



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS POR *LACTOBACILLUS*,
STAPHYLOCOCCUS E *ENTEROCOCCUS* ISOLADOS DE PRODUTOS CÁRNEOS
FERMENTADOS/FUMADOS PORTUGUESES

IRANI MARTINS DE GOUVEIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira Mateus
Alfaia

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

CO-ORIENTADORA

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira
Mateus Alfaia

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS POR *LACTOBACILLUS*,
STAPHYLOCOCCUS E *ENTEROCOCCUS* ISOLADOS DE PRODUTOS CÁRNEOS
FERMENTADOS/FUMADOS PORTUGUESES

IRANI MARTINS DE GOUVEIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira Mateus
Alfaia

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

CO-ORIENTADORA

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira
Mateus Alfaia

2013

LISBOA

Aos meus pais, por serem meu apoio absoluto e por transmitirem aos filhos a verdadeira importância da educação.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho foi subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto “Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality” (PTDC/AGR-ALI/119075/2010).

AGRADECIMENTO

A Deus, pela presença tão constante em minha vida.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria João Fraqueza, pela oportunidade, pela transmissão de conhecimentos, pela disponibilidade, pela atenção e carinho constantes nesta caminhada.

À minha querida co-orientadora, Doutora Cristina Mateus Alfaia pelo apoio, pela dedicação, pelas horas de ensinamentos a mim dedicadas, pelo sorriso sempre sincero ao me ver chegar, por fazer-me sentir segura e mostrar que nada é assim tão difícil que não possa ser feito.

Aos docentes do Mestrado em Segurança Alimentar, pela disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

Aos colegas do mestrado em Segurança Alimentar, pela partilha, pelos momentos alegres e pelo incentivo.

À Zé e a Lena. Não tenho palavras para agradecer tanto carinho, atenção, transmissão de conhecimentos! Foram impecáveis, fizeram-me sentir em casa! Obrigada por tudo!

Às minhas colegas do Laboratório de Tecnologia, Seliza Nancy, Susana Nisa, Marta Nascimento e Ana Rita, pela presença constante, pelos momentos alegres e pelo apoio incondicional quando necessitei de ajuda quando tinha que me ausentar.

À Ana Martins, meu agradecimento especial. Sem ti, não teria conseguido concluir a parte prática. Meu muito obrigado, com todo carinho.

À minha irmã Celma e meu cunhado Zé, pelo apoio incondicional, por me fazerem sentir tão amparada em todos os sentidos aqui em Portugal. Obrigada por tudo.

Ao Fabio, pelo companheirismo, pelo carinho e por estar sempre disponível para ajudar-me mesmo estando atarefado e ocupado com sua própria dissertação de mestrado.

À Filipa e a Lisa pela ajuda indispensável no fim desta caminhada.

À Rede Espaço S.A, em especial ao Sr. José Gago, pela sensibilidade e flexibilidade com os horários de trabalho.

À Genicléia Viana, pela flexibilidade no trabalho, pelo carinho e disposição em ajudar sempre que necessitei.

Avaliação da produção de aminas biogénicas por *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* isolados de produtos cárneos fermentados/fumados Portugueses

RESUMO

Os enchidos fermentados/fumados, em geral, são produtos de elevado consumo em Portugal. Tal como a maioria dos produtos ricos em proteína e compostos azotados, apesar de serem produtos de baixo risco toxicológico, poderão em determinadas condições, representar algum perigo se durante o seu processamento forem introduzidas ou formadas substâncias indesejáveis. Nos alimentos, as aminas biogénicas (AB) são principalmente produzidas por descarboxilação microbiana dos seus aminoácidos precursores, com excepção das poliaminas fisiológicas. O tipo e quantidade de AB presentes dependem de vários fatores, como por exemplo das estirpes microbianas, do efeito de culturas iniciadoras, da concentração em aminoácidos livres, e das condições ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade descarboxilativa de 41 estirpes de bactérias fermentativas, incluindo bactérias ácido lácticas, *Enterococcus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa, a fim de caracterizar e selecionar as estirpes mais adequadas como culturas iniciadoras. Estas estirpes foram previamente isoladas de produtos tradicionais Portugueses fermentados/fumados, identificadas por PCR e caracterizadas de acordo com as suas propriedades tecnológicas. As AB foram analisadas por RP-HPLC/UV, após incubação das estirpes em caldo enriquecido com aminoácidos (tirosina, histidina, ornitina, fenilalanina, triptofano e lisina). Os dados revelaram que o potencial aminogénico do género *Enterococcus* não foi dependente da espécie apresentando valores elevados de tiramina e teores consideráveis de 2-feniletilamina. Entre os *Lactobacillus*, a produção de tiramina foi principalmente relacionada com *L. curvatus*. Algumas estirpes de *Lactobacillus* produziram também putrescina e triptamina em quantidades vestigiais. Em contraste, espécies de *Staphylococcus*, como *S. xilosus*, *S. equorum* e *S. carnosus*, não mostraram qualquer atividade descarboxilativa. Em resumo, *L. plantarum*, *L. sakei* e *Staphylococcus* isolados de produtos cárneos Portugueses parecem ser não produtores de AB, sem potencial risco toxicológico, e portanto, com aptidão para serem utilizadas como bactérias iniciadoras de fermentação em produtos cárneos, sem efeitos prejudiciais para a sua qualidade e segurança.

Palavras-chaves: produtos cárneos fermentados, estirpes bacterianas, aminas biogénicas, culturas iniciadoras.

Evaluation of biogenic amines production by *Lactobacillus*, *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolated from Portuguese fermented/smoked meat products

ABSTRACT

The fermented and smoked sausages, in general, are meat products widely consumed in Portugal and like most of protein-rich products and nitrogen compounds, although they are inherently products of low toxicological risk, in certain circumstances may be hazardous, especially, if during processing are introduced or formed undesirable substances. With the exception of physiological polyamines, biogenic amines (BA) are mainly produced by microbial decarboxylation of their amino acids precursors in foods. The type and amount of BAs depend on several factors, such as of microbial strains, the effect of starter cultures, concentration of free amino acids, and environmental conditions. The aim of this study was to evaluate the decarboxylase activity from 41 fermentative bacterial strains, including lactic acid bacteria (LAB) and coagulase-negative *Staphylococci*, in order to characterize and select the strains most suitable for use as starter cultures. These strains were previously isolated from traditional Portuguese fermented/smoked meat products, identified by PCR-amplification and characterized according to their technological properties. BAs were analysed by RP-HPLC/UV after incubation of the tested strains in decarboxylase synthetic broth enriched with amino acids (histidine, tyrosine, ornithine, phenylalanine, tryptophan and lysine). The data highlights that aminogenic potential for *Enterococcus* was not species-dependent with high values for tyramine and considerable levels of 2-phenylethylamine. Among *Lactobacilli*, the production of tyramine was mainly related to the species of *L. curvatus*. A few strains of *Lactobacilli* also produced putrescine and tryptamine in residual quantities. In contrast, *Staphylococcus* species such as *S. xilosus*, *S. equorum* and *S. carnosus* showed no decarboxylase activity. In summary, *L. plantarum*, *L. sakei* and staphylococci isolates from Portuguese products seems not to be producers of hazardous biogenic amines and, therefore, suitable for use as a fermentation starter in meat products without harmful effects on their quality and safety.

Keywords: fermented meat products, bacterial strains, biogenic amines; *starters*.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Aminas biogénicas	3
2.1.1 Estrutura e classificação das aminas biogénicas	3
2.1.2 Formação das aminas biogénicas	4
2.1.2.1 Fatores que influenciam a formação de aminas biogénicas	7
2.2 Aminas biogénicas nos alimentos	7
2.3 Microrganismos produtores de aminas biogénicas em alimentos	9
2.3.1 O papel das bactérias do ácido láctico em produtos cárneos fermentados	11
2.4 Culturas de arranque ou iniciadoras (starter)	13
2.4.1 Caracterização dos microrganismos mais utilizados como culturas de arranque em produtos cárneos fermentados	15
2.4.1.1 <i>Lactobacillus</i>	15
2.4.1.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	16
2.4.1.3 Espécie <i>Staphylococcus xylosus</i>	17
2.4.1.4 Espécie <i>Staphylococcus carnosus</i>	17
2.4.1.5 Espécie <i>Staphylococcus equorum</i>	18
2.4.1.6 Caracterização dos <i>Enterococcus</i>	18
2.4.1.6.1 Espécie <i>Enterococcus faecali</i>	19
2.4.1.6.2 Espécie <i>Enterococcus faecium</i>	19
2.5 Efeito das aminas biogénicas e implicações na Saúde Pública	20
2.5.1 Fisiológicos	20
2.5.2 Toxicológicos	20
2.6 Métodos de determinação de aminas biogénicas	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Origem e identificação das estirpes	24
3.1.1 Origem	24
3.1.2 Identificação genética	24
3.2 Isolados de <i>Lactobacillus</i> e <i>Enterococcus</i> em estudo: avaliação da capacidade descarboxilativa	26
3.3 Isolados de <i>Staphylococcus</i> em estudo: avaliação da capacidade descarboxilativa	31
3.4 Determinação de aminas biogénicas	32
3.4.1 Preparação de soluções	32
3.4.2 Procedimento técnico	33
3.4.3 Cálculos e controlo do método	34

3.4.3.1 Análise qualitativa	36
3.4.3.2 Análise quantitativa	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Validação do método de determinação das aminas biogénicas por HPLC	37
4.1.1 Especificidade	37
4.1.2 Linearidade	39
4.1.3 Limite de deteção e limite de quantificação	43
4.1.4 Precisão	43
4.1.5 Exatidão	46
4.1.6 Análise descritiva	46
4.2 Avaliação da capacidade descarboxilativa das estirpes no meio descarboxilativo sólido (<i>screening medium</i>)	49
4.3 Avaliação da produção de aminas biogénicas por HPLC em estirpes de <i>Lactobacillus</i>, <i>Staphylococcus</i> e <i>Enterococcus</i>	53
5 CONCLUSÕES	56
6 BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Equação geral de descarboxilação catalítica dos aminoácidos (adaptado de Alfaia, 2002).....	5
Figura 2: Formação de aminas biogénicas a partir dos aminoácidos precursores (Adaptado de Alfaia, 2002)	6
Figura 3: Tubos com turbidez após incubação em caldo BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>) (Original)	26
Figura 4: Tubos com caldo MRS (<i>Man, Rugosa and Sharpe</i>) inoculados com as estirpes em estudo apresentando turbidez após incubação (Original)	27
Figura 5: Placas das estirpes em estudo em meio descarboxilativo (<i>screening medium</i>) após incubação com e sem (controlo) aminoácidos (Original)	28
Figura 6: Tubos com caldo descarboxilativo (<i>screening medium</i>) após incubação (Original)	29
Figura 7: <i>Eppendorfs</i> com 2 mL de caldo descarboxilativo submetidos a centrifugação (Original)	29
Figura 8: Adição de 1 mL de HCl 0,1 N ao sobrenadante (Original)	30
Figura 9: Filtração do extrato bacteriano com filtro de 0,45 µm (Original)	30
Figura 10: Placas semeadas em meio Manitol após incubação (Original)	31
Figura 11: Reação de derivatização das aminas biogénicas com cloreto de dansilo (Alfaia, 2002)	33
Figura 12: Cromatograma do branco com solução de padrão interno (PI, 1,7- diaminoheptano) a 100 µg/mL	37
Figura 13: Cromatograma da solução padrão da mistura dos sais das 8 aminas biogénicas a 25 µg/mL com solução de padrão interno a 100 µg/mL	38
Figura 14: Cromatograma da solução padrão de triptamina a 100 µg/mL	38
Figura 15: Cromatograma da análise da amostra (a) e da mesma amostra fortificada com espermidina (b)	39
Figura 16: Curvas padrão das aminas biogénicas em estudo	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura química das aminas biogénicas mais frequentes em alimentos (Fonte: Önal, 2007)	4
Tabela 2: Aminoácidos precursores e respetivas aminas biogénicas formadas (Flick e Granata, 2005; Anderson, 2008; Radosevich, 2007)	5
Tabela 3: Organização taxonómica até às famílias das bactérias ácido lácticas (BAL) de acordo com o “Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea” (TOBA, versão 05.12.09) e com a “List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature” (LPNSN, versão 05.12.09) (Adaptado de Gonçalves, 2009)	12
Tabela 4: Ações fisiológicas/farmacológicas de algumas aminas biogénicas (adaptado de Alfaia, 2002)	21
Tabela 5: Origem e identificação das estirpes estudadas	25
Tabela 6: Gradiente de eluição usado na análise de aminas biogénicas por HPLC	34
Tabela 7: Limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) do método de determinação de aminas biogénicas	43
Tabela 8: Repetibilidade na quantificação das aminas biogénicas na solução padrão da mistura dos 8 sais das aminas biogénicas a 5 µg/mL	44
Tabela 9: Repetibilidade na quantificação das aminas biogénicas numa amostra de extrato bacteriano	44
Tabela 10: Precisão intermédia na quantificação das aminas biogénicas na solução padrão na solução padrão da mistura dos 8 sais das aminas biogénicas a 5 µg/mL	45
Tabela 11: Precisão intermédia na quantificação das aminas biogénicas numa amostra de extrato bacteriano	45
Tabela 12: Taxas de recuperação das aminas biogénicas numa amostra de extrato bacteriano a diferentes concentrações	47
Tabela 13: Caracterização qualitativa e quantitativa das estirpes estudadas	51
Tabela 14: Produção de aminas biogénicas (mg/L) por diferentes estirpes isoladas de produtos cárneos fermentados	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AB - Aminas biogénicas

BAL - Bactérias ácido lácticas

BHI - *Brain Heart Infusion*

CAD - Cadaverina

CE - Comunidade Europeia

EFSA- *European Food Safety Authority*/ Autoridade Europeia em Segurança Alimentar

FDA - *Food and Drug Administration*

HIS - Histamina

HPLC - *High-Performance Liquid Chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência

IAB - Índice de aminas biogénicas

ID - Código de identificação

LD - Limite de deteção

LQ - Limite de quantificação

min - Minuto

n.d. - Não detetado

PCR - *Polymerase chain reaction* / Reação em cadeia da polimerase

PHE - 2-Feniletilamina

PI - Padrão interno

PUT - Putrescina

RP-HPLC - *Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

SPD - Espermidina

SPM - Espermina

TRP - Triptamina

USP - Farmacopeia dos Estados Unidos da América / The United States Pharmacopoeia

UV - Ultraviolet / ultravioleta

A - Área do pico cromatográfico

DnscI - Cloreto de dansilo

g - Grama

HCl - Ácido clorídrico

L - Litro

mg - Miligrama

mg/L - Miligrama por litro

mL - Mililitro

N - Concentração em normalidade

NH₃ - Amónia

nm – Nanómetro

ppm- Partes por milhão

R²- Coeficiente de determinação

r.p.m. - Rotações por minuto

µg/µL - Micrograma por microlitro

µm - Micrómetro

°C - Graus celsius

% - Percentagem

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é uma das práticas mais antigas de produção e conservação de géneros alimentícios utilizadas pelos seres humanos, sendo os alimentos fermentados importantes por promoverem e preservarem nutrientes que enriquecem a dieta humana e por apresentarem uma ampla diversidade de *flavors*, aromas e texturas que conferem características sensoriais particulares ao produto (Steinkraus, 1994). Neste âmbito, a biotecnologia constitui uma ciência importante no desenvolvimento de culturas iniciadoras ou de arranque¹, e intensifica a exploração de microrganismos que possam ser utilizados em alimentos fermentados (Cook, 1994). A procura de alternativas ao uso de compostos químicos nos alimentos tem suscitado um interesse crescente designadamente no que toca aos conservantes.

