *Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose* (BPLS), com o auxílio de alça de platina e as placas incubadas à $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Em seguida, foram selecionadas colônias típicas presentes nas placas de Agar XLD (colônias com coloração rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente, embora, a depender da produção de H_2S e da fermentação da lactose, essas características possam ser diferentes) e de Ágar BPLS (colônias incolores ou de cor rosada, entre translúcidas à ligeiramente opacas; quando rodeadas por microorganismos fermentadores de lactose, pode apresentar-se verde-amarelada) para a confirmação preliminar das colônias suspeitas de *Salmonella sp*. As colônias com características típicas foram submetidas a testes bioquímicos para identificação (no Agar TSI, LIA e SIM).

2.2.4 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para detecção de *L. monocytogenes*, 25g da amostra foi homogeneizada em 225mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB), e incubada a 30°C por 24h. Em seguida foi transferido 0,1mL do inóculo para tubo contendo 10mL de caldo Fraser e incubado a 30°C por 24h. Posteriormente semeou-se em placas contendo Agar Oxford e Agar Palcam e incubou-se a 37°C por 24h.

2.3) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através da comparação das médias dos tratamentos, com a utilização do teste de Tukey estabelecendo-se $p \leq 0,05$ como nível de significância. O programa estatístico utilizado foi o SAS[®] versão 9.0.

Análise do componente principal foi realizada usando software Simca P, versão 13.0. Os pares dados de tempo de retenção e área dos 4 comprimentos de excitação e emissão usados na cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência foram e tabulados e tratados no Excel para todos os laticínios estudados e transferidos para o software que foram analisados em máximo de 18 variáveis no intervalo entre 25 e 55 minutos, cada tempo de retenção e sua respectiva área correspondia a 1 variável. Os gráficos elipsoidais de Análise do componente principal (PCA) foram obtidos e analisados quanto a presença ou ausência de outliers no intervalo de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação microbiológica de queijos de coalho (sem fortificação) produzidos em alguns laticínios do estado de Alagoas.

Diante dos resultados obtidos nesta etapa da pesquisa, ficou evidente a falta de qualidade higiênico sanitária em algumas micro indústrias do estado de Alagoas. Todas as amostras apresentaram altas contagens de coliformes a 45°C e duas amostras ainda apresentaram números elevados de *Staphylococcus* coagulase positiva. Conforme a tabela 2, as amostras (A), (C) e (E) foram consideradas impróprias para o consumo devido a alta contagem de coliformes a 45°C acima do limite estabelecido pela RDC 12/2001 da ANVISA. As amostras (B) e (D) também foram consideradas impróprias por apresentarem alta contagem de coliformes a 45°C, e *Staphylococcus* coagulase positiva (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação microbiológica de amostras de queijo de coalho produzido em alguns laticínios do Estado de Alagoas

Análises	Queijo A	Queijo B	Queijo C	Queijo D	Queijo E	Padrão*
Coliformes a 45°C (NMP/g)	$>5 \times 10^3$	$>5 \times 10^3$	$>10^3$	$>5 \times 10^3$	$>5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	$<10^2$	$>10^3$	$<10^2$	$>10^3$	$<10^2$	10^3
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

Padrão*: RDC nº12 (BRASIL,2001b): Dispõe sobre padrões microbiológicos sanitários para alimentos.

Resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa foram constatados por Benevides & Telles (2002) em 40 (80,6%) amostras de queijos de coalho produzidos na cidade de Fortaleza-CE, com valores de coliformes termotolerantes acima do padrão microbiológico permitido pela legislação brasileira (BRASIL,2001b).

Bruno *et al.* (2005) também analisaram amostras de queijo de coalho produzidos a partir de leite cru e a partir de leite pasteurizado (4 unidades de cada) e detectaram que todas as amostras apresentaram *Escherichia coli*, sendo que, nas amostras produzidas com leite cru foi também detectada a presença de *Salmonella* sp. No entanto, em três das amostras produzidas com leite cru e em uma produzida com leite pasteurizado, apresentaram também contagens elevadas de estafilococos coagulase positiva, isto é, acima de 10^7 UFC/g.

Resultados divergentes foram obtidos por Branco *et al.* (2003), quanto à presença de *Listeria monocytogenes*, em amostras de queijo de coalho detectadas em 19% das amostras analisadas.

A ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras analisadas, pode ser devido a presença da microbiota autóctone, mais especificamente as bactérias lácticas,

que têm a capacidade de restringir o crescimento de microrganismos patogênicos por competição e ou produção de moléculas antagônicas, conforme relatados por vários pesquisadores (CARVALHO, 2007; JONES *et al.*, 2008).

3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

3.2.2. Perfil cromatográfico de queijo de coalho contaminados com amins biogênicas

A figura 3 mostra o perfil cromatográfico dos padrões analíticos de amins biogênicas após reação de derivatização com o reagente cloreto de dansila. O método apresentou separação cromatográfica para 4 padrões analíticos dos 5 testados. Apenas a histamina não apresentou perfil cromatográfico definido. A tiramina apresentou pico no tempo de retenção de 25,3 minutos. A feniletilamina apresentou retenção em 31,5 minutos. A putrescina apresentou pico cromatográfico com tempo de retenção de 32,6 minutos, enquanto a cadaverina apresentou tempo de retenção de 33,6 minutos. Em todas as amostras derivatizadas foi comum o pico do reagente derivatizante em aproximadamente 29,6-29,8 minutos (Figura 3).

Observando os cromatogramas da Figura 4, foi possível observar também a eluição de outros aminoácidos presentes na amostra de queijo de coalho, na faixa de tempo de retenção entre 5 e 24 minutos. Desta forma, pode-se estabelecer 2 principais faixas de tempo de retenção no método cromatográfico estabelecido para determinação de amins biogênicas. Entre 5 a 24 minutos faixa de eluição para aminoácidos e entre 25 a 55 minutos faixa de eluição para amins biogênicas. Vale ressaltar que este desenvolvimento de método foi baseado em alguns métodos cromatográficos já descritos na literatura (mo Dugo e col. 2006; Gomez-Alonso e col. 2007; Redruello e col. 2013) para determinação de amins biogênicas. Os métodos citados utilizavam o UV como detector de análise e como reagente derivatizante o cloreto de dansila ou o dietiletoximetilenomalonato (DEEMM).

As figuras 5 e 6 mostra os perfis cromatográficos de algumas micro-indústrias de laticínios do Estado de Alagoas com os seu perfis de contaminação de amins biogênicas. Observou-se em todas as amostras a presença de tiramina e cadaverina, sendo estas as mais presentes, exceto para a amostra Major Izidoro que não foi detectado presença de cadaverina, porém maior quantidade de tiramina.