Os microrganismos e os produtos do seu metabolismo, tais como a microbiota ácido láctica e as bacteriocinas, são um exemplo desta aplicação. O conhecimento da microbiota dos produtos cárneos fermentados Portugueses reveste-se de especial importância pelo facto de poder ser usada em aplicações tecnológicas, permitindo melhorar as características higio-sanitárias destes alimentos, e com fins terapêuticos ou funcionais (Gonçalves, 2009). Diversos microrganismos têm vindo a ser usados com interesse tecnológico, alguns com uma longa história de utilização enquanto outros menos conhecidos, podendo representar um potencial perigo para os consumidores. Torna-se assim fundamental estabelecer uma avaliação formal do perigo relativamente ao seu uso, de modo a poderem ser utilizados com segurança sem prejuízo para a saúde dos consumidores nem desrespeito pelos requisitos legalmente estabelecidos pela *European Food Safety Authority* (EFSA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA). Neste grupo de microrganismos com interesse tecnológico utilizados em produtos cárneos fermentados incluem-se as bactérias do ácido láctico (BAL), consideradas como o principal grupo de bactérias com ação probiótica (Gonçalves, 2009). Muitos destes microrganismos, capazes de desenvolver ação probiótica nos alimentos, podem também produzir aminas biogénicas, substâncias que apesar da sua relevância a nível fisiológico, podem algumas delas provocar reações alérgicas (por exemplo, a histamina e a tiramina) quando presentes em quantidades elevadas em determinados alimentos, como no pescado, queijo, produtos cárneos fermentados e vinho (Gouveia, 2009). Os produtos fermentados e, em particular os produtos cárneos, por ação de microrganismos nativos ou adicionados, são um dos grupos específicos de alimentos onde a presença de aminas biogénicas pode ocorrer em quantidades consideráveis apesar dos valores na literatura apresentarem grandes flutuações (Flores *et al.*, 1996; Kalač *et al.*, 2000; Latorre-Moratalla *et*

¹ Culturas iniciadoras ou de arranque (*starter*) são inóculos de microrganismos selecionados, adicionados durante o processo de fermentação num determinado alimento de modo a fomentar uma atividade e desenvolvimento de microrganismos controlada (Eerola *et al.*, 1996).

al., 2010). De fato, os processos fermentativos ou de maturação, bem como os processos de deterioração, poderão conduzir a uma proteólise, que incrementa a disponibilidade em aminoácidos precursores das aminas biogénicas (García-García *et al.*, 2000). Inclusivamente, concentrações mais elevadas de aminas biogénicas nos produtos cárneos fermentados poderão ser interpretadas como um indicador de que a atividade microbiana já se iniciou (Pötzelberger *et al.*, 1998). Também Pinho *et al.* (2000), referem que mais do que do processo fermentativo, a formação de aminas biogénicas depende das estirpes microbianas responsáveis por essa fermentação, ou ainda da qualidade da matéria-prima e das condições tecnológicas utilizadas. No entanto, a adição de culturas de bactérias ácido lácticas, como *Lactobacillus* e *Staphylococcus*, tem sido sugerida para prevenir a acumulação de aminas por controlo da fermentação natural (Maijala *et al.*, 1995; Kalač *et al.*, 2000). Resumindo, a quantidade e o tipo de aminas biogénicas formadas são muito influenciadas pela microbiota e pelo conjunto de parâmetros que influenciam a multiplicação bacteriana. Todo o conjunto de estudos realizados na área da qualidade e segurança dos alimentos sobre a ocorrência de aminas biogénicas, em matrizes muito diversificadas, não seria possível sem o suporte dos métodos analíticos. Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a quantificação das aminas biogénicas, incluindo a cromatografia. A cromatografia líquida de alta pressão ou de alta eficiência (HPLC) pela sua elevada resolução, sensibilidade e versatilidade é das técnicas cromatográficas cuja utilização é mais frequente (Önal, 2007; Vidal-Carou *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar 41 estirpes de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* quanto ao seu potencial de produção de aminas biogénicas e selecionar apenas as estirpes que apresentaram aptidão para serem utilizadas como cultura iniciadora de fermentação (microrganismos descarboxilase-negativos) em produtos cárneos fermentados e/ou fumados. Estas estirpes foram provenientes de uma coleção do Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária tendo sido previamente isoladas de produtos cárneos fermentados e/ou fumados e do ambiente de produção de indústrias localizadas na região do Alentejo.

A estrutura global da dissertação divide-se em vários capítulos: o primeiro capítulo dedicado à Revisão Bibliográfica, em que se faz uma revisão do assunto temático escolhido; o segundo capítulo refere-se aos Materiais e Métodos em que se apresenta as metodologias analíticas desenvolvidas durante o trabalho experimental que permitem atingir os objetivos propostos; um terceiro capítulo de apresentação dos Resultados e sua Discussão face a estudos publicados na literatura e por último as Conclusões gerais que se retira do estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aminas biogénicas

As aminas biogénicas são compostos orgânicos nitrogenados que se caracterizam por apresentarem um grupo amino e serem de origem biológica. São bases orgânicas de baixo peso molecular que possuem atividade biológica e que podem ser formadas como resultado da atividade metabólica normal nos animais, plantas e microrganismos, sendo geralmente produzidas pela descarboxilação de aminoácidos livres ou por aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas (Vidal-Carou *et al.*, 2009; Stadnik & Dolatowski, 2010).

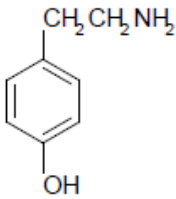
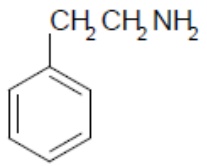
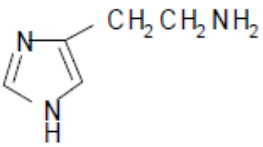
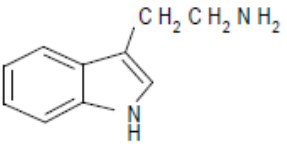

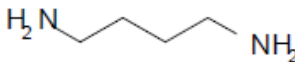
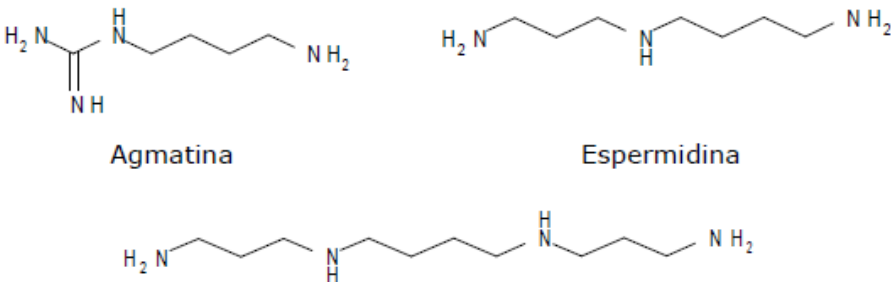
As aminas biogénicas são omnipresentes nas matrizes biológicas e desempenham um papel importante em variados processos metabólicos e fisiológicos, pelo que têm vindo a suscitar um interesse crescente em diversas áreas científicas, tais como, a toxicologia, o controlo da qualidade e a segurança alimentar (Pinho *et al.*, 2000).

2.1.1 Estrutura e classificação das aminas biogénicas

As aminas biogénicas mais vulgarmente encontradas nos alimentos e em função da sua estrutura química podem ser agrupadas em monoaminas aromáticas [tiramina (TYR) e 2-feniletilamina (PHE)], aminas aromáticas heterocíclicas [histamina (HIS) e triptamina (TRP)], diaminas alifáticas putrescina (PUT) e cadaverina (CAD)] e poliaminas alifáticas [espermidina (SPD), espermina (SPM) e agmatina] (Glória, 2005; Vidal-Carou *et al.*, 2009). Ainda, em relação à estrutura química, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolaminas (histamina) (Smith, 1981; Bardócz, 1995; Silla-Santos, 1996).

Na Tabela 1 encontra-se a classificação das aminas biogénicas, que de acordo com a posição do grupo amino e dos grupos substituintes, podem-se subdividir em diversos grupos.

Tabela 1: Estrutura química das aminas biogénicas mais frequentes em alimentos (Önal, 2007).

Monoaminas aromáticas	 <p>Tiramina</p>	 <p>2-Feniletilamina</p>
Aminas heterocíclicas	 <p>Histamina</p>	 <p>Triptamina</p>
Diaminas alifáticas	 <p>Cadaverina</p>	 <p>Putrescina</p>
Poliaminas alifáticas	 <p>Agmatina</p> <p>Espermidina</p> <p>Espermina</p>	

2.1.2. Formação das aminas biogénicas

De acordo com Traján e Janossy (1978) e Flores *et al.* (1996) dentro das reações de formação das aminas biogénicas, a descarboxilação de aminoácidos livres em diversos processos metabólicos é a mais frequentemente citada. A reação de descarboxilação envolve a perda da função carboxílica dos aminoácidos, com libertação de dióxido de carbono e consequente formação da amina biogénica (Figura 1).

Na Tabela 2 são apresentados os aminoácidos precursores das respetivas aminas biogénicas formadas.

Figura 1: Equação geral de descarboxilação catalítica dos aminoácidos (adaptado de Alfaia, 2002).

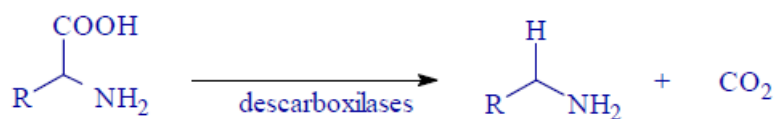
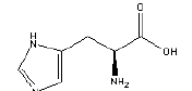
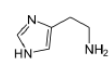
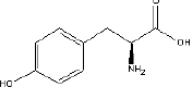
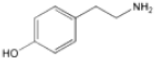
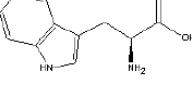
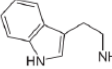
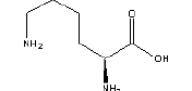

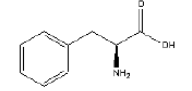
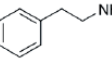
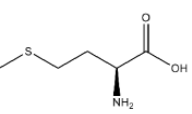
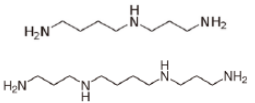
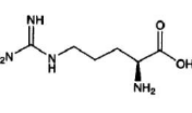
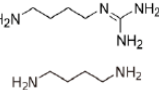
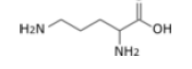
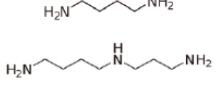


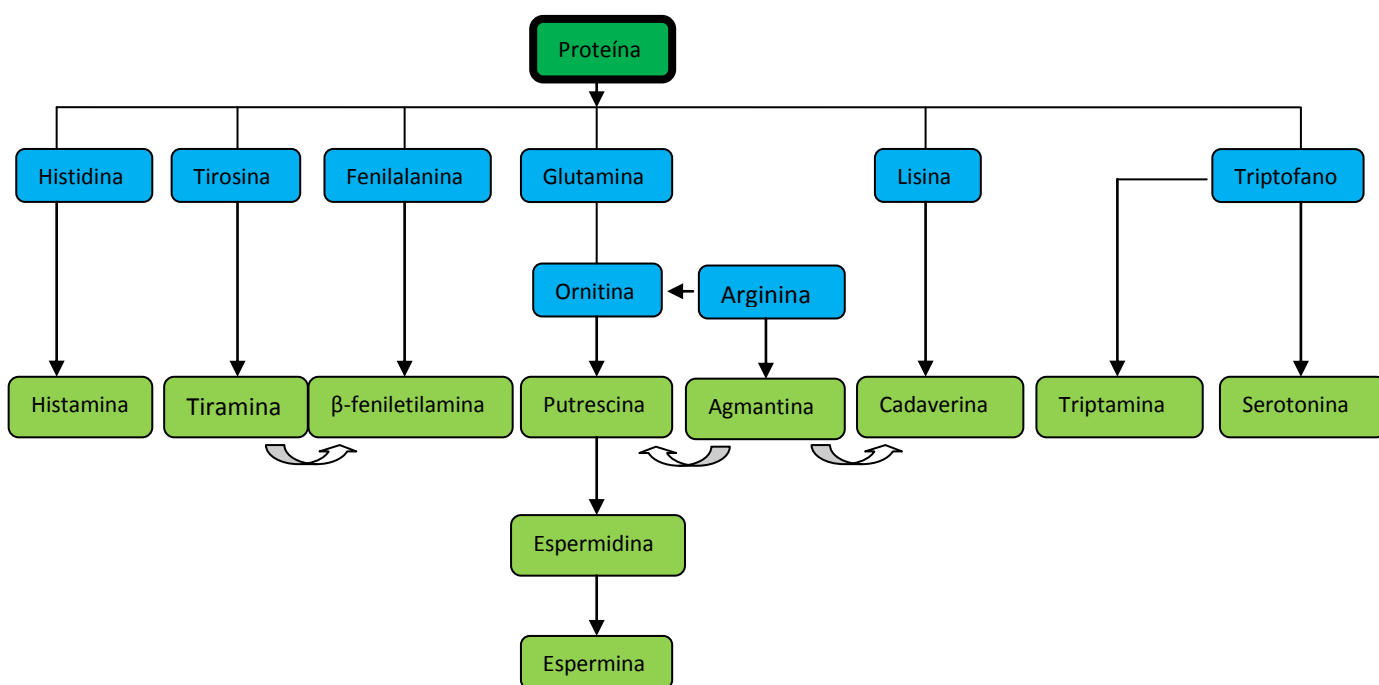
Tabela 2: Aminoácidos precursores e respectivas aminas biogénicas formadas (Flick & Granata, 2005; Radosevich, 2007; Anderson, 2008).