Observou-se também um padrão semelhante de produção de queijo de coalho fazendo uso do aquecimento (figuras 5A, 5B, 5C, 6A, 6C), exceto para a amostra Major Izidoro (Figura 8B). Nas amostras que sofreram aquecimento, foi observado ausência de aminoácidos ou quantidade de aminoácidos em pequena intensidade, enquanto que na amostra Major Izidoro, foi possível observar grande a intensa presença de aminoácidos presentes na amostra de soro de queijo de coalho analisada. Durante o aquecimento há a eliminação de grande parte dos aminoácidos presentes nas proteínas do queijo de coalho (aminoácidos da caseína e demais proteínas do leite), o que promoveu um cromatograma mais limpo sem presença de interferentes na faixa de tempo de retenção entre 5 a 24 minutos (mo Dugo e col. 2006; Gomez-Alonso e col. 2007).

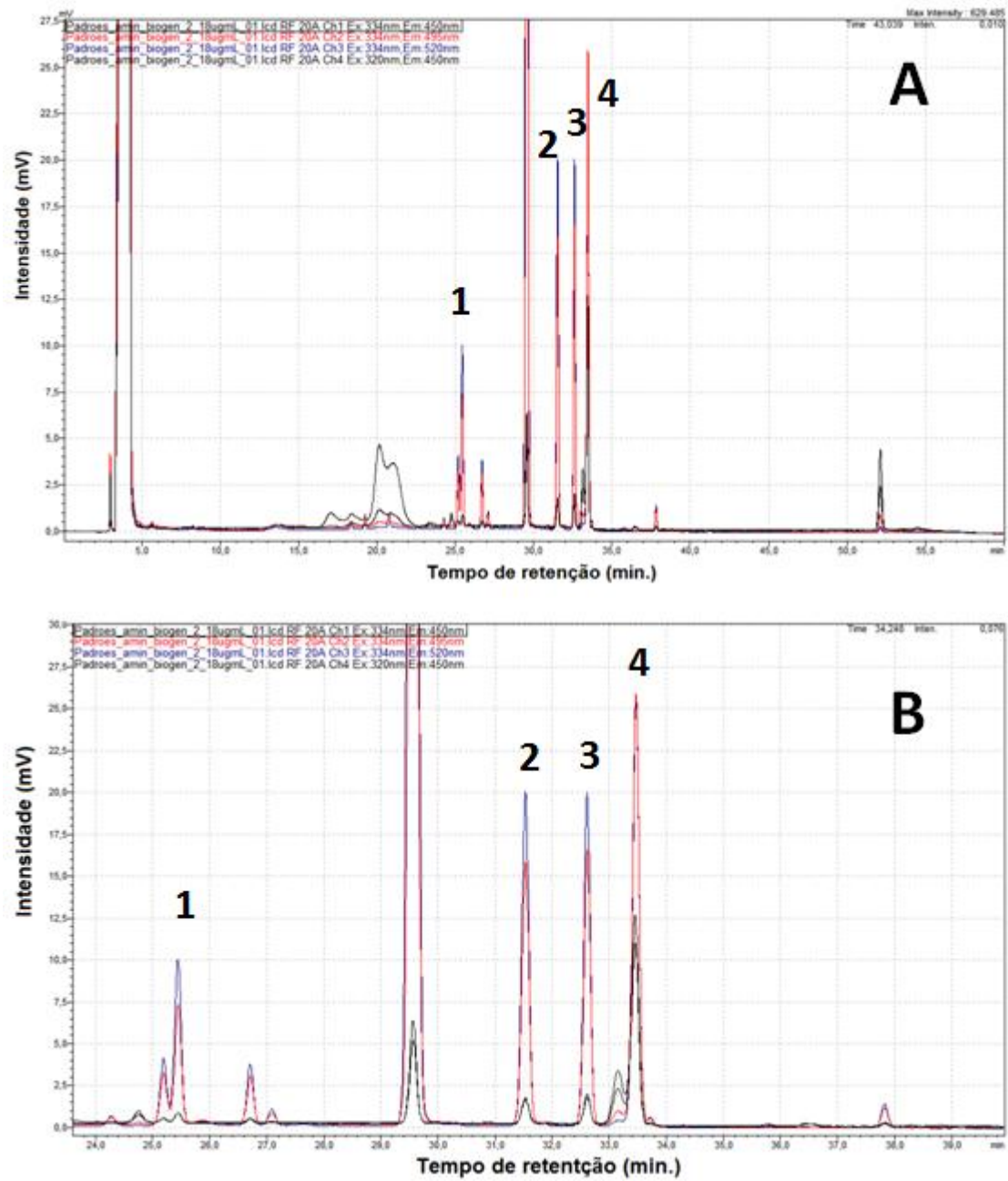


Figura 3 - Perfil cromatográfico dos padrões analíticos do pool de aminas biogênicas. (1) Tiramina, (2) 2 feniletilendiamina, (3) putrescina (4) cadaverina na concentração de 2,18µg/mL.