Aminoácidos precursores		Aminas biogénicas	
	Histidina	Histamina	
	Tirosina	Tiramina	
	Triptofano	Triptamina	
	Lisina	Cadaverina	
	Fenilalanina	Feniletilamina	
	Metionina	Espermidina/ Espermina	
	Arginina	Agmatina/ Putrescina	
	Ornitina	Putrescina/ Espermidina	

A reação, tendo como cofator o 5-fosfato de piridoxal, é o resultado tanto da atividade de descarboxilases endógenas, como do desenvolvimento de microrganismos descarboxilase-positivos associado a condições favoráveis para a atividade destas enzimas descarboxilativas.

(Krizek *et al.*, 1995; Santos, 1997; Alfaia, 2002). As enzimas descarboxilases responsáveis pela síntese destas aminas biogénicas em alimentos são principalmente de origem bacteriana e normalmente induzidas por determinadas condições ambientais como por exemplo, pH ácido desfavorável à multiplicação microbiana. A formação primária de determinadas aminas biogénicas resulta da reação de descarboxilação (Figura 2) e através de reações secundárias, originam as restantes aminas biogénicas (Mariné *et al.*, 1995).

Figura 2: Formação de aminas biogénicas a partir dos aminoácidos precursores (adaptado de Alfaia, 2002).



As aminas biogénicas podem ser de origem exógena ou de origem endógena (Vidal-Carou *et al.*, 2009). Contudo, muitas vezes, não há uma clara divisão entre estas duas vias de síntese das aminas biogénicas. No primeiro caso, as aminas biogénicas são resultantes do metabolismo microbiano, através da descarboxilação de aminoácidos precursores. Dentro deste grupo encontra-se a tiramina, a 2-feniletilamina, a histamina, a triptamina, a cadaverina, a putrescina e a agmatina, as quais resultam da descarboxilação da tirosina, da fenilalanina, da histidina, do triptofano, da lisina, da ornitina e da arginina, respetivamente. As poliaminas naturais têm origem endógena, resultando de processos metabólicos intracelulares, sendo essenciais para diversos organismos vivos, e estão presentes nos alimentos em concentrações

não tóxicas. Geralmente, considera-se que as poliaminas alifáticas (espermina e espermidina) são as aminas mais representativas desta categoria (Claro, 2009). A formação de aminas biogénicas por via exógena, a mais estudada nos alimentos, implica a presença de microrganismos descarboxilase-positivos, ou seja, bactérias do género *Escherichia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Streptococcus* (Masson *et al.*, 1996). Os microrganismos descarboxilase-positivos, podem ser parte integrante da população microbiana do alimento, ou terem sido introduzidos por contaminação antes, durante ou depois do processamento. Segundo Stratton *et al.* (1991), grande parte das bactérias com atividade histidina-descarboxilase pertence à família das *Enterobacteriaceae*. Quanto à tiramina, esta pode ser formada por microrganismos produtores de tirosina-descarboxilase, como são exemplo as bactérias coliformes, esporos de clostrídeos sulfito-redutores e espécies dos géneros *Streptococcus* do grupo D, *Proteus* e *Pseudomonas* (Mossel & Garcia, 1985).

2.1.2.1- Fatores que influenciam a formação de aminas biogénicas

A formação de aminas biogénicas depende de vários fatores que influenciam tanto a multiplicação microbiana como a atividade enzimática (Silla Santos, 1996). Os pré-requisitos necessários para a formação de aminas biogénicas nos alimentos estão assegurados pela disponibilidade de aminoácidos livres, pela presença de microrganismos descarboxilase positivos e por condicionantes que permitam a multiplicação microbiana e a síntese e actividade das descarboxilases, como por exemplo, a disponibilidade de açúcares fermentáveis, a temperatura, o pH, concentração de NaCl e o potencial redox (Alfaia, 2002; Flick & Granata, 2005; Claro, 2009). A quantidade e o tipo de aminas biogénicas formadas nos alimentos depende da natureza do substrato e do tipo de microrganismos presentes.

2.2 Aminas biogénicas nos alimentos

Considerando as normas de segurança alimentar, os alimentos devem ser produzidos, transportados e acondicionados sob rigorosas condições de higiene de forma a evitar o desenvolvimento de microrganismos e a consequente produção de teores elevados de determinadas aminas biogénicas, as quais podem desencadear reações adversas nos consumidores.

De acordo com Vidal-Carou *et al.* (2009), as aminas biogénicas podem ser encontradas numa vasta gama de alimentos e produtos alimentares, tais como: peixe, mariscos, cervejas, vinho

tinto, produtos curados bem como em frutas, vegetais, carne, leite, produtos fermentados de carne ou de vegetais (Suzzi *et al.*, 2003), avelãs, café, bebidas alcoólicas (Önal, 2007), entre outros. No que se refere aos alimentos fermentados, como os produtos cárneos, a presença de aminas biogénicas está geralmente associada à sua produção por microrganismos utilizados no processo de fermentação e melhoramento tecnológico. Os enchidos e os queijos são, entre os alimentos que se obtêm de animais terrestres, os que registam uma maior quantidade de aminas biogénicas (Vidal-Carou *et al.*, 2009). A maioria dos estudos indicam que os alimentos cujo fabrico inclui um processo de fermentação ou maturação apresentam teores de aminas biogénicas mais elevados comparativamente aos mesmos em fresco, sendo a quantidade de aminoácidos livres em alimentos frescos obtidos de animais terrestres pouco significativa. Esta formação de aminas biogénicas depende, para além de processo fermentativo, das estirpes microbianas responsáveis por essa fermentação e ainda da qualidade da matéria-prima e das condições tecnológicas empregues.

A determinação do teor em aminas biogénicas nos alimentos, além de ser de extrema importância devido aos possíveis efeitos prejudiciais para a saúde humana, é também um importante indicador na avaliação das condições de higiene e da qualidade dos alimentos, uma vez que teores elevados de aminas biogénicas podem acusar más condições de processamento e/ou armazenamento bem como utilização de matérias-primas no limite da sua conservação.

O processo de fabrico de produtos cárneos curados, por utilizar pedaços ou peça de todo o músculo sem picagem ou mistura, requer como ingrediente fundamental o sal, que contribui não só para a segurança do produto como também para o desenvolvimento das características organolépticas durante o processo de maturação a temperaturas relativamente baixas. Embora o pH não diminua, sob estas condições, o desenvolvimento microbiano é fortemente limitado e, de forma geral, somente as bactérias halófilas conseguem multiplicar-se (Suzzi *et al.*, 2003). As leveduras e algumas bactérias ácido lácticas podem também desenvolver-se em menor quantidade. Consequentemente, o teor de aminas biogénicas como a tiramina, a histamina, a cadaverina e a putrescina neste tipo de produtos é bastante baixo (com valores médios entre 2 e 80 mg/kg), havendo apenas algumas exceções (Vidal-Carou *et al.*, 2009). Não se conhece a ocorrência de quantidades expressivas de 2-feniletilamina e de triptamina neste tipo de produtos (Claro, 2009).

Segundo Claro (2009), o período de maturação é um fator crítico que determina o grau de acumulação das aminas biogénicas nos alimentos, especialmente de tiramina. Em contrapartida, uma grande formação de diaminas durante o fabrico, especialmente de cadaverina, tem sido relatada como dependente do tipo de maturação. Uma maturação rápida

permite uma maior concentração de amins biogénicas quando comparada com um período de maturação lenta. Segundo o mesmo autor, esses resultados são atribuídos às altas temperaturas aplicadas durante o período de secagem/cura sendo os fenómenos proteolíticos que ocorrem durante o amadurecimento os principais responsáveis pelo aumento da concentração dos aminoácidos livres precursores das respetivas amins biogénicas.

Mietz e Karmas (1977) propuseram um método objetivo para avaliar a qualidade de determinado produto a partir dos teores em amins, expresso em mg/kg, atualmente designado por Índice de Amins Biogénicas (IAB) (Brink *et al.*, 1990; Hernandez-Jover *et al.*, 1996). Este indicador avalia a qualidade e a frescura de determinados alimentos e é estabelecido pela seguinte fórmula:

$$\text{histamina} + \text{putrescina} + \text{cadaverina} / 1 + \text{espermina} + \text{espermidina} = \text{IAB}$$

Para valores de IAB > 1, indicação de produto inapropriado para o consumo humano e para valores de IAB < 1, indicação de produto de elevada qualidade. Contudo, este índice, segundo Vidal-Carou *et al.* (2009), não se aplica a produtos fermentados, uma vez que a formação destas amins biogénicas não está direta e exclusivamente associada à qualidade das matérias-primas utilizadas, mas sim, extremamente relacionada com a ação dos microrganismos que levam a cabo o processo de fermentação.

2.3 Microrganismos produtores de amins biogénicas em alimentos

Diversos microrganismos têm sido usados ao longo dos tempos com fins tecnológicos, quer na alimentação humana quer animal. Alguns têm uma longa história de utilização enquanto outros são pouco conhecidos, podendo representar um potencial perigo para os consumidores. Desta forma, há que se estabelecer uma avaliação formal do perigo em relação ao seu uso, de modo a serem usados com segurança sem prejuízo da saúde dos consumidores e obedecendo aos requisitos legislativos estabelecidos pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) (Gonçalves, 2009).

Os aspetos relacionados com a segurança alimentar, como a produção de enterotoxinas e de amins biogénicas, bem como a capacidade de degradar amins biogénicas, devem ser fatores a considerar na seleção de estirpes de cocos Gram-positivos, coagulase negativos, adequadas para serem utilizadas como culturas *starter* (Tristão, 2006).

As BAL são os microrganismos mais frequentemente usados na indústria de produtos cárneos sendo que algumas destas bactérias, nomeadamente *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus*

brevis, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Carnobacterium piscícola*, *Carnobacterium divergens*, têm sido identificadas como microrganismos descarboxilase-positivos e conseqüentemente produtoras de aminas biogénicas (Maijala, 1993, Suzzi & Gardini, 2003, Ruiz-Capillas & Jiménez-Comero, 2004, Önal, 2007). Segundo Edward *et al.* (1987), estirpes de *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus* inoculadas em carnes embaladas a vácuo não produzem aminas biogénicas. Mais tarde, os trabalhos de Straub *et al.* (1994) mostraram que a estirpe *Lactobacillus curvatus* produziu tiramina em meio de cultura. Por sua vez, Masson *et al.* (1996) constataram uma elevada produção de tiramina por *Carnobacterium* e por algumas estirpes de *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*. Neste mesmo estudo, as estirpes pertencentes à família *Micrococcaceae* e à espécie *Lactobacillus sakei* não produziram tiramina. De acordo com Smith *et al.* (1993), a quantidade de tiramina em produtos cárneos é influenciada pela presença de bactérias aeróbicas e BAL. Eitenmiller *et al.* (1978) estudaram os fatores que influenciam a formação de tiramina em produtos cárneos contaminados com microbiota natural e *starter*, e observaram que os níveis máximos de tirosina-descarboxilase foram encontrados no período de rápida formação de ácido durante a fermentação provocada pela microbiota natural, e que nos enchidos adicionados de culturas de arranque, a formação de tiramina foi comparável aos valores encontrados nos enchidos fermentados com microbiota natural. Devido a estes resultados, os autores atribuíram a presença de aminas biogénicas nos enchidos não inoculados com culturas de arranque, à microbiota presente por contaminação proveniente do processo ou do ambiente fabril sendo a espécie *Enterococcus faecalis* responsabilizada por esta síntese. Maijala e Eerola (1993), associaram a elevada produção de tiramina em enchidos (100 mg/kg) à contaminação por BAL.

A descarboxilação da histidina está principalmente atribuída aos géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacillus*. Microrganismos presentes nos produtos cárneos, nomeadamente *Pseudomonas*, *Staphylococci*, *Micrococci* e *Enterococci*, são histidina descarboxilase-positivos (Tiecco *et al.*, 1986). Batturini *et al.* (1995) referem a presença de aminas biogénicas em salame produzida por *Enterobacteriaceae*, especialmente *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, e BAL com menos frequência (*Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus lactis*). Também a presença de cadaverina em quantidades apreciáveis em carne de bovino tem sido associada a contaminação por *Enterobacteriaceae* (Slermr, 1981).

Recentemente, Latorre-Moratalla *et al.* (2010) verificaram que *Enterococcus faecium* e algumas espécies de *Staphylococcus* apresentam atividade descarboxilase-positiva produzindo

elevadas quantidades de tiramina e níveis consideráveis de 2-feniletilamina em produtos fermentados tradicionais europeus. Segundo os mesmos autores, os *Lactobacillus*, especialmente as espécies *L. plantarum*, *L. sakei* e *Staphylococcus xylosum*, do ponto de vista aminogénico, seriam as espécies mais adequadas para serem utilizadas como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados tradicionais.

2.3.1 O papel das bactérias do ácido láctico em produtos cárneos fermentados

As BAL constituem um grande grupo de bactérias benéficas com propriedades probióticas e protetoras (Collins *et al.*, 1998), que por apresentarem interesse na tecnologia de alimentos, além de possuírem propriedades terapêuticas, se enquadram nos requisitos estabelecidos pela autoridade legislativa de Segurança Alimentar Europeia (Dunne *et al.*, 1999; Gonçalves, 2009).

As BAL são bacilos ou cocobacilos Gram positivos, não móveis ou raramente móveis, não formadores de endósporos, que apresentam metabolismo estritamente fermentativo (Kandler, 1983; Holzapfel & Wood, 1995). As BAL são aerotolerantes, mesmo sendo bactérias características de ambientes anaeróbios, muito exigentes do ponto de vista nutritivo, que suportam valores de pH muito baixos, pelo que faz da tolerância à acidez uma característica variável entre as estirpes (Gonçalves, 2009). A capacidade de produzir ácido láctico como produto final da fermentação dos hidratos de carbono está entre as suas características particulares, e estão presentes em ambientes muito diversos tais como alimentos e bebidas fermentadas, plantas, frutos, solo, águas residuais e também fazem parte da microbiota dos tratos respiratórios, intestinal e genital dos humanos e animais (Holzapfel & Wood, 1995).

As BAL encontram-se entre os microrganismos que estão habitualmente envolvidos no processo de fermentação dos produtos cárneos fermentados, juntamente com elementos da família *Micrococcaceae* e, em alguns casos, com determinados bolores e leveduras (Patarata, 2002) (Tabela 3). As BAL são utilizadas na indústria alimentar com fins tecnológicos sendo acidificantes, tolerantes aos ácidos biliares, têm capacidades de adesão ao tecido epitelial do intestino e são produtoras de substâncias antimicrobianas, designadamente ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas (Dunne *et al.*, 1999; Gonçalves, 2009). Tais bactérias fazem parte de um importante grupo de culturas iniciadoras ou *starter* a nível industrial em diversos produtos designadamente queijos, iogurtes, enchidos, “*sauerkraut*” e “*sourdough*” (Messens & De Vuyst, 2002). Estas culturas *starter* têm como funções a rápida acidificação das matérias-primas preparadas e o desenvolvimento de características sensoriais apreciáveis nos produtos finais (Leroy *et al.*, 2006). A inoculação de culturas *starter* compostas por estirpes selecionadas de BAL, tais como *Lactobacilli* homofermentativos, e/ou *Pediococci* e

cocos Gram-positivos, catalase-positivos, não patogénicos, coagulase-negativos, tais como *Staphylococci* e/ou *Kokuria*, permitem aumentar a segurança e a qualidade dos produtos finais, padronizar o processo de fabrico (Hugas & Monfort, 1997) e conservar os produtos por períodos mais longos (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Tabela 3: Organização taxonómica até às famílias das bactérias do ácido láctico (BAL) de acordo com o “Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea” (TOBA, versão 05.12.09) e com a “List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature” (LPNSN, versão 05.12.09) (Adaptado de Gonçalves, 2009).

BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS DOMÍNIO BACTERIA CLASSE BACILLI ORDEM LACTOBACILLALES					
Família <i>Aerococcaceae</i>	Família <i>Enterococcaceae</i>	Família <i>Lactobacillaceae</i>	Família <i>Streptococcaceae</i>	Família <i>Carnobacteriaceae</i>	Família <i>Leuconostocaceae</i>
				GÉNERO	
GÉNERO	GÉNERO	GÉNERO	GÉNERO	<i>Carnobacterium</i>	GÉNERO
				<i>Agitococcus</i>	
<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Alkalibacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Abiotrophia</i>	<i>Atopobacter</i>	<i>Paralactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Allofustis</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>Dolisococcus</i>	<i>Catelicoccus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactovum</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Weissella</i>
<i>Eremococcus</i>	<i>Melissococcus</i>			<i>Atopococcus</i>	
<i>Facklamis</i>	<i>Pilibacter</i>			<i>Atopostipes</i>	
<i>Globicatella</i>	<i>Tetragenococcus</i>			<i>Desemzia</i>	
<i>Ignavigranum</i>	<i>Vagococcus</i>			<i>Dolisogranulum</i>	
				<i>Granulicatella</i>	
				<i>Isobacterium</i>	
				<i>Lactosphaera</i>	
				<i>Marinilactibacillus</i>	
				<i>Trichococcus</i>	

Segundo Matuscelli *et al.* (2000) e Suzzi e Gardini (2003), as BAL e as enterobactérias são as principais formadoras de aminas biogénicas em alimentos provenientes de animais terrestres, no entanto cocos Gram-positivos catalase-positivos também têm demonstrado essa

capacidade. Portanto, é importante evitar a utilização de estirpes com atividade descarboxilase-positiva como constituinte de culturas *starter*, a fim de reduzir o perigo de acumulação de amins biogénicas durante o processamento, uma vez que essas bactérias podem atingir teores elevados durante a fermentação (Martin *et al.*, 2006).

A adição de culturas de BAL tem sido sugerida para prevenir a acumulação de amins biogénicas, nomeadamente a histamina e a tiramina, por controlo da fermentação natural (Maijalla *et al.*, 1995; Kalač *et al.*, 2000). O estudo dos processos fermentativos das salsichas (Maijalla *et al.*, 1995; Aerola *et al.*, 1996) e do queijo (Ordenez *et al.*, 1997; Fernandez-Garcia *et al.*, 1999; Leuschner *et al.*, 1999) indicaram que uma correta seleção das estirpes utilizadas poderá conduzir a um produto final com menores teores de amins não assegurando, no entanto, eventuais modificações na qualidade dos produtos, devido aos estudos não abrangerem tais aspetos.

Determinados microrganismos fermentadores como *Lactobacillus*, pertencentes ao grupo das BAL e algumas espécies de *Staphylococcus*, pertencentes ao grupo Micrococcus, têm a capacidade de produzir amins biogénicas. Visto serem microbiota tecnológica habitualmente presente em produtos cárneos fermentados, quando selecionados pelas suas características de bons fermentadores, as estirpes que são produtoras de amins biogénicas não devem ser utilizadas, uma vez que apresentam a capacidade de produzir várias amins, entre elas, a histamina, a tiramina, a 2-feniletilamina, a triptamina, a cadaverina e a putrescina, as quais representam potenciais perigos químicos para a saúde humana (Gouveia, 2009).

2.4 Culturas de arranque ou iniciadoras (*starter*)

Segundo Hammes e Hertel, (1998), Bernardi *et al.* (2010) e Carvalho (2010), as culturas de arranque ou *starter* são preparações que contêm formas vivas ou inativas de microrganismos que se desenvolvem num substrato de fermentação com uma atividade metabólica desejada.

De um modo geral, as culturas de arranque são incorporadas em carnes e produtos cárneos com o intuito de alterar de forma benéfica as propriedades dos alimentos.

Estas culturas podem contribuir para a segurança e qualidade dos produtos cárneos tornando-os sensorialmente mais atrativos (Hammes, 1994), além de fornecerem condições que aumentam o tempo de vida útil destes produtos através do controlo de patógenos por inibição de microrganismos deteriorantes. As culturas de arranque fomentam também benefícios para a saúde devido aos efeitos positivos na microbiota intestinal (Lücke, 2000; Leroy *et al.*, 2006; Bernardi *et al.*, 2010). A fermentação de produtos cárneos tradicionais está inteiramente

ligada à microbiota indígena e reflete a diversidade de formulação e as boas práticas de fabrico (Talon *et al.*, 2007).

De acordo com Hammes e Knauf (1994 citado por Hammes & Hertel, 1998) e Carvalho (2010), dentro dos microrganismos mais utilizados como culturas de arranque estão as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. Plantarum*, *L. pentosus*, *L. sakei*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *L. pentosaceus*, *Kocuria varians*, *Streptomyces griseus*, *Bifidobacterium spec.*, *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus subsp. carnosus*, *S. carnosus subsp. utilis*, *S. equorum*, *Halomonadaceae: Halomonas elongata*; *Enterobacteria: Aeromonas spec.*; *Fungi: Penicillium nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. camemberti*; *Yeasis: Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*.

Para Santos *et al.* (1998), Rantsiou *et al.* (2006), Benito *et al.* (2007) e Latorre-Moratalla *et al.* (2010), *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum* estão entre as espécies mais frequentemente encontradas em produtos cárneos fermentados. A espécie *Enterococcus faecium* pode também estar presentes em enchidos fermentados tradicionais (Talon *et al.*, 2007; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010). Os cocos catalase positivos *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus equorum* contribuem principalmente para a cor e desenvolvimento do sabor sendo classificadas como o segundo grupo de bactérias mais importante em produtos cárneos (Aymerich *et al.*, 2003; Simonová *et al.*, 2006; Talon *et al.*, 2007; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010).

Atualmente, as culturas de arranque vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de reduzir o tempo de fermentação e, assim, garantir um baixo teor residual de nitritos no produto final (Toldrá *et al.*, 2001), além de promover o aumento da qualidade dos produtos através da utilização de culturas produtoras de bacteriocinas (Aymerich *et al.*, 1998; Bernardi *et al.*, 2010).

As bactérias mais utilizadas atualmente como culturas de arranque em produtos cárneos fermentados (enterobacteria, *enterococci*, *Lactobacillus* e cocos catalase positivos), podem produzir grandes quantidades de aminas biogénicas através da descaboxilação dos aminoácidos livres precursores (Suzi *et al.*, 2003; Vidau-Carou *et al.*, 2007; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010). A ocorrência de aminas biogénicas em grandes quantidades origina alguma preocupação no que se refere à segurança destes alimentos (Halasz *et al.*, 1994; Suzi *et al.*, 2003; Vidau-Carou *et al.*, 2007; Önal, 2007; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010). A seleção experimental e industrial de culturas iniciadoras constitui uma das medidas de controlo que podem minimizar a produção destas substâncias (Latorre-Moratalla *et al.*, 2010).

As BAL, por proporcionarem melhor segurança e estabilidade e desenvolverem as características sensoriais de cada produto, estão entre os microrganismos mais utilizados

como culturas de arranque em produtos cárneos. Para além das BAL alguns cocos catalase positivos dos géneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*, e ainda algumas leveduras (*Debaryomyces*) e bolores (*Penicillium*) têm também a capacidade de afinar as características sensoriais (Lück, 2000; Bernardi *et al.*, 2010).

2.4.1. Caraterização dos microrganismos mais utilizados como culturas de arranque em produtos cárneos fermentados

2.4.1.1 *Lactobacillus*

O género *Lactobacillus* é um dos grupos das BAL que compreende estirpes com características probióticas tradicionalmente incorporadas em alimentos para consumo humano e que têm a sua origem na microbiota intestinal (Larayer *et al.*, 2009). Os lactobacilos são um grupo de microrganismos com características morfológicas, fisiológicas e metabólicas semelhantes com ampla ação probiótica.

O género *Lactobacilli* compreende 140 espécies (Euséby, 2003) que apresentam algumas características comuns como, por exemplo, o fato de serem Gram-positivas, catalase negativos, não móveis, não esporulados, anaeróbios facultativos e que apresentam capacidade de multiplicação tanto em ambientes microaerófilos como em ambiente com anaerobiose estrita (Klen *et al.*, 1998 citado por Gonçalves, 2009). Apresentam forma de bacilos ou bastonetes estreitos com aspeto linear podendo também terem aspeto cocobacilar ou espiralar, com dimensões que variam entre 0,6 a 1,2 µm. Estes bacilos são catalase e oxidase negativos e necessitam de citocromos na redução de nitratos a nitritos (Vásquez *et al.*, 2009). Estes bacilos podem aparecer de forma isolada, aos pares ou em cadeias curtas, multiplicando-se em caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS), a temperaturas por volta dos 30 °C, no período de 48 a 72 horas, mas não se desenvolvem a temperaturas superiores a 45 °C. Outra caraterística destes microrganismos é a produção de ácido láctico como produto final da fermentação. E ainda, a identificação das espécies é por vezes difícil dada a sua proximidade morfológica e genética (Euséby, 2003).

A utilização cada vez mais frequente de *Lactobacillus* nos processos industriais e também na saúde humana e animal, juntamente com o fato dos testes bioquímicos serem insuficientes para a caraterização e diferenciação das espécies, teve como consequência o desenvolvimento de métodos moleculares com elevado grau de sensibilidade direcionados para este género (Gonçalves 2009; Singh *et al.*, 2009).

De acordo com vários estudos, as três espécies de *Lactobacillus* mais utilizadas como culturas de arranque em enchidos fermentados são *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*, sendo esta última apontada como a maior produtora de amins biogénicas (Santos *et al.*, 1998; Bover-Cid *et al.*, 2001; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010).

2.4.1.2 *Staphylococcus* coagulase negativos

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococaceae*, em conjunto com os géneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, este género possui 33 espécies (Cassettari *et al.*, 2005), porém de acordo com Euséby (2003) e Carvalho (2010) são 41 espécies e 21 subespécies. Os estafilococos são microrganismos com células esféricas, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, Gram positivos, não esporulados e não móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos (com exceção do *S. saccharolyticus* que é anaeróbico), catalase positivos e oxidase negativos, que ocorrem na natureza na forma simples ou aos pares e em grupos irregulares. Foram descritos pela primeira vez em matérias purulentas de abscessos cirúrgicos, em 1880, pelo médico escocês Alexander Ogston, que assim o designou pelo formato em cachos de uva (*staphylo*, em grego). Para além de habitarem a pele e as mucosas de vertebrados de sangue quente, estão presentes em produtos alimentares, pó e água (Carvalho, 2010).

Os estafilococos coagulase negativos desempenham um papel importante na fermentação de produtos cárneos fermentados (Bover-Cid *et al.*, 2001; Glória, 2005). Por esse motivo, a produção de enterotoxinas e amins biogénicas, bem como a capacidade de degradação destas amins, são aspetos a ter em consideração na seleção destas estirpes como culturas *starter* (Glória, 2005). Portanto, estirpes *Staphylococcus* coagulase negativos selecionadas para uso como culturas *starter* devem ser seguras do ponto de vista microbiológico e toxicológico.

De acordo com Bover-Cid *et al.* (2001) e Latorre-Moratalla *et al.* (2010), os estafilococos estão entre os microrganismos encontrados em maior quantidade nos produtos cárneos fermentados europeus, sendo algumas espécies indicadas como cultura *starter* nestes produtos por não produzirem amins biogénicas, como exemplo, as espécies *S. xylosus*, *S. carnosus* e *S. equorum*.

2.4.1.3 Espécie *Staphylococcus xylosus*

Staphylococcus xylosus são cocos Gram-positivos, de 0,8 a 1,2 µm de diâmetro, não móveis, não esporulados que ocorrem na forma simples ou agrupados aos pares ou em tétrades. As colônias alcançam desde 5 a 10 mm de diâmetro e variam de elevadas a ligeiramente convexa, áspera ou lisa, geralmente opacas. Em relação às características bioquímicas, apresentam resultados positivos para urease, β-glucosidase, β-galactosidase, catalase e são produtores de ácidos a partir de manose, arabinose, frutose, glucose, glicerol, trealose, xilose e sacarose. Apresentam também resultados variáveis para atividade nitrato redutase, fosfatase alcalina, produção de acetoína (reação Voges-Proskauer), β-glucoronidase, lipase e produção de ácidos a partir de lactose, manitol, salicina, inositol, sorbitol, galactose, ribose e turanose. Encontram-se amplamente distribuídos na natureza, resistentes a novobiocina e lisozima e sensíveis a lisostafina. Algumas das estirpes de *S. xylosus* produzem níveis elevados de manitol intracelular quando comparadas com outras espécies (Schleifer, 1986, Carvalho, 2010). As estirpes mais raras podem produzir ácido a partir da sacarose, maltose ou manitol.

Todas as estirpes desta espécie apresentam excelente desenvolvimento em meios com concentrações de sal (cloreto de sódio) acima de 10%. Em concentrações salinas de 15%, cerca de 48% das estirpes desenvolvem-se pouco e 14% não se multiplicam. Em relação à temperatura, todas as estirpes estudadas multiplicam-se bem a 15 °C enquanto 62% das mesmas não se desenvolvem a temperaturas superiores a 45 °C (Schleifer & Kloos, 1975 citado Carvalho, 2010).