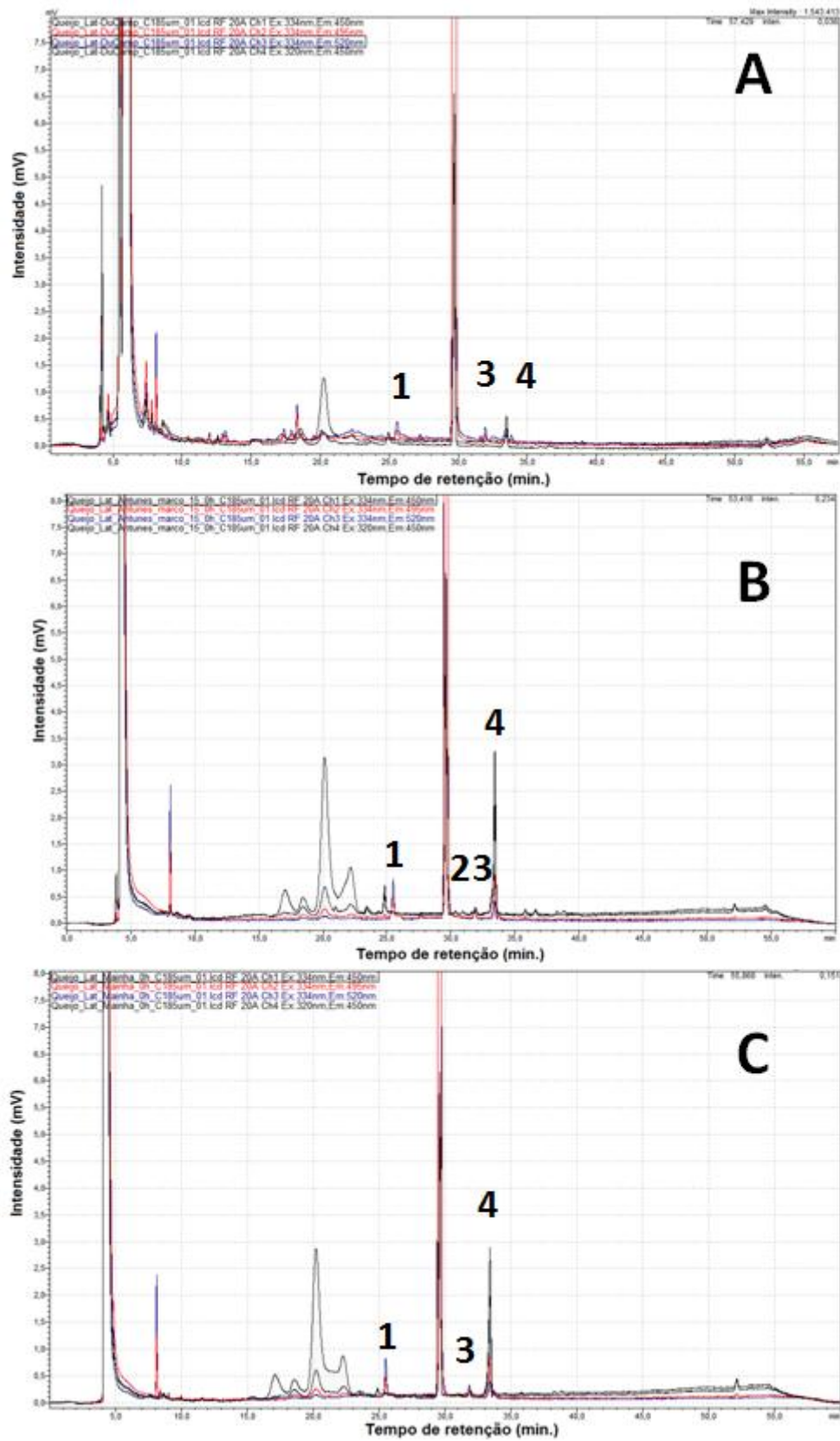


Figura 4 - Perfil cromatográfico dos queijos de coalho produzidos pelas indústrias Lat.16 (A), Lat.9 (B) e Lat.2 (C). Detecção de traços de aminas biogênicas (1) Tiramina, (2) 2-feniletilamina (3) putrescina e (4) cadaverina.

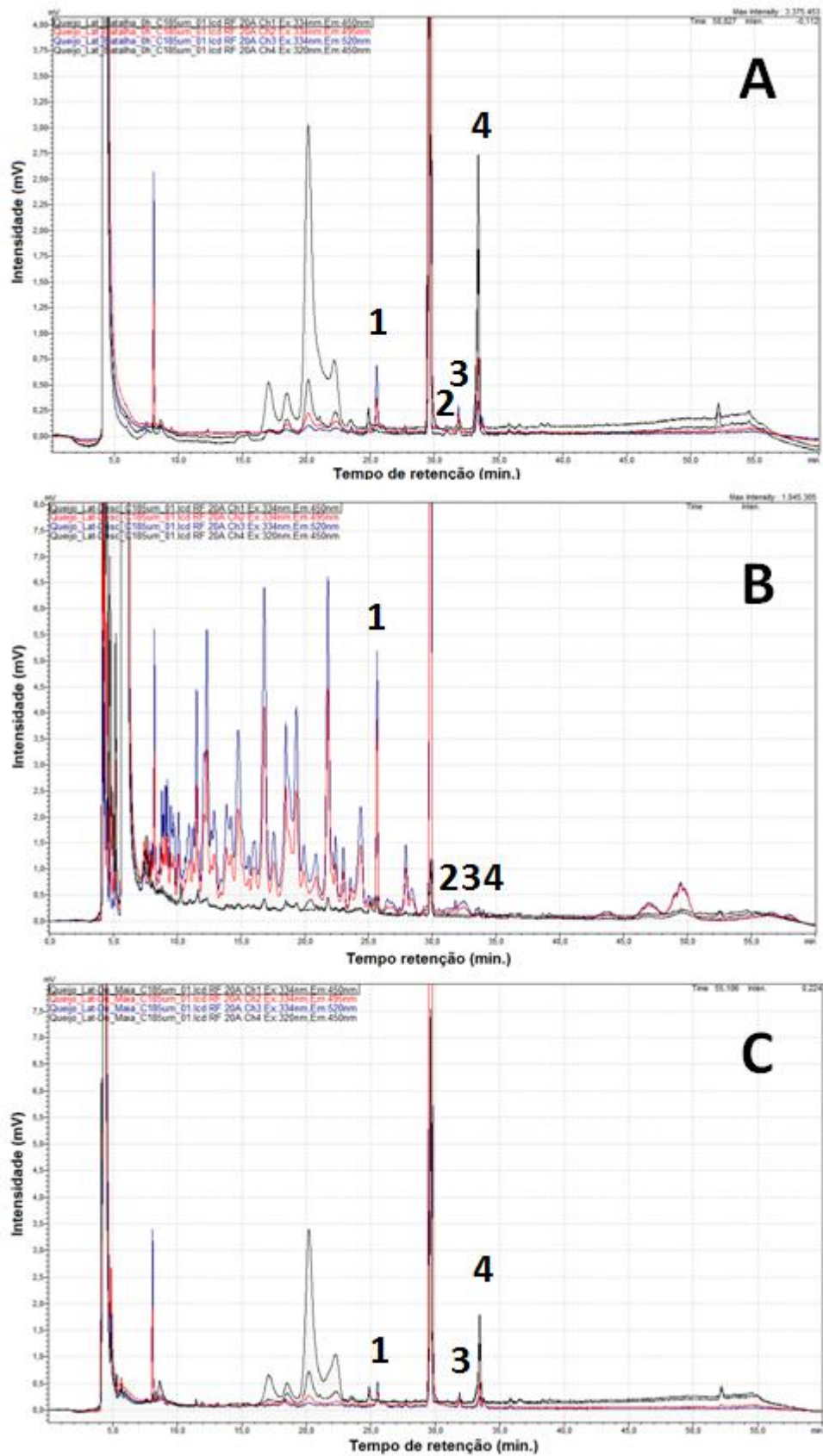


Figura 5 - Perfil cromatográfico dos queijos de coalho produzidos pelas indústrias Lat.15 (A), Lat.4 (B) e Lat.3(C). Detecção de traços de aminas biogênicas (1) Tiramina, (2) feniletilamina (3) putrescina e (4) cadaverina.

Os ensaios cromatográficos de determinação de aminas biogênicas das amostras de queijo de coalho das microindústrias de laticínios do Estado de Alagoas mostraram presença de tiramina, feniletilamina, putrescina e cadaverina, porém as aminas biogênicas mais frequentes foram tiramina e cadaverina. A amostra de queijo de coalho Lat.7 mostrou alta concentração de tiramina e maior que 2,18 $\mu\text{g/mL}$. Presença de cadaverina também foi detectado nas amostras de queijo de coalho dos laticínios Lat.12, Lat.1, Lat.2, Lat.3, Lat.10, Lat.15, Lat.16, bem como nos demais, porém estes foram mais pronunciados porém menores que 0,100 $\mu\text{g/mL}$ quando analisadas no detector de fluorescência com comprimentos de excitação e emissão de 320 e 450nm, respectivamente. Usando detector de fluorescência e comprimentos de excitação e emissão de 334 e 450 nm, foi possível observar presença de tiramina para os laticínios: Lat.14, Lat.5, Lat.4 e presença de cadaverina para os laticínios: Lat.1, Lat.2, Lat.9 e Lat.15 (Tabelas 3). Usando detector de fluorescência com comprimentos de excitação e emissão de 334nm e 495 nm, respectivamente, foi possível verificar a presença de tiramina em concentrações inferiores a 1,10 $\mu\text{g/mL}$ para os laticínios: Lat.1, Lat.4, Lat.7 (Tabelas 4). A detecção em 334nm de excitação e 520nm de emissão foi possível verificar que os laticínios Lat.13, Lat.15, Lat.10, Lat.8, Lat.3, Lat.1, Lat.7 e Lat.4 não ultrapassaram os limites de 0,100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabelas 5).