2.4.1.4 Espécie *Staphylococcus carnosus*

Staphylococcus carnosus são cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, não móveis, não esporulados, que ocorrem na forma simples ou aos pares e as colônias, de coloração cinzento claro, podem atingir diâmetros de 2 a 3 mm. Estes cocos são anaeróbios facultativos, não-hemolíticos, desenvolvem-se a temperaturas entre os 15 e 45 °C, sendo a temperatura ótima estabelecida entre os 30 e 40 °C. A espécie *Staphylococcus carnosus* tem sido dividida em duas subespécies: *Staphylococcus carnosus* subespécie *carnosus* (Schleifer & Fischer, 1982) e *Staphylococcus carnosus* subespécie *utilis* (Euseby, 2003). Quanto às características bioquímicas são coagulase negativos, urease negativos, reduzem os nitratos a nitritos (exceto a subespécie *utilis*). Multiplicam-se em meio *Tryptcase Soy Agar* (agar de soja tripticase) contendo 15% de cloreto de sódio. A origem patogénica é desconhecida, no

entanto, além de não produzirem coagulase, não produzem fator de aglomeração, hialuronidase, hemolisinas ou enterotoxinas. Esta espécie é principalmente isolada de produtos cárneos (salsichas secas, salames e presuntos), molho de soja, além de molho de peixe e molhos contendo camarões e contribuem para o desenvolvimento do sabor e da cor em produtos cárneos devido à sua capacidade de redução de nitratos a nitritos, produção de fenilacetaldeído, 2-metil-butanol, dimetilsulfato, dimetiltrissulfato, diacetil, etanol e éter etílico, além de serem incapazes de produzir histamina, cadaverina e putrescina (Euséby, 2003).

2.4.1.5 Espécie *Staphylococcus equorum*

Staphylococcus equorum são cocos Gram-positivos, não móveis e não esporulados, com diâmetro entre 0,5 e 1,8 µm. As suas colónias apresentam coloração branca, opacas, com 4 a 6 mm dependendo do período de incubação e da temperatura aplicada. Estes cocos são aeróbicos, multiplicam-se a temperaturas que variam entre 6 a 40 °C, com temperatura ótima a 30-32 °C. Quanto às características bioquímicas, reduzem os nitratos e produzem ácidos a partir da D-frutose, D-glucose e D-manose.

Nesta espécie são conhecidas 2 subespécies: *equorum* (Schleifer *et al.*, 1985) e *linens* (Euséby, 2003), sendo a subespécie *linens* isolada de enchidos fermentados, salmouras de cura, presunto cru, queijo suíço de superfície.

A subespécie *equorum* fermenta o manitol ao passo que a subespécie *linens* não o faz. No que se refere a características bioquímicas, a distinção entre *S. equorum* subespécie *equorum* e *S. xylosus* somente é conseguida através do auxílio de técnicas de biologia molecular (Euséby, 2003).

2.4.1.6 Caracterização dos *Enterococcus*

A primeira descrição do género enterococci ocorreu em 1899 quando foram observados e denominados “entérocoque” pela primeira vez para enfatizar a sua origem intestinal. O género *Enterococcus* foi proposto por Thiercelin e Jouhaud, em 1903, como diplococcus Gram-positivos de origem intestinal (Santos, 2011).

Os Enterococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos com formato ovoide que podem organizar-se em cadeias curtas, aos pares ou simples. Este grupo de microrganismos apresenta uma taxonomia controversa que evoluiu muito ao longo das décadas. Até à década de 80, encontravam-se incluídos no grupo D do género *Streptococcus* da classificação de

Lancefield devido às suas características antigénicas (Ranconi & Merino, 2000). Como os *Streptococcus*, não apresentam enzima citocromo oxidase sendo, assim, catalase negativos, apesar de algumas estirpes produzirem uma reação de catalase fraca (Murray, 1990; Santos, 2011). A presença/expressão de fatores de virulência bem como a resistência intrínseca ou adquirida a vários antibióticos e a capacidade de produzir biofilmes atribuem certa patogenicidade aos *Enterococcus* (Santos, 2011).

Este género pertence à microbiota intestinal humana e animal sendo a espécie *Enterococcus faecalis* predominante seguida de *E. faecium* (Ranconi & Merino, 2000).

O grupo enterococci tem um papel importante na produção de alimentos, uma vez que são resistentes e apresentam características fenotípicas benéficas para as características organolépticas finais do produto. Dentro das espécies mais encontradas incluem-se *E. faecium* e *E. faecalis*, sendo esta última a mais frequente em alimentos e fezes de animais. *E. faecium* seguida de *E. faecalis* e *E. cecorum*, é a espécie mais frequente em bovinos, suínos e aves domésticas enquanto *E. galinarum* e *E. durans/hirae* ou *E. avium* são menos frequentes (Santos, 2011).

2.4.1.6.1 Espécie *Enterococcus faecalis*

A maioria das estirpes *Enterococcus faecalis* não é β -hemolítica sendo que raramente algumas estirpes possam expressar tal característica. As estirpes multiplicam-se a temperaturas entre os 10 e 45 °C, porém podem sobreviver até 60 °C durante 30 minutos, conseguindo multiplicar-se até concentrações de 6,5% de cloreto de sódio e de pH 9,6. Podem ser aeróbios, anaeróbios facultativos. Como características bioquímicas, algumas estirpes produzem pseudocatalase sendo que a produção de ácidos ocorre a partir de glicérol, manitol, D-glucose, D-frutose e D-manose, entre outros (Euséby, 2003).

E. faecalis representa a espécie mais vulgarmente encontrada em fezes humanas (80-90%) sendo isolados também do reto e amígdalas de cães e gatos, de plantas, crustáceos, solo e água contaminados, além de colonizar carcaças, leite e produtos lácteos durante o processamento (Euséby, 2003).

2.4.1.6.2 Espécie *Enterococcus faecium*

As colónias de *Enterococcus faecium* multiplicam-se em Agar sangue ou Agar nutritivo, são circulares, lisas e não pigmentadas. A temperatura de desenvolvimento é entre 10 e 50 °C com algumas estirpes sobrevivendo a temperaturas até 60 °C durante 30 minutos, multiplicando-se até concentrações de 6,5% de cloreto de sódio e pH 9,6. A produção de ácidos ocorre a partir

de ribose, galactose, D-glucose, D-frutose e D-manose, N-acetylglucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, celobiose, maltose, lactose, β -gentiobiose (β -D-glucopirranose), glicerol e trealose.

Estas colónias são isoladas de fezes e do trato gastrointestinal de humanos e animais, de plantas, de alimentos, solo e água contaminada, podendo contaminar carcaças de animais abatidos, leite e produtos lácteos durante o processamento.

2.5 Efeitos das aminas biogénicas e implicações na Saúde Pública

2.5.1 Fisiológicos

As aminas biogénicas desempenham o seu papel biológico como fontes de azoto e como precursores na síntese de hormonas, alcaloides, ácidos nucleicos e proteínas (Silla Santos, 1996). Algumas aminas como as catecolaminas (por exemplo, a tiramina), indolaminas e a histamina desempenham funções metabólicas nos humanos, especialmente ao nível do sistema nervoso e na regulação da pressão sanguínea (Smith, 1980-81). As poliaminas, espermidina e espermina, desempenham uma grande diversidade de funções no metabolismo celular e no crescimento, embora o seu papel biológico no metabolismo celular ainda seja pouco claro (Silla Santos, 1996).

A Tabela 4 apresenta, de forma sumária, as ações fisiológicas/farmacológicas de algumas aminas biogénicas. Ainda que o significado fisiológico da presença das aminas biogénicas nos organismos vivos esteja mais ou menos bem definido, os estudos ainda não permitem distinguir a sua ação fisiológica da ação farmacológica.

2.5.2 Toxicológicos

A presença de aminas biogénicas nos alimentos poderá ter um papel importante do ponto de vista da saúde pública, sobretudo em alimentos de grande consumo, como peixe e derivados, queijo, carne e produtos cárneos (Shalaby, 1995; Hernández-Jover *et al.*, 1997). Estas aminas, independentemente dos seus efeitos fisiológicos (vasoativos e psicoativos), podem também desencadear efeitos ou sintomas toxicológicos, sobretudo em consumidores mais sensíveis (Kalač *et al.*, 1999). O interesse no estudo das aminas biogénicas, em particular da tiramina e histamina, tem sido associado ao risco para a saúde humana devido aos seus potenciais efeitos

vasoativos (Vidal-Carou *et al.*, 2009). Embora o estudo destes compostos remonta há mais de 30 anos como indicadores de higiene e qualidade em alimentos, hoje em dia, o interesse das aminas biogénicas, principalmente da histamina, tiramina, cadaverina e putrescina, é mais relevante uma vez que os requisitos de segurança alimentar são cada vez mais altos. Estes compostos quando presentes em quantidades elevadas são considerados compostos tóxicos indesejáveis, estando por esse motivo relacionados com a segurança e qualidade alimentar (Gouveia, 2009).

Tabela 4: Ações fisiológicas/farmacológicas de algumas aminas biogénicas (adaptado de Alfaia, 2002).

AMINA BIOGÉNICA	EFEITO FISIOLÓGICO/FARMACOLÓGICOS DE ALGUMAS AMINAS
TRIPTAMINA	Hipertensão
PUTRESCINA	Hipotensão, bradicardia, regulação das funções dos ácidos nucleicos e síntese proteica; estabilização das membranas celulares
CADAVERINA	Hipotensão; bradicardia
2- FENILETILAMINA	Aumento da pressão arterial através de vasoconstrição periférica; aumento do fluxo sanguíneo e força do coração; libertação de noradrenalina a nível do sistema simpático
ESPERMINA	Regulação das funções dos ácidos nucleicos e síntese proteica; estabilização das membranas celulares; desenvolvimento do tecido intestinal
ESPERMIDINA	Regulação das funções dos ácidos nucleicos e síntese proteica; estabilização das membranas celulares; desenvolvimento do tecido intestinal
TIRAMINA	Aumento da pressão arterial por vasoconstrição periférica; aumento do débito e da força cardíaca; ação hiperglicemiante; libertação de noradrenalina a nível do sistema simpático.
HISTAMINA	Regulação da secreção gástrica (controlo do pH e volume gástrico); mediador primário da resposta imunitária; regulação da temperatura corporal; libertação de adrenalina e noradrenalina; estimulação do tecido muscular liso.

Geralmente, as aminas biogénicas quando presentes nos alimentos em quantidades vestigiais não representam, de um modo geral, qualquer risco para a saúde dos consumidores porque são rapidamente destoxificadas por ação dos complexos enzimáticos mitocondriais, constituídos pelas enzimas aminooxidases, ao promover a desaminação oxidativa com produção de aldeídos, peróxido de hidrogénio e amónia (Cooper, 1997; Kalač *et al.*, 1999). No entanto, quando consumidas em elevadas quantidades podem provocar efeitos tóxicos como dilatação dos vasos sanguíneos, hipotensão, cefaleia, diarreia e vómitos (Silla-Santos, 1996), além de

outros efeitos mais severos tais como reações pseudo-alérgicas (intoxicação por histamina), enxaquecas e crises hipertensivas (Bover-Cid *et al.*, 2001).

A maioria dos casos documentados de intoxicações por amins biogénicas refere-se a quantidades elevadas de histamina ou tiramina em determinados alimentos. A tiramina e a 2-feniletilamina, devido às suas propriedades vasoativas, podem conduzir ao aumento da pressão arterial, podendo causar ainda cefaleia, suores, vómitos, entre outros efeitos. A intoxicação por histamina associada sobretudo ao consumo de produtos da pesca, nomeadamente da família *Scombroidae*, resulta num quadro clínico com sintomatologia que pode incluir distúrbios gastrointestinais, cutâneos (alergias), hemodinâmicos e neurológicos (Fletcher *et al.*, 1998, Alfaia, 2002). As reações mais frequentes provocadas pela histamina são vasodilatação e subsequente hipotensão, problemas de pele tais como rubor e prurido, problemas gastrointestinais como diarreias, cólicas e vómitos e neurológicos, como cefaleia e tontura (Vidal-Carou *et al.*, 2009). A toxicidade da histamina pode ser incrementada na presença de outras amins como a cadaverina, putrecina e tiramina (Shalaby, 1996). Para o autor, a agmatina, a espermina e a espermidina ou as amins terciárias podem reagir com nitritos formando nitrosaminas carcinogénicas que constituem um potencial risco para a saúde humana. A presença conjunta de amins biogénicas em doses elevadas com outros fatores potenciadores da sua toxicidade, nomeadamente os medicamentos inibidores das monoaminoxidases, o álcool e a presença simultânea de poliaminas (espermina, espermidina, putrescina e cadaverina) podem induzir situações de intoxicação alimentar com quantidades bastante inferiores destas amins (Draisici *et al.*, 1998).

Segundo Latorre-Moratalla *et al.* (2008), a histamina é a única das amins biogénicas com regulamentação jurídica estabelecida na Europa para algumas espécies de peixes. Önal (2007) afirma que para alguns autores a ingestão de 8-40 mg, 40-100 mg e superior a 100 mg de histamina, podem provocar envenenamento ligeiro, intermédio e intenso, respetivamente. O Decreto-Lei nº 113/2006 de 12 de Junho que transpõe para a Ordem Jurídica Nacional o Regulamento 852/2004 de cujo artigo 4º decorre a publicação do Regulamento (CE) 1441/2007 de 5 de Dezembro, adota as normas sanitárias relativas à produção e colocação no mercado dos produtos da pesca e estabelece o valor máximo permitido de histamina. Este regulamento indica que o teor médio de histamina por cada lote de peixes ($n = 9$) das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Scombrosidae* não deverá ultrapassar 400 mg/kg podendo, no entanto, 2 amostras apresentarem teores entre 200 e 400 mg/kg. Assim, as amins biogénicas podem estar presentes nos alimentos como constituintes minoritários não nutritivos com ação fisiológica, ou em quantidades elevadas, prejudiciais para o consumidor, constituindo assim um desafio interessante no âmbito da

investigação na área alimentar. Com o objetivo de reduzir os riscos para os consumidores, o controlo destes compostos em várias matrizes tem impulsionado o desenvolvimento de técnicas analíticas que permitam a sua identificação e quantificação de forma precisa, de modo a possibilitar a correta avaliação dos fatores de risco relacionados com a ingestão de alimentos contendo estas substâncias (Claro, 2009).

2.6 Métodos de determinação de aminas biogénicas

Atualmente existem na literatura vários métodos para a determinação de aminas biogénicas em diferentes matrizes. Vários métodos têm sido desenvolvidos para a análise das aminas biogénicas, incluindo a cromatografia em camada fina, a cromatografia gasosa, a electroforese capilar e HPLC (Alfaia, 2004; Önal, 2007; Gosetti *et al.*, 2007; Fraqueza *et al.*, 2012).

A determinação de aminas biogénicas em alimentos não é uma técnica simples, pois estas substâncias possuem estruturas químicas distintas e estão presentes em intervalos de concentração variáveis, por vezes muito baixas, e em matrizes muito complexas. A análise das aminas biogénicas em matrizes alimentares envolve essencialmente duas etapas, sendo a primeira baseada na extração das aminas a partir da matriz (alimento sólido) que, em alguns casos inclui uma purificação do extrato, e a segunda, a determinação analítica das aminas biogénicas (derivatização, separação, identificação e quantificação) que pode ser realizada através de uma variedade de abordagens, incluindo procedimentos enzimáticos, espectralfluorométricos e cromatográficos (Lavizzari *et al.*, 2006; Moret *et al.*, 2006; Vidal-Carou *et al.*, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e identificação das estirpes

3.1.1 Origem

O trabalho experimental foi realizado a partir de uma coleção de estirpes previamente isoladas de produtos cárneos fermentados/fumados e do ambiente de produção de indústrias da região do Alentejo. Estas estirpes estavam conservadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Scharlau, Espanha) com 1,5% de glicerol (Merck, Alemanha) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL).

Na Tabela 5 apresenta-se a identificação das estirpes bacterianas analisadas quanto ao género e espécie. Da coleção de estirpes da FMV, foram selecionadas, com base no seu potencial bacteriocinogénico e características tecnológicas, apenas as estirpes de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* identificadas genotipicamente por PCR.

3.1.2 Identificação genética

As estirpes de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* foram previamente identificadas por PCR/PCR Fingerprinting por Gonçalves (2009), Carvalho (2010) e Santos (2011), respetivamente.

Tabela 5: Origem e identificação das estirpes estudadas.

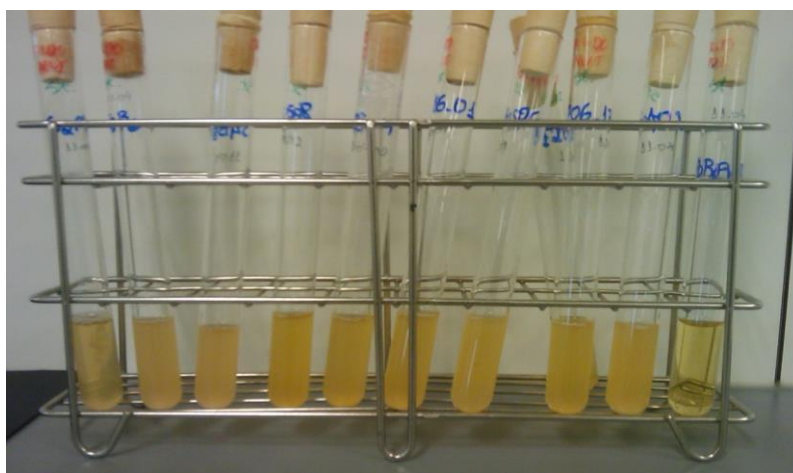
Código ID*	GÉNERO	ESPECIE	ORIGEM
PO5-4	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	Mesa
PO5-15	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Enchedora
PO5-50	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Massa de produtos após 48 h
PO5-51	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Produto acabado
PO5-67	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Produto acabado
PO5-108	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	Produto acabado
PO5-119	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	Mesa
PO5-28	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Produto acabado
PO6-23	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	Produto acabado
L2B5	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	Meio da cura
L2M2	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	Meio da cura
L3M5	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	Meio da cura
P2B2	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Meio da cura
P3B6	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Meio da cura
P3B7	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Meio da cura
P3B8	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Meio da cura
S4B6	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Meio da cura
CV2C2	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	Meio da cura
CV3C2	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	Produto acabado
CH2C3	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	Meio da cura
CH2C5	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	Meio da cura
CH3C7	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	Meio da cura
P3B3	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	Produto acabado
SG2C8	<i>Lactobacillus</i>	<i>sp</i>	Meio da cura
S2M7	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Superfície da picadora
S3M5	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Parede da sala de enchimento
S3B6	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Parede da sala de enchimento
S4B8	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Enchedora
PO6-8	<i>Staphylococcus</i>	<i>carneus</i>	Massa após enchimento
PO5-58	<i>Staphylococcus</i>	<i>carneus</i>	Produto acabado
PO5-74	<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum</i>	Caixa
PO6-01	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Alho
PO6-26	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Produto acabado
PO6-17	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Produto acabado
PO6-102	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Massa após enchimento
3L1.4	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Linguiça
9CP1Van 2	<i>Enterococcus</i>	<i>sp</i>	Chouriço Preto
12CP1.3	<i>Enterococcus</i>	<i>sp</i>	Chouriço Preto
13S2.2	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	Salsichão Alentejano
15S2.2	<i>Enterococcus</i>	<i>sp</i>	Salsichão Alentejano
20P2.1	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	Paio Ibérico

*Código ID – Código de identificação

3.2 Isolados de *Lactobacillus* e *Enterococcus* em estudo: avaliação da capacidade descarboxilativa

As estirpes de *Lactobacillus* e *Enterococcus* foram retiradas dos criotubos e através de micropipeta de 10 µL, foram transferidas para tubos contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Figura 3) e incubadas durante 24 horas a 37 °C, em aerobiose, para revivificação. O protocolo utilizado para avaliação da atividade descarboxilativa seguiu os parâmetros estabelecidos por Bover-Cid e Holzapfel (1999), Bover-Cid *et al.* (2001) e Latorre-Moratalla *et al.* (2010).

Figura 3: Tubos com turbidez após incubação em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Original).

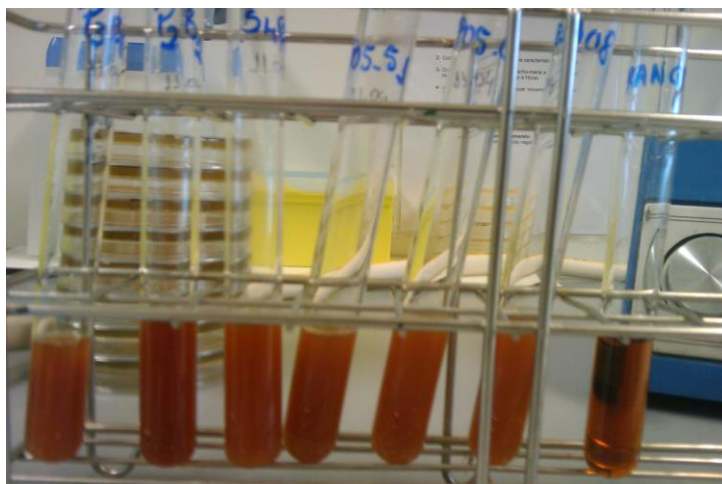


Após constatação de desenvolvimento através da turbidez do meio de cultura, foram retirados 10 µL da suspensão e transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo MRS (*Man, Rogosa and Sharpe broth* 1100661 Merck, Darmstadt, Germany) (Figura 4) para multiplicação de *Lactobacillus* e 5 mL de caldo Nutritivo Padrão (*Nutrient Standard broth* 107882, Merck, Darmstadt, Germany) para cultura e enriquecimento de *Enterococcus*.

Os meios líquidos de enriquecimento, caldo MRS (para BAL) e caldo Nutritivo Padrão (para *Enterococcus* e *Staphylococcus*) foram ambos adicionados dos aminoácidos livres precursores das aminas biogênicas, na concentração final de 0,1% (tirosina, monohidrocloridrato de lisina, monohidrocloridrato de ornitina e monohidrocloridrato de histidina), e suplementados com o cofator da reação de descarboxilação, 5-fosfato piridoxal a 0,005%, conforme Bover-Cid e Holzapfel (1999), Bover-Cid *et al.* (2001) e Latorre-Moratalla *et al.* (2010). O pH

estabelecido para o caldo MRS e para o caldo Nutritivo Padrão foram 6,2 e 7,5, respectivamente.

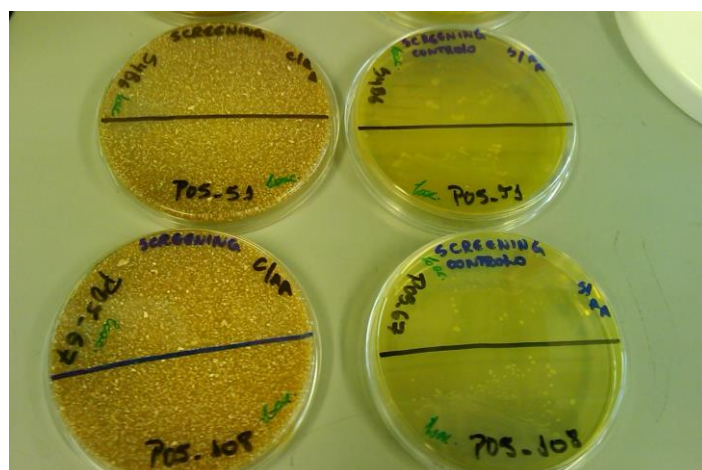
Figura 4: Tubos com caldo MRS (*Man, Rugosa and Sharpe*) inoculados com as estirpes em estudo apresentando turbidez após incubação (Original).



Os tubos foram incubados durante 48 horas a 37 °C em aerobiose. Após este período, foram retirados, com o auxílio de ansas calibradas, 10 µL dos respectivos meios e semeados em placas preparadas com meio descarboxilativo (*screening medium*) (Figura 5), com e sem (controle) os aminoácidos livres precursores (tirosina, monohidrocloridrato de histidina, monohidrocloridrato de lisina e monohidrocloridrato de ornitina) das aminas biogénicas em estudo sendo a concentração de cada um dos aminoácidos de 1%. Adicionou-se 5-fosfato de piridoxal ao meio, como cofator na reação de descarboxilação, de modo a favorecer a expressão da atividade descarboxilativa.

A presença de Tween 80 e citrato de amónia ao meio favorece o desenvolvimento das BAL e a adição da tiamina (vitamina B1) torna-se importante para a multiplicação das mesmas, pois auxilia as células no metabolismo da glicose. O fosfato dipotássico e o carbonato de cálcio adicionados ao meio favorecem o efeito tampão e neutralizam os ácidos produzidos durante a multiplicação bacteriana. O pH da agarose descarboxilativa (*screening medium*) foi 5,3. Estas condições favorecem a síntese e a atividade das enzimas descarboxilases, não interferindo no desenvolvimento bacteriano, principalmente das enterobactérias, o mesmo não ocorrendo com as BAL que são tolerantes e crescem a pH 5,0. O caldo, após elaboração, foi autoclavado a 121 °C durante 10 minutos, de forma a evitar excessiva hidrólise do agar a pH baixo. As placas foram semeadas e incubadas durante 96 horas a 37 °C em aerobiose.

Figura 5: Placas das estirpes em estudo em meio descarboxilativo (*screening medium*) após incubação com e sem (controlo) aminoácidos (Original).



Em seguida, após verificação da multiplicação dos microrganismos em estudo, por mudança de coloração do meio amarelo para roxo ou através da formação de um halo no local da sementeira, indicando consumo dos aminoácidos presentes em placa, as colónias foram removidas com ansa de 10 μ L e transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo descarboxilativo (*screening medium*) sem agar, ou seja meio líquido, que para além dos aminoácidos livres precursores e de 5-fosfato de piridoxal estabelecidos por Bover-Cid e Holzapfel (1999), foram ainda adicionados de triptofano e fenilalanina, aminoácidos livres precursores das aminas triptamina e feniletilamina, respetivamente. Os tubos foram incubados durante 96 horas a 37 °C em aerobiose.

Figura 6: Tubos com caldo descarboxilativo (*screening medium*) após incubação (Original).



Após incubação, cada tubo foi agitado em vórtex e retirou-se 2 mL de meio, transferidos para *eppendorfs* de 2 mL, os quais foram centrifugados a 12000 r.p.m. durante 5 minutos (*Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Alemanha*) (Figura 7). A 1 mL do sobrenadante adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico 0,1 N (HCl, *Panreac, Madrid, Espanha*) (Figura 8).

Figura 7: *Eppendorfs* com 2 mL de caldo descarboxilativo submetidos a centrifugação (Original).

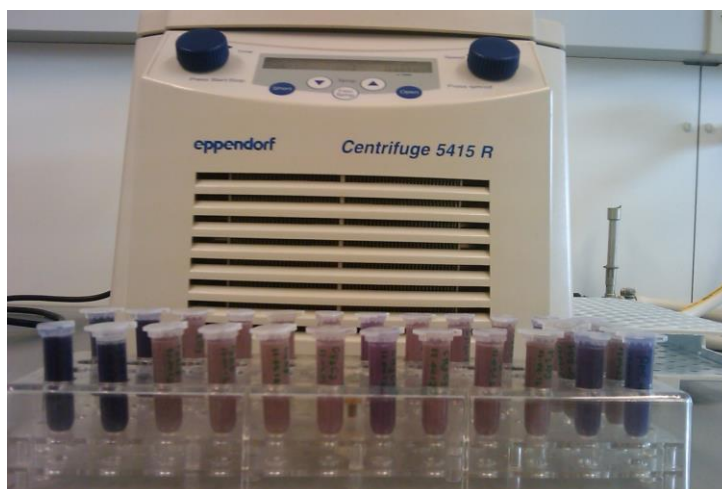
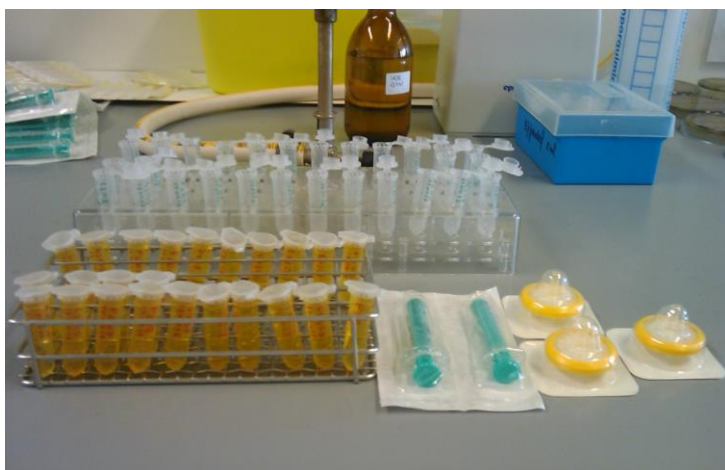


Figura 8: Adição de 1 mL de HCl 0,1 N ao sobrenadante (Original).