Dentre os sistemas de detecção por fluorescência, os sistema de excitação e emissão 334nm/495 nm vem mostrando-se mais sensível para avaliar a amina biogênica tiramina, enquanto que os sistemas de excitação e emissão 320nm/450nm e 334/450nm foram mais sensíveis para detectar a presença de putrescina e cadaverina. Os estudos com determinação de aminas biogênicas ainda estão sendo padronizados. O volume amostral de soro de queijo de coalho ainda está sendo padronizado, pois quando se utilizou 200 μL como volume amostral, apenas cadaverina foi detectada. Faz-se necessário realizar um novo estudo com variação do volume amostral até 2000 μL , porém esta técnica necessita ser covalidada com estudos microbiológicos.

Os dados das tabelas 3-6 apresentaram valores de um estudo semi quantitativo quanto a presença pontual de determinadas aminas biogênicas (tiramina, 2-feniletilamina, putrescina e cadaverina), porém realizamos um estudo exploratório com todos os picos cromatográficos entre 25 e 55 minutos, pois além dos 4 marcadores de aminas biogênicas já citados, houve presença de outros pico cromatográficos que pode sugerir presença de outras aminas biogênicas importante como espermina e spermidina. Dados da literatura mostram que estas 2 aminas biogênicas eluem em tempos de retenção superior a cadaverina.

Tabela 2 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas em amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 320 nm e emissão 450 nm

Concentração (µg/mL)	Área / Ex 320 Em 450			
	Tiramina	2-feniletilamina	Putrescina	Cadaverina
Padrao 2,180	4720	13269	13417	120916
Padrao 1,100	3889	9819	10694	198681
Padrao 0,440	2220	6623	3010	206899
Padrao 0,100	-	1644	-	56413
Padrao 0,058	-	1411	-	41760
Lat.16 T 0 horas	-	-	-	6608
Lat.16 T18 horas	-	-	-	22520
Lat.15	-	1220	-	34197
Lat.14	-	-	-	11123
Lat.3	1846	-	-	-
Lat.12	-	-	-	1222
Lat.9	-	1191	5283	16729
Lat.10	-	1398	-	36274
Lat.11	-	-	-	15083
Lat.6	-	-	-	1401
Lat.8	-	-	2535	11131
Lat.3	-	-	-	20609
Lat.2	-	1121	-	32521
Lat.1	-	-	-	15965
Lat.4 T18h	2847	-	-	-
Lat.4	2375	-	1282	1562
Lat.7	7234	-	11069	8853

Tabela 3 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas nas amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 334 nm e emissão 450 nm

Concentração (µg/mL)	Área / Ex 334 Em 450			
	Tiramina	2-feniletilamina	Putrescina	Cadaverina
Padrao 2,180	5265	14638	15877	104581
Padrao 1,100	4199	10011	12237	161714
Padrao 0,440	2001	5753	3640	165609
Padrao 0,100	-	-	-	101461
Padrao 0,058	-	-	-	42887
Lat.16 T 0 horas	-	-	-	4117
Lat.16 T18 horas	-	-	-	15676
Lat.15	-	-	-	23006
Lat.14	4715	-	-	7478
Lat.3	2070	-	-	-
Lat.12	8065	-	-	-
Lat.9	-	-	3397	11139
Lat.10	-	-	-	24365
Lat.11	-	-	-	9841
Lat.6	2253	-	-	-
Lat.8				
Lat.3	-	-	-	14329
Lat.2	-	-	-	22067
Lat.1	-	-	-	10438
Lat.4 T18h	3160	-	-	-
Lat.4	3118	-	-	1136
Lat.7	-	1340	3786	6812

Tabela 4 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas nas amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 334 nm e emissão 495 nm

Concentração (µg/mL)	Área / Ex 334 Em 495			
	Tiramina	2-feniletilamina	Putrescina	Cadaverina
Padrao 2,180	60015	138227	135053	225304
Padrao 1,100	38395	74396	105649	223847
Padrao 0,440	15171	30505	27706	164178
Padrao 0,100	3684	2804	5554	91664
Padrao 0,058	3648	3998	3066	33490
Lat.16 T 0 horas	2303	1321	-	1333
Lat.16 T18 horas	2982	1615	-	6132
Lat.15	2868	1476	-	-
Lat.14	1732	-	-	2852
Lat.3	5682	-	-	-
Lat.12	1330	-	-	-
Lat.9	1731	1645	-	4478
Lat.10	3682	1441	-	8536
Lat.11	1376	-	-	3612
Lat.6	1073	1080	-	-
Lat.8	2756	4367	1292	2913
Lat.3	2354	1419	-	5304
Lat.2	3442	1433	-	8394
Lat.1	8307	1925	-	4504
Lat.4 T18h	39054	3240	-	-
Lat.4	31619	1753	1733	4664
Lat.7	8065	-	-	-

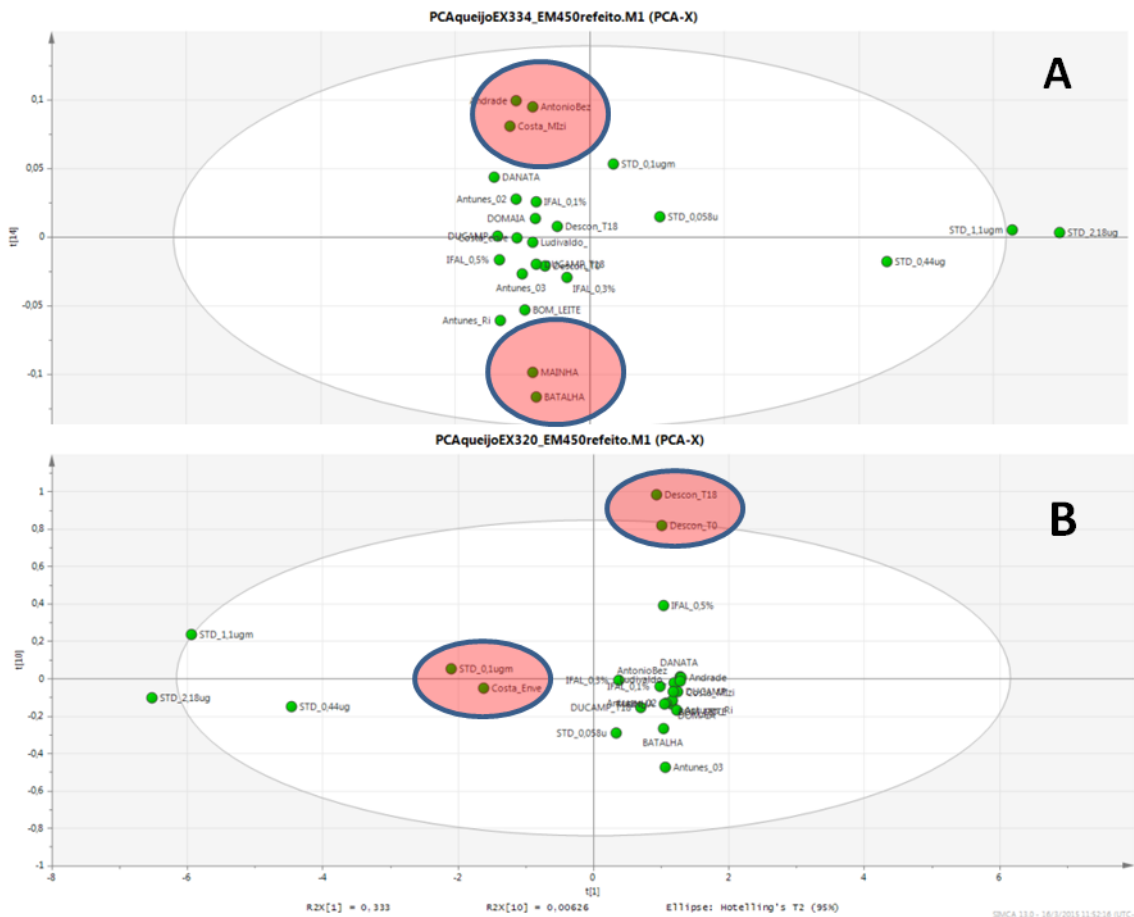
Tabela 5 – Determinação das áreas cromatográficas de aminas biogênicas nas amostras comerciais de queijo de coalho nos comprimentos de excitação 334 nm e emissão 520 nm