Em seguida, centrifugou-se novamente nas condições descritas anteriormente, e o sobrenadante foi filtrado com filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ (*Millipore Corp., Bedford, MA, E.U.A.*). As amostras foram conservadas a $-20\ ^\circ\text{C}$ até à sua análise por HPLC.

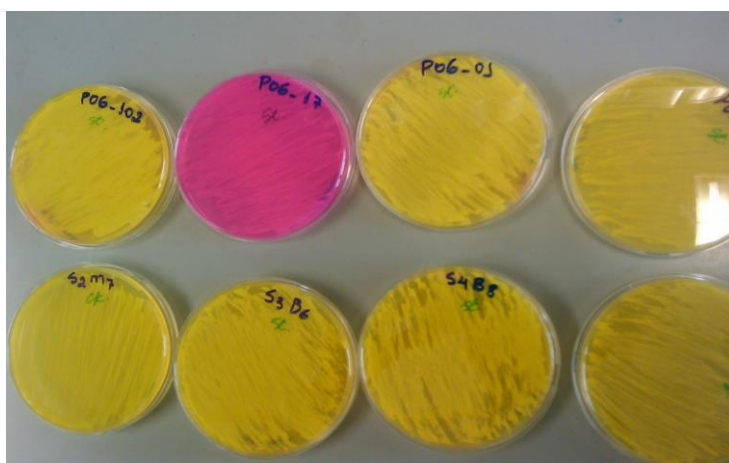
Figura 9: Filtração do extrato bacteriano com filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ (Original).



3.3 Isolados de *Staphylococcus* em estudo: avaliação da capacidade descarboxilativa

As estirpes de Estafilococos foram retiradas da suspensão contida nos criotubos com micropipeta de 10 μ L, semeadas em placas preparadas com meio Manitol e incubadas durante 24 horas a 37 °C em aerobiose para revivificação. Foram consideradas positivas as placas que mudaram de coloração (de castanho para amarelo ou rosa) (Figura 10).

Figura 10: Placas semeadas em meio Manitol após incubação (Original).



Retirou-se, com ansa calibrada, 10 μ L de colónias transferido-as para tubos contendo 5 mL de Caldo Nutritivo Padrão, o qual continha os aminoácidos precursores das aminas biogénicas. Os referidos tubos foram incubados durante 48 horas a 37 °C em aerobiose. De seguida, foram retirados 10 μ L do meio com ansa e semeados em placas preparadas com meio de agar descarboxilativo (*screening medium*), com e sem (meio controlo) os aminoácidos livres precursores das aminas biogénicas em estudo e 5-fosfato de piridoxal. As placas semeadas foram incubadas durante 96 horas a 37 °C em aerobiose. A confirmação de multiplicação dos microrganismos em estudo foi observada por mudança de coloração do meio de amarelo para roxo ou através da formação de um halo. Posteriormente, as colónias foram removidas das placas com ansa de 10 μ L e transferidas para tubos com 10 mL de caldo descarboxilativo (*screening medium*) sem agar que, para além dos aminoácidos precursores a 0,1% e de 5-fosfato de piridoxal estabelecidos por Bover-Cid e Holzapfel (1999), foram ainda adicionados dos aminoácidos triptofano e fenilalanina. Os tubos foram incubados durante 96 horas a 37 °C em aerobiose.

Após incubação (Figura 6), cada tubo foi agitado em vórtex, retirou-se-se 2 mL de meio transferindo-os para *ependorfs*, os quais foram centrifugados (Figura 7) a 12 000 r.p.m. durante 5 minutos (*Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Alemanha*). A 1 mL do sobrenadante (Figura 8) adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico 0,1 N (HCl, *Panreac, Madrid, Espanha*). Em seguida, centrifugou-se novamente nas condições descritas anteriormente, e o sobrenadante foi filtrado com filtros de 0,45 µm (Figura 9). As amostras foram conservadas a - 20 °C até à sua análise por HPLC.

3.4 Determinação de aminas biogénicas

3.4.1 Preparação de soluções

Solução saturada de carbonato de sódio na concentração 0,2 g/mL

Dissolução de 2 g de carbonato de sódio em 10 mL de água *Milli-Q*.

Solução de padrão interno - PI (1,7-diaminoheptano), na concentração 1mg/mL

Dissolução de 25 mg do padrão interno em 25 mL de água *Milli-Q*.

Solução de padrão interno de trabalho na concentração 100 µg/mL

Retirar 2,5 mL da solução do padrão interno a 1 mg/mL e perfazer a 25 mL com água *Milli-Q*. Conservar a 4 °C durante 1 mês.

Solução-mãe padrão da mistura de oito sais das aminas biogénicas na concentração 1 mg/mL

Dissolução de 25 mg (0,025 g) de cada um dos sais de aminas biogénicas: dicloridrato de cadaverina, dihidrocloridrato de putrecina, hidrocloreidrato de tiramina, dicloridrato de histamina, tetrahydrocloridrato de espermina, dicloridrato de espermidina, hidrocloreidrato de triptamina e hidrocloreidrato de feniletilamina (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.*) em 25 mL de água *Milli-Q*. Conservar a 4 °C durante 1 mês.

Solução de trabalho padrão da mistura dos sais de 8 aminas na concentração 100 µg/mL

Retirar 1 mL da solução-mãe e adicionar de 9 mL de água *Milli-Q*. Conservar a 4 °C durante 1 semana.

Solução do reagente de derivatização na concentração 5 mg/ml

Dissolução de 5 mg de cloreto de dansilo em 1 mL de acetona. Preparação extemporânea e protegida da luz.

Fase móvel para HPLC

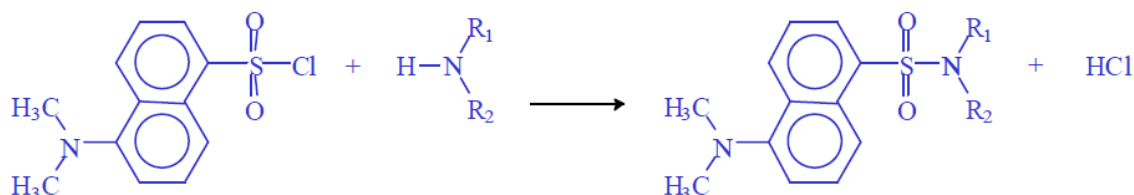
Solvente A: Água Milli-Q

Solvente B: Acetonitrilo de grau cromatográfico LiChrosolv (E. Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.4.2 Procedimento técnico

A derivatização e quantificação das 8 aminas biogénicas na amostra foram realizadas de acordo com Smela *et al.* (2003). Ao extrato bacteriano (diluição 1:10 ou 1:20) foi adicionado 100 µL de padrão interno na concentração de 100 µg/mL e 500 µL de solução saturada de carbonato de sódio. O extrato foi agitado em vórtex durante 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de cloreto de dansilo (DnsCl) na concentração de 5 mg/mL, agitou-se em vórtex e os extratos foram incubados no escuro durante 1 hora à temperatura ambiente. Terminada a reação de derivatização (Figura 11), adicionou-se 250 µL de amónia a 25% para remoção do excesso de DnsCl e deixou-se em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, as aminas foram extraídas com 1 mL de éter dietílico e agitou-se em vórtex durante 2 minutos. Aspirou-se a fase orgânica para um outro tubo de vidro. Procedeu-se a uma centrifugação a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. Adicionaram-se mais 2 vezes 1 mL de éter dietílico efectuando-se o mesmo procedimento anterior. As fases orgânicas foram recolhidas para o mesmo tubo de vidro e evaporou-se sob corrente de azoto. Ao resíduo seco adicionou-se 1 mL de acetonitrilo de grau cromatográfico. As amostras foram filtradas por filtro de 0,45 µm para frascos (*vials*) de 1,5 mL e uma alíquota de 10 µL do extrato bacteriano foi injetada, com o auxílio de uma micro-seringa, no cromatógrafo líquido de alta pressão. Os derivados dansilados dos padrões de aminas biogénicas foram preparados em simultâneo com as amostras. Em paralelo, preparou-se um branco que consiste em todos os reagentes utilizados nesta técnica com exceção da amostra. Ao branco adicionou-se, tal como às amostras e soluções padrão das aminas biogénicas em estudo, 100 µL de padrão interno na concentração de 100 µg/mL.

Figura 11: Reação de derivatização das aminas com cloreto de dansilo (Alfaia, 2002).



A identificação, separação e quantificação dos derivados dansilados das aminas foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC). A separação

realizou-se em coluna Zorbax Eclipse XDB C8 150 cm x 4.6 mm, 5 μ m, colocada num forno termostaticável a uma temperatura controlada de 40 °C. Na separação foi ainda usado um gradiente de eluição, constituído por dois solventes (A e B): Água Milli Q (solvente A) e acetonitrilo Lichrosolv (solvente B) (Tabela 6). O fluxo de injeção foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção de 10 μ L com deteção na região do UV (254 nm) e o tempo de análise foi de 20 minutos.

Tabela 6: Gradiente de eluição usado na análise de amins biogénicas por HPLC.

Tempo (min)	0	7	10	12	16	20
Solvente A (%)	40	35	20	10	0	40
Solvente B (%)	60	65	80	90	100	60

3.4.3 Cálculos e controlo do método

A validação do método analítico utilizado para separar e quantificar as amins biogénicas consideradas neste estudo, teve por objetivo verificar e otimizar as condições operativas propostas por Smela *et al.* (2003), e portanto ser digno de confiança. Neste sentido, procedeu-se a um conjunto objetivo de determinações experimentais com vista a identificar e minimizar as possíveis causas de erros sistemáticos e/ou aleatórios e a seleccionar as condições de ensaio mais adequadas e que conduzam a resultados finais credíveis.

De acordo com a USP 25 (*The United States Pharmacopoeia*) e a FDA (*Food and Drug Administration*) (2000) os parâmetros analíticos que tipicamente se utilizam para validar um método experimental, e que foram considerados neste estudo, são a especificidade, a linearidade, a exactidão, a precisão, intervalo de aplicação e limites de deteção e de quantificação:

A especificidade, ou capacidade do método de identificar inequivocamente o analito numa matriz livre de compostos interferentes, foi avaliada, em simultâneo com a exactidão, através do cálculo das taxas de recuperação para cada amina biogénica considerada. Assim, e nesse sentido, reforçou-se o extracto da cultura com quantidades crescentes dos sais das 8 amins biogénicas, e avaliaram-se os cromatogramas.

A linearidade do método analítico foi avaliada pela capacidade de, através de uma transformação matemática bem definida, reproduzirmos a variação da resposta cromatográfica em função da concentração do analito, na gama de trabalho considerada. Neste trabalho a

linearidade foi testada utilizando várias diluições da solução de trabalho padrão da mistura dos sais de 8 aminas a 100 µg/mL de modo a abranger uma gama de concentrações das aminas biogénicas em estudo compreendidas entre 0,29-16,29 µg/mL. As soluções foram injetadas em duplicado. Partindo do pressuposto de existir uma proporcionalidade entre a razão da área das aminas biogénicas e da área do padrão interno (variável dependente) e a razão da concentração em aminas biogénicas e a concentração do padrão interno (variável independente), dentro de determinado intervalo de concentrações (método do padrão interno), procedeu-se à verificação da linearidade através da representação gráfica dos valores observados (curva de calibração) e do seu coeficiente de determinação (R^2).

O limite de deteção (LD) é definido como sendo a menor concentração do analito na amostra que pode ser detetado mas não necessariamente quantificado como um valor exato. Estando diretamente relacionado com as curvas de calibração, o LD expresso em µg/mL, foi calculado a partir da expressão:

$$y_{LD} = a + 3 \cdot \sigma(A_a/A_{pi})$$

sendo a o coeficiente de regressão da razão A_a/A_{pi} em função da razão C_a/C_{pi} e $\sigma(A_a/A_{pi})$ o desvio padrão associado à razão A_a/A_{pi} , ou seja, $A_a/A_{pi} = a + a_i \cdot ([\text{amina } (\mu\text{g/mL})]/[pi (\mu\text{g/mL})])$.

Por sua vez o limite de quantificação (LQ) obteve-se pela expressão:

$$y_{LQ} = a + 10 \cdot \sigma(A_a/A_{pi})$$

A precisão foi avaliada pelo grau de concordância entre resultados individuais, obtidos pela aplicação repetida do método analítico a diferentes alíquotas da mesma amostra. Neste trabalho considerou-se a repetibilidade e a precisão intermédia do método no laboratório de trabalho.

Para o estudo da repetibilidade, e segundo a FDA, efetuaram-se 10 determinações de uma mesma solução padrão da mistura dos sais de 8 aminas biogénicas e de uma amostra, tratadas e analisadas, tal como se descreveu em 3.4.2 (Procedimento técnico).

Para a precisão intermédia efetuaram-se 5 determinações, em duplicado, em 5 dias consecutivos, de uma solução padrão da mistura dos sais de 8 aminas biogénicas e de uma amostra de extrato bacteriano.

Para avaliar a exatidão do método fez-se um estudo das taxas de recuperação do método de extração e derivatização. Para tal, adicionaram-se a diferentes tomas da mesma amostra, quantidades conhecidas de uma solução padrão da mistura dos sais de 8 aminas biogénicas em concentrações no intervalo $[12,5-100]/\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida tratou-se e analisou-se a amostra com e sem adição das aminas tal como indicado em 3.4 (determinação das aminas).

3.4.3.1 Análise qualitativa

A identificação das aminas biogénicas nas amostras foi baseada na determinação dos tempos de retenção de padrões individuais dessas aminas. A comparação com o cromatograma da solução padrão de trabalho foi útil na localização e identificação dos derivados dansilados das aminas.

3.4.3.2 Análise quantitativa

A quantificação das aminas biogénicas foi efetuada por integração automática das respetivas áreas, através do método de adição do padrão interno. As concentrações das aminas biogénicas estudadas foram calculadas a partir de curvas de calibração traçadas a partir da razão entre as áreas dos picos cromatográficos das aminas padrão e do padrão interno e a razão entre diferentes concentrações $[0,5 - 20,0/\mu\text{g mL}^{-1}]$ das soluções padrão da mistura dos sais das 8 aminas preparadas e a concentração do padrão interno $[10 \mu\text{g/mL}]$. O padrão interno escolhido foi o 1,4-diaminoheptano por não co-eluir com qualquer das aminas biogénicas detectadas, separadas e quantificadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação do método de determinação das aminas biogénicas por HPLC

Os resultados dos parâmetros analíticos utilizados para a validação do método de determinação das aminas biogénicas foram estabelecidos da seguinte forma:

4.1.1 Especificidade

Para avaliar a especificidade do método analítico analisaram-se os cromatogramas de um branco adicionado de solução de padrão interno (Figura 12), de uma solução padrão da mistura dos sais das 8 aminas biogénicas (hidrocloridrato de triptamina, hidrocloridrato de 2-feniletilamina, dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, dicloridrato de histamina, hidrocloridrato de tiramina, dicloridrato de espermidina e tetrahydrocloridrato de espermina) (figura 13), da amina biogénica padrão (triptamina) a 100 µg/mL (Figura 14) e ainda de um extrato fortificado com espermidina (Figura 15).