Concentração (µg/mL)	Área / Ex 334 Em 520			
	Tiramina	2-feniletilamina	Putrescina	Cadaverina
Padrao 2,180	83984	174887	163647	217220
Padrao 1,100	54735	93711	127578	185518
Padrao 0,440	22896	38138	32996	105304
Padrao 0,100	7446	3393	6385	49738
Padrao 0,058	6725	4719	3534	18941
Lat.16 T 0 horas	3974	2075	-	-
Lat.16 T18 horas	5620	2347	2767	2059
Lat.15	6172	2260	2260	3879
Lat.14	2887	-	1503	1518
Lat.3	8051	-	-	-
Lat.12	2067	-	1256	1010
Lat.9	4708	2410	-	2371
Lat.10	7818	2138	-	3350
Lat.11	2383	-	1571	1511
Lat.6	2200	-	1559	-
Lat.8	6033	6159	2130	1347
Lat.3	5805	2323	2407	1887
Lat.2	6913	1966	3578	1314
Lat.1	12855	1099	-	2068
Lat.4 T18h	53724	3839	-	1097
Lat.4	42488	1851	1832	7496
Lat.7	11499	2273	1160	-

3.2.3 - Análise do Componente Principal (PCA) de queijos de coalho contaminados com aminas biogênicas

Apesar da quantidade de aminas biogênicas serem menores que 1,10 µg/mL (1,1 ppm), as mesmas em grandes quantidade e diversidade pode levar a intoxicação de consumidores de queijo de coalho da região. Então utilizou-se a estatística multivariada de Análise do componente principal para avaliar a presença de outras aminas biogênicas e quais os laticínios que se destacam entre eles. Os pares de dados de tempo de retenção e área (tempo;área) no intervalo entre 25 e 55 minutos foram tabulados para todos os laticínios incluindo os padrões para avaliar quais laticínios apresentam-se como outliers no nível de significância de 95% usando o modelo elipsoidal do gráfico de PCA.

Os dados do gráfico de PCA mostram que grande parte dos queijos de coalho analisados apresentaram-se dentro da região central quando analisados os componentes t1 x t4, t1 x t10, t1 x t12 e t1 x t14, de um total de 15 componentes analisados. Os componentes t4, t7, t10 e t 14 foram os que mais se destacaram. Apenas o queijo de coalho que realizamos o envelhecimento forçado apresentou-se como outlier no gráfico PCA. Porém outros laticínios mostraram-se dentro de intervalo elipsoidal com nível de significância de 95% porém muito próximo da região de outlier, sendo eles Andrade, Antoni Bezerra, Costa, Mainha e Batalha. Os demais mostraram-se na região central e dentro dos limites do gráfico elipsoidal. Os dados do gráfico de PCA mostram que também é possível fazer um estudo investigatório de quais laticínios podem apresentar presença de outras aminas biogênicas sendo potenciais contaminantes de queijo de coalho.



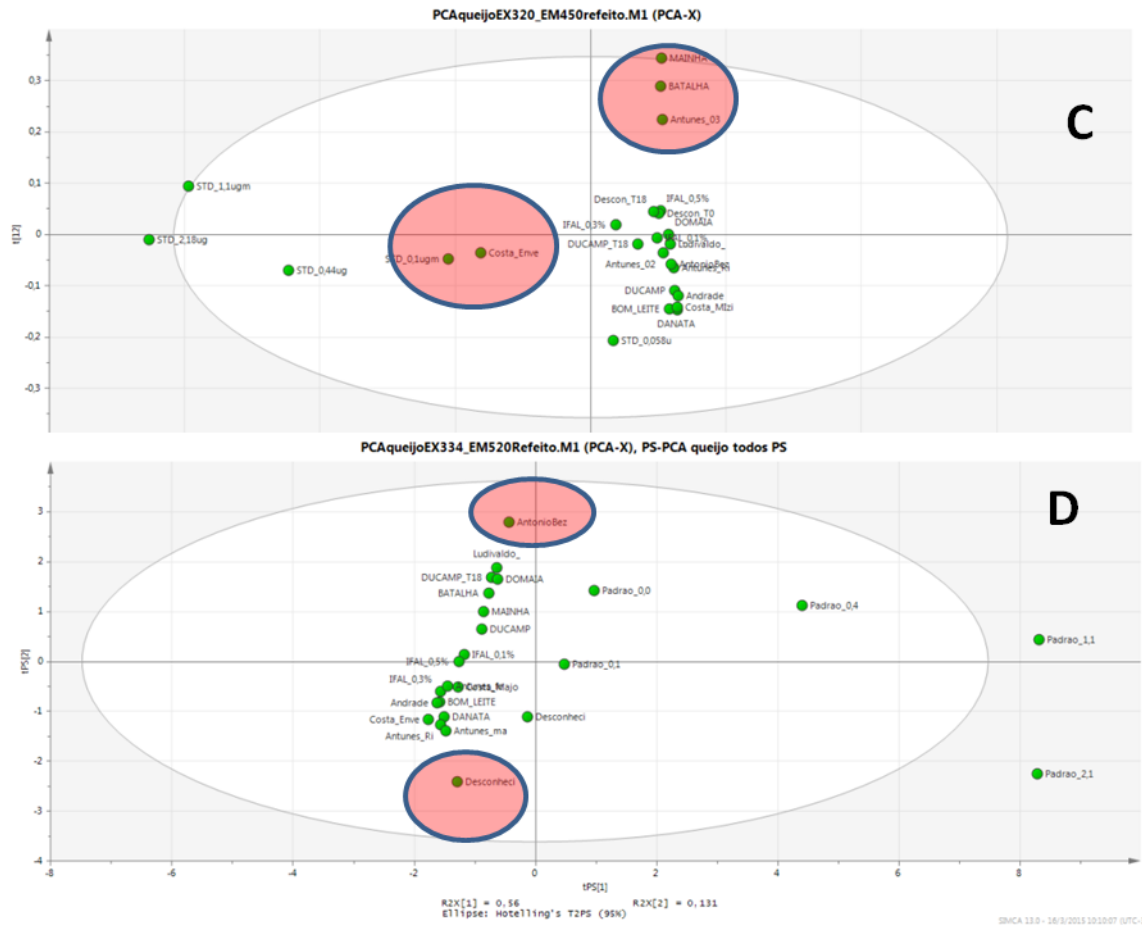


Figura 9 - Análise do Componente Principal (PCA) para queijos coalhos comerciais de Alagoas. Dados de intensidades de respostas (áreas) obtidas por UPLC-Fluorescência em (A) Ex 320-Em450 (t1 x t14), (B) EX 334-Em450 (t1 x t10), (C) EX 334-Em495 (t1 x t12) e 9D) Ex 334-Em520 (t1 x t2).

CONCLUSÃO

Os resultados cromatográficos demonstraram a presença de aminas biogênicas nos queijos do tipo coalho fabricados em laticínios do estado de Alagoas, demonstrando baixos níveis de aminas biogênicas, porém há uma preocupação com a segurança desses alimentos para a saúde humana.

Os métodos cromatográficos utilizados foram considerados eficazes para a determinação das aminas biogênicas nos queijos analisados.

Resultados microbiológicos demonstraram a presença de contaminantes microbiológicos como *S. aureus* e *E. coli* em algumas amostras de queijo de coalho analisados, e os resultados sugerem possível relação com as aminas biogênicas das amostras estudadas.

As boas práticas de fabricação, o controle higiênico sanitária em todas as etapas de produção, a capacitação dos manipuladores e um controle de qualidade adequado, são medidas que podem minimizar a formação de aminas biogênicas nos queijos do tipo coalho, tão consumidos no estado de Alagoas.

REFERÊNCIAS

ADELA ABELLÁN, JOSÉ MARÍA CAYUELA, ANTONIO PINO, ADELA MARTÍNEZ-CACHÁ, EVA SALAZAR AND LUIS TEJADA, Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. **Journal of Science of Food and Agriculture**, V. 92, n. 8, p. 1657–1664, 2012.

BASTOS, E. M. A. F. *et al.* Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 63, n. 5, p.1255- 1259, 201.

BEGOÑA REDRUELLO, *et. al.*, A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent, **Food Chemistry** 139 (2013) 1029–1035.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S. Características microbiológicas, de armazenamento e de embalagens de queijos tipo “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza, CE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 95, p. 44-47, 2002.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E.A.T; BORGES, M.F.; SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n.2, p. 209-430, jul./dez. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. **Dispõe Sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos**. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2001b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo de coalho**. Diário oficial da União. Brasília, 16 de julho de 2001.

BRUNO, L. M.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; CARVALHO, J.D.G.; ANDRADE, A.A. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais e industrializados comercializados em

Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, 2005.

CABRAL, I. S. R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, Piracicaba, vol.32, n.6, p. 1523-1527, 2009.

CARVALHO, J. D. G. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. 2007. 154f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) **Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza.

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.

DADÁKOVÁ E. *et al.*, Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chem**. 2009; 116: 365-70.

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.

FERNANDES JUNIOR, A. *et al.* Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, 2006.

G. MO DUGO, F. VILASI, G.L. LA TORRE, T.M. PELLICANO, Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines, **Food Chemistry** 95 (2006) 672–676.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMONSARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 5, n. 2, p. 70-76, 1994.

INNOCENTE N, D'AGOSTIN P. **Formation of biogenic amines in typical semi hard Italian cheese**. J Food Prot. 2002; 65:1498-01.

JONES, R.J.; HUSSEIN, H.M.; ZAGOREC, M.; BRIGHWELL, G.; TAGG, J.R. Isolation of lactic bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organism associated with fresh meat. **Food Microbiology**. v.25, p.392-399, 2008.

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.

LAZARINI, C. Estabilização de iogurte e bebida láctea fermentada. **Leite e derivados**. Ano XVIII, n. 111, mar-abr, 2009.

ORSI, R. O. *et al.* Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, Botucatu, vol. 11, n. 2, p. 109-116, 2005.

PATRICIA COMBARROS-FUERTE, DOMINGO FERNÁNDEZ, RICARDO ARENAS, ISABEL DIEZHANDINO, MARIA EUGENIA TORNADIJO AND JOSÉ MARÍA FRESNO, Biogenic amines in Zamorano cheese: factors involved in their accumulation. **Journal of Science of Food and Agriculture**, 11 FEB 2015 DOI:10.1002/jsfa.7093.

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.

RENATA GK LEUSCHNER*, RIMA KURIHARA AND WALTER P HAMMES, Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. **Journal of Science of Food and Agriculture**, V.79, n. 8, p. 1141-1144, 1999.

RUIYANG ZHANG, WEIYUN ZHU, WEN ZHUJIANXIN LIU AND SHENGYONG MAO, Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. **Journal of Science of Food and Agriculture**, V. 94, n. 9, p. 1886-1895, 2014.

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.

SERGIO GOÑ MEZ-ALONSO, et. al., Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples, **J. Agric. Food Chem.** **2007**, 55, 608-613.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian Propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 431, 2006.

SONIA NOVELLA-RODRÍGUEZ, M. TERESA VECIANA-NOGUÉS, AND M. CARMEN VIDAL-CAROU, biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 48, n. 11, p. 5117-5123, 2000.

SONIA NOVELLA-RODRÍGUEZ, M. TERESA VECIANA-NOGUÉS, AND M. CARMEN VIDAL-CAROU, EFFECT OF HIGH HIDROSTAIC PRESSURE ON BIOGENIC AMINES CONTENT IN GOAT CHEESE DURING RIPENING. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 50, n. 25, p. 7288-7292, 2002.

YAUHEN BANDARUK, RIE MUKAI, TOMOYUKI KAWAMURA, HISAO NEMOTO, AND JUNJI TERAU, Evaluation of the inhibitory effects of quercetin-related flavonoids and tea catechins on the monoamine oxidase-a reaction in mouse brain mitochondria. **J. agric. food chem.**, 60 (41), p. 10270–10277, 2012.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. S. A., NASSU, R.T., RODRIGUES, M.C.P., SILVA, G.J.F., FERNANDES R.L.A., SILVA A.C. Desenvolvimento da terminologia descritiva de queijo de coalho, **Rev Inst Lat Candido Tostes**. 2006; 61(351): 314-7.

ÁVILA, C.R.; GALLO, C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado queijo tipo “minas frescal” comercializados no município de Piracicaba, SP. **Sci. Agric.**, v.53, p.159-163, 1996.

BARDÓCZ S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci Technol**. 1995; 6(10):341-6.

BOVER-CID, S. Identificación de variables y medidas de control de la acumulación de Aminas Biogenas en productos carnicos fermentados. Barcelona, 1999. **Universidad de Barcelona**. Disponível em:<http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_TECNOLOGICAS/TECNOLOGIA_DE_LOS_ALIMENTOS/ALIMENTOS_PROTEINICOS/3>.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E.A.T; BORGES, M.F.; SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n.2, p. 209-430, jul./dez. 2003.

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.

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.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. **Dispõe Sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos**. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2001b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo de coalho**. Diário oficial da União. Brasília, 16 de julho de 2001a.

BRINK B, TEN D, JOOSTEN HMLJ AND HUIS IV. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int J Food Microbiol.** 1990;11:73-84.

CABEZAS, L.; SÁNCHEZ, I.; POVEDA, J.M.; SESENA, S.; PALOPP, M.L.L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artesanal manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, v.18, p.11-17. 2007.

CABEZAS, L.; SÁNCHEZ, I.; POVEDA, J.M.; SESENA, S.; PALOPP, M.L.L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artesanal manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, v.18, p.11-17. 2007.

CARMO FBT, MÁRSICO ET, SÃO CLEMENTE SC, CARMO RP, FREITAS MQ. Histamina em conservas de sardinha. **Ci Anim Bras.** 2010;11(1):174-80.

CATAO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. Pesquisa de *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Cienc. Technol. Aliment.**, v.21, p.281-287, 2001.

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Isolamento de bactérias lácticas de leite cru da Região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 106-109, 2003.

CAVALCANTE, J.F.M.; ANDRADE, N.J.; FURTADO, M.M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Cienc. Technol. Aliment.**, v.27, p.205-214, 2007.

CERRI, C. **Artesãos do futuro**. Globo Rural, Ed. Globo, n. 200, p. 36-49, junho 2002.

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.

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.

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.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 305, n. 53, p. 29-49, 1998.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.22, p.263-271, 2002.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.22, p.263-271, 2002.

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.

DADÁKOVÁ E, KRÍZEK M, PELIKÁNOVÁ T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chem.** 2009; 116: 365-70.

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.

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.

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, p.297-302, 2005.

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

FEITOSA T., BORGES M.F., NASSU R. T., AZEVEDO EHF, MUNIZ C.R., Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higienico-sanitarios em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Cienc Tecnol Aliment.** 2003; 23(Supl):162

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. suplemento, p. 162-165, dez. 2003.

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.

FOX, P. F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, cap. 5, p. 54-97, 2000.

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.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E.; Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International of Dairy Journal**, Barking, v.7, p. 751-761, 1997.

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.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMONSARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 5, n. 2, p. 70-76, 1994.

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.

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.

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.

INNOCENTE N, D'AGOSTIN P. Formation of biogenic amines in typical semi hard Italian cheese. **J Food Prot**. 2002; 65:1498-01.

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.

JOOSTEN HMLG. The biogenic amine contents of dutch cheese and their toxicological significance. **Neth Milk Dairy J**. 1988;42(1) 25-42.

KALÁČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: a review. **Meat Science**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 1-11, 2006.

KOMPRDA T, SMĚLÁ D, PECHOVÁ P, KALHOTKA L, ŠTENCL J. KLEJDUS B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. **Meat Science** 2004; 67(4): 607-16.

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.

LAPA-GUIMÃRES, J. Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado. Campinas, 2005. Tese (Doutorado) - **Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**.

LATORRE-MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S.; AYMERICH, T.; MARCOS, B.; VIDAL-CAROU, M. C.; GARRIGA, M. Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. **Meat Science**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 460-469, 2007.

LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

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.

MANDACARU. Queijo de coalho Mandacaru. **Disponível em <<http://www.queijodecoalho.com.br>**, acesso em: 28/04/2015.

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.

MENDES, E. S. ; MENDES, P.P.; COELHO, M.I.S.; SOUZA, J.C.R.; CRUZ, M.C.S.; MOREIRA, R.T. Avaliação sensorial de queijos de coalho elaborados com diferentes técnicas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p.59-65, set. 2002.

MORET SE, CONTE L. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. Ananalysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **J. Chromatogr**. 1996;729:363-69.

NASCIMENTO, I.R., SILVA, E.S., FELIX, F.F. Estudo das condições de abastecimento de comercialização das características físico-químicas do queijo de coalho comercializado em Aracaju (SE). **Rev Inst Lat Candido Tostes**. 2002; 57: 250-4.

NASSU, R.T.; LIMA, J.R; BASTOS, M.S.R.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Revista Higiene alimentar**, São Paulo, v.15, n.89, p.28-36, out. 2001

ONAL A, A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chem**. 2007; 103: 1475–86.

PARENTE, E.; MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; GRIECO, S.; CRUDELE, M. A.; SUZZI, G. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 882-891, 2001.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. Review. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 831-844. jun./set., 2005.

PEREZ, R. M. Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo coalho comercializado no município de Campinas, SP. 2005. 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. **Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo.

PEREZ, R.M., BOHITO, W.H. Propriedades funcionais e composição de queijos de coalho comerciais. **Rev Inst Lat Candido Tostes**. 2008;1:1-9.

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.

PERRY KSP. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova**. 2004; 27(2): 293-300.

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.

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.

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.

ROIG-SAGUES AX, MOLINA AP AND HERNANDES-HERRERO MM. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **Eur Food Res Technol**. 2002; 215: 96–100.

Russel FE, Maretic Z. Scombroid Poisoning: mini review case histories. **Toxicon**. 1986. 24(10): 967-73.

SANCHES-CASCADO, S. P. Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. España, 2005. Tese (Doutorado) - **Universitat de Barcelona** - UB.

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.

SHALABY AR. Multidetecção semi quantitativa method for determining biogenic amines in foods. **Food Chem.**1995;52:367-72.

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

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

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.

STANDARA S, VESELA ME, DRDAK M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. **Nahrung.** 2000;44:28-31.

STRATTON JE, HUTKINS RW AND TAYLOR SL. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A review. **J Food Prot.** 1991; 54:460-70.

TAYLOR SL. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Crit Rev Toxicol.**1986;17:91-128.

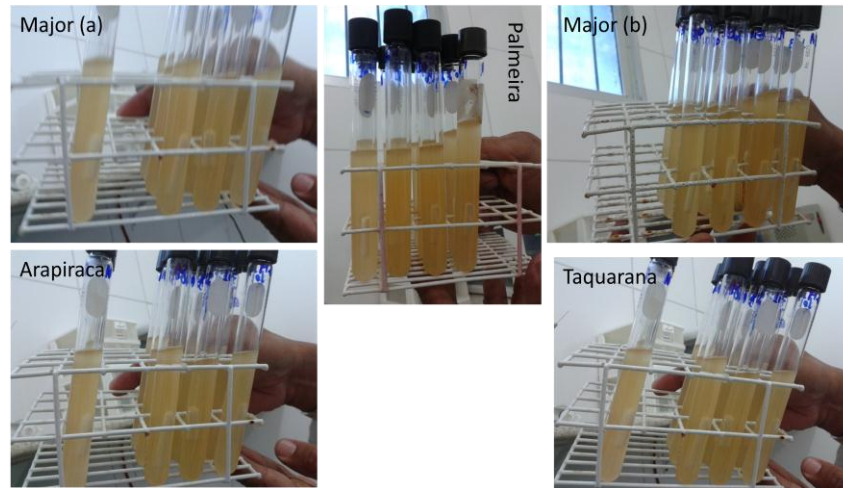
TESHIMA, E., VIANA A.C., ASSIS, M.M.S., FIGUEIREDO, H.M. Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho Comercializado em Feira de Santana. **Rev Inst Lat Candido Tostes.** 2004; 59 (339): 194-8.

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.

APÊNDICES

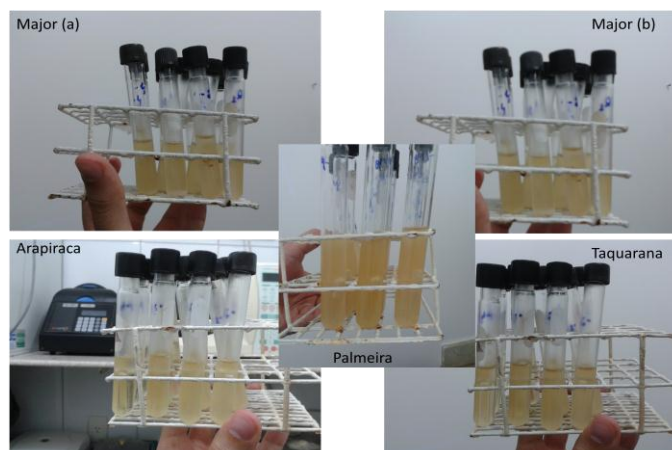
APÊNCICE A: Análise microbiológica dos queijos fortificados de cinco laticínios de Alagoas.

- Coliformes a 30°C – 100% das amostras positivas com fermentação da lactose e formação de bolhas de gás.



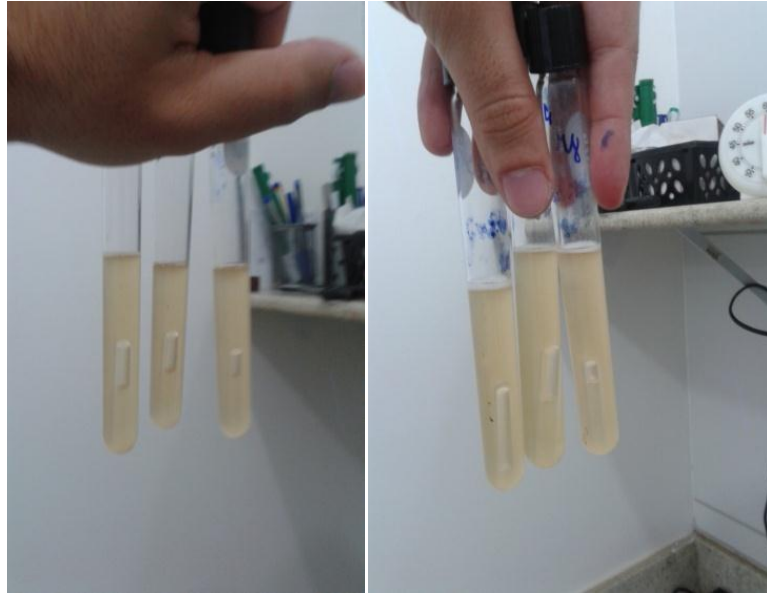
Fonte: Victor Vasconcelos

- Caldo EC após incubado a 45C



Fonte: Victor Vasconcelos

- Caldo EC após incubado a 45C – formação de bolhas de gás indicando Coliformes a 45°C.



Fonte: Victor Vasconcelos

- Amostra (d) em meio BHI coagulada indicando *Staphylococcus coagulase positiva*.



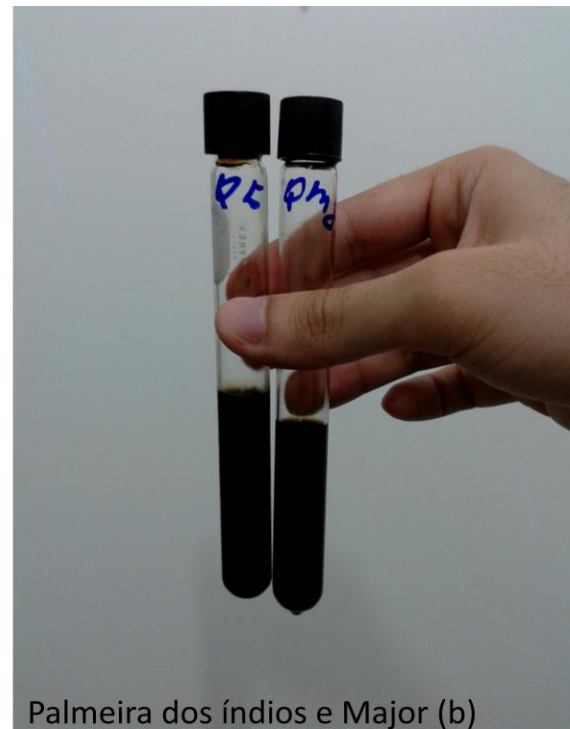
Fonte: Victor Vasconcelos

- caldo Fraser após incubado a 30°C por 24h. Amostras (d) e (e)



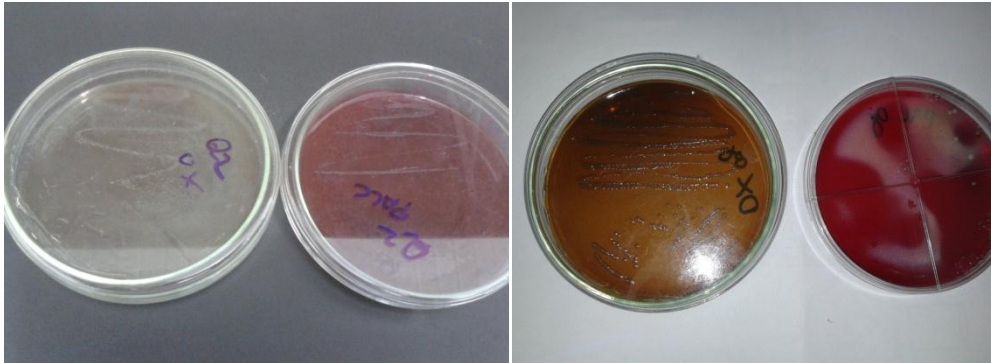
Fonte: Victor Vasconcelos

- caldo Fraser após incubado a 30°C por 24h



Fonte: Victor Vasconcelos

- Placas com Agar Oxford e Agar Palcam repicadas do caldo fraser e incubado a 30°C por 24h. Não houve crescimento de colônias típicas. Amostras de Palm. e Maj.



Fonte: Victor Vasconcelos