Figura 12: Cromatograma do branco com solução de padrão interno (PI, 1,7- diaminoheptano) a 100 µg/mL.

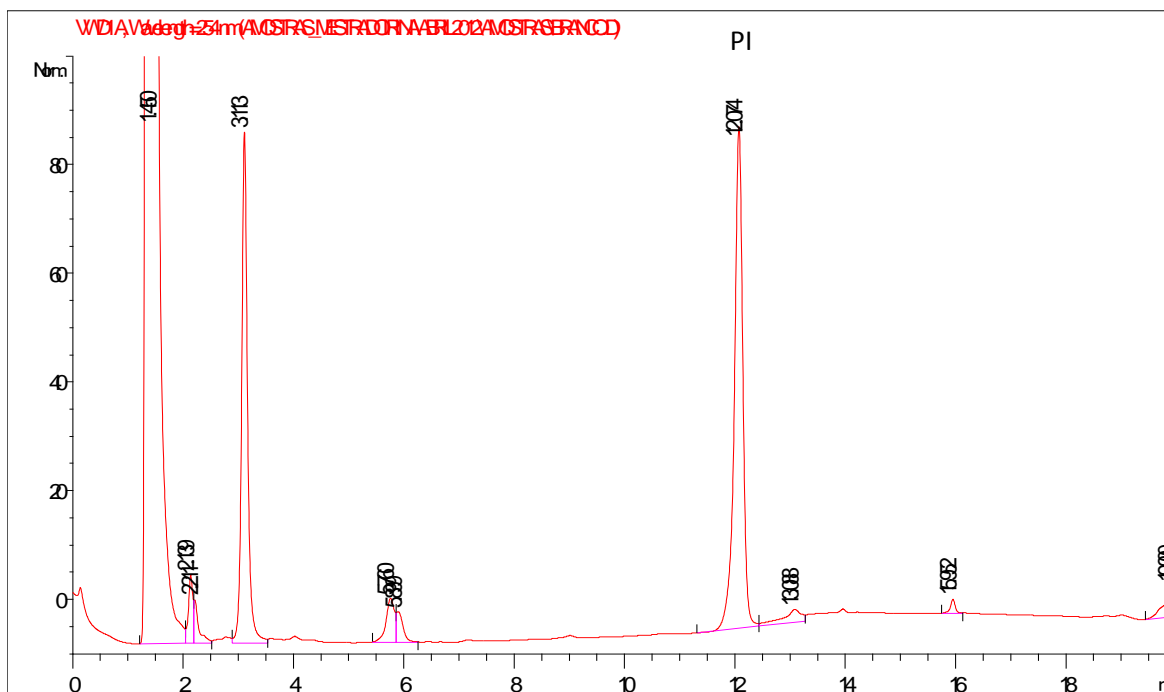


Figura 13: Cromatograma da solução padrão da mistura dos sais das 8 aminas biogênicas a 25 µg/mL com solução de padrão interno a 100 µg/mL.

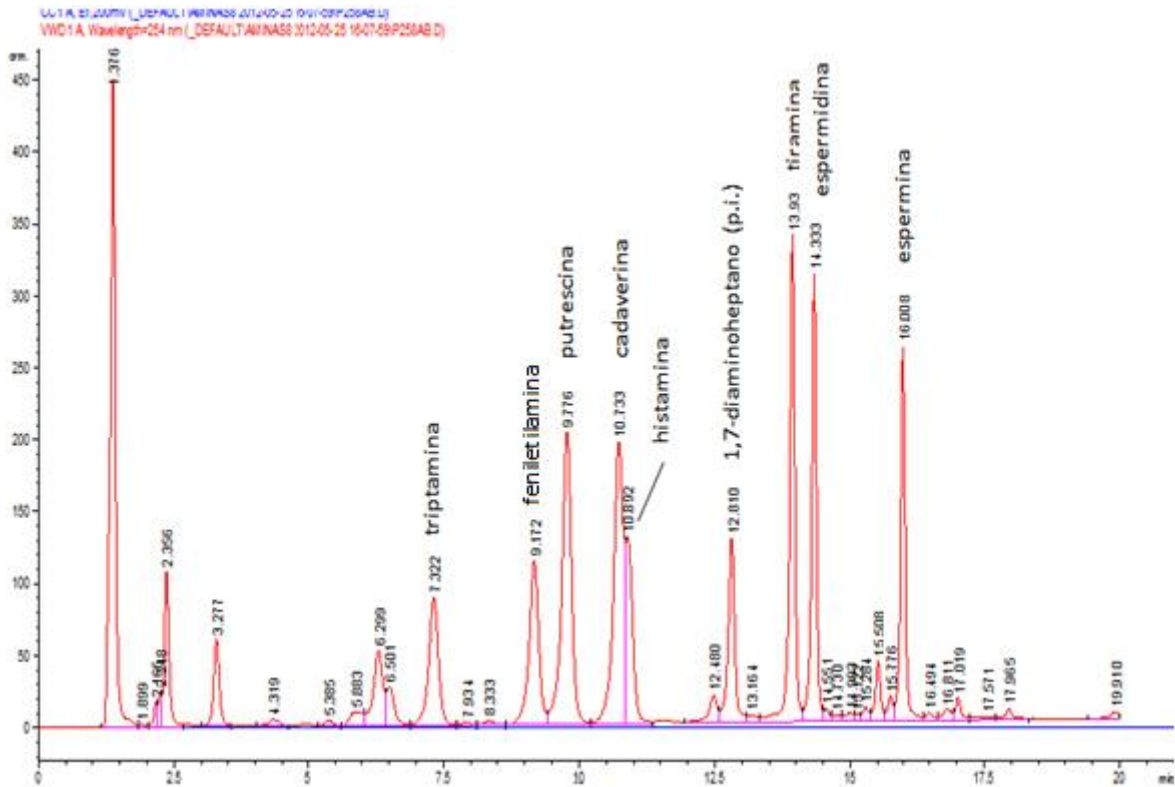


Figura 14: Cromatograma da solução padrão de triptamina a 100 µg/mL.

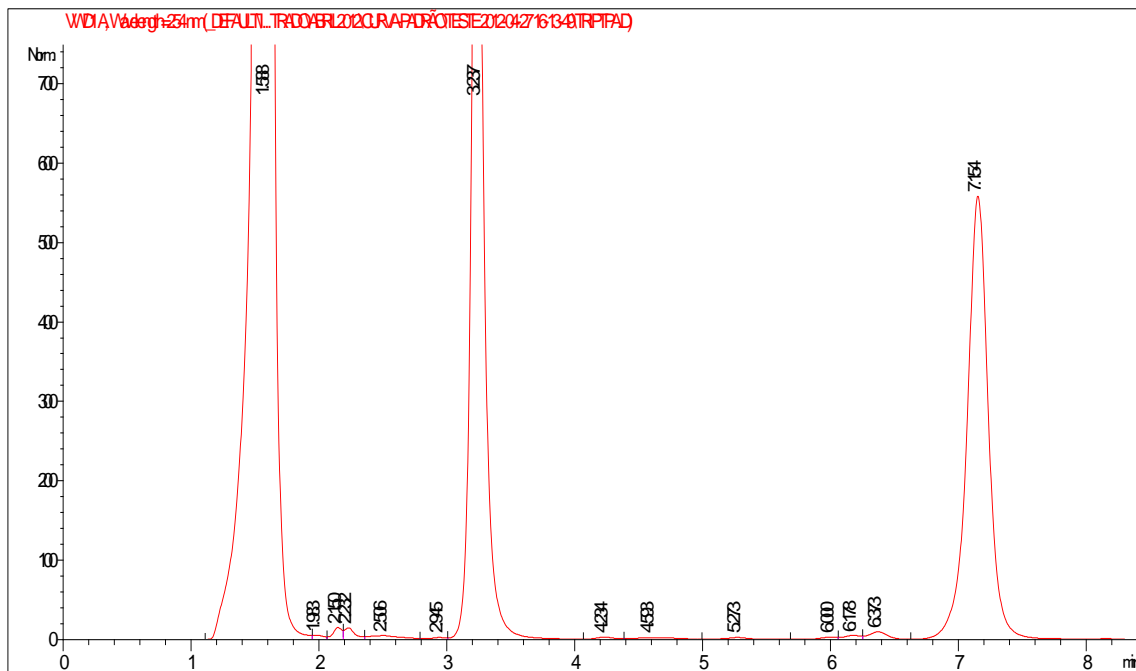
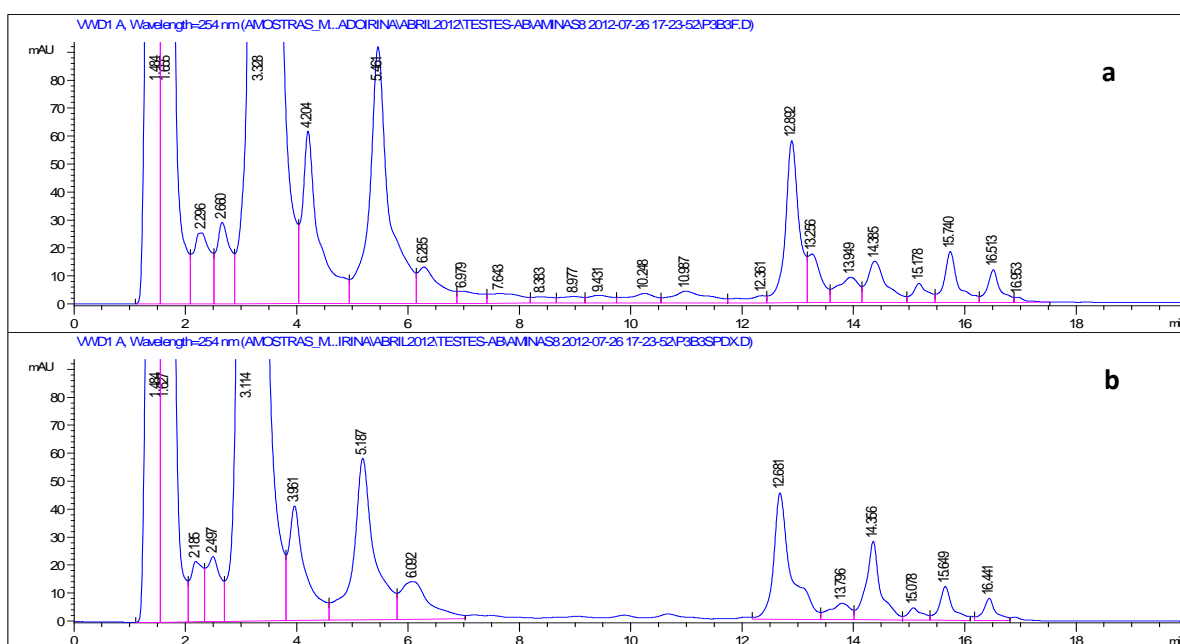


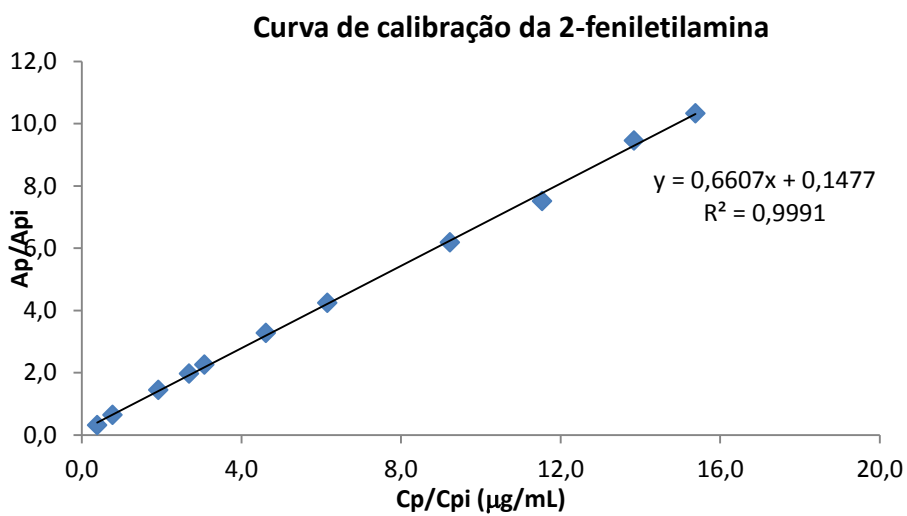
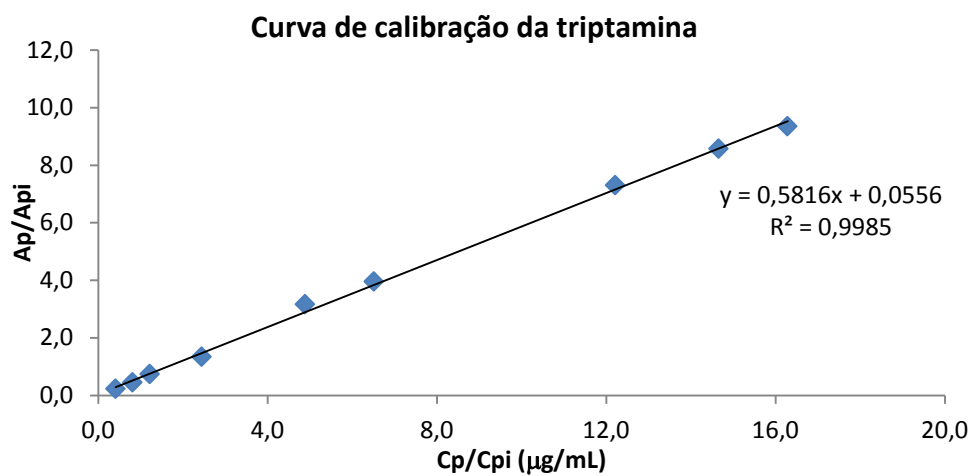
Figura 15: Cromatograma da análise da amostra (a) e da mesma amostra fortificada com espermidina (b).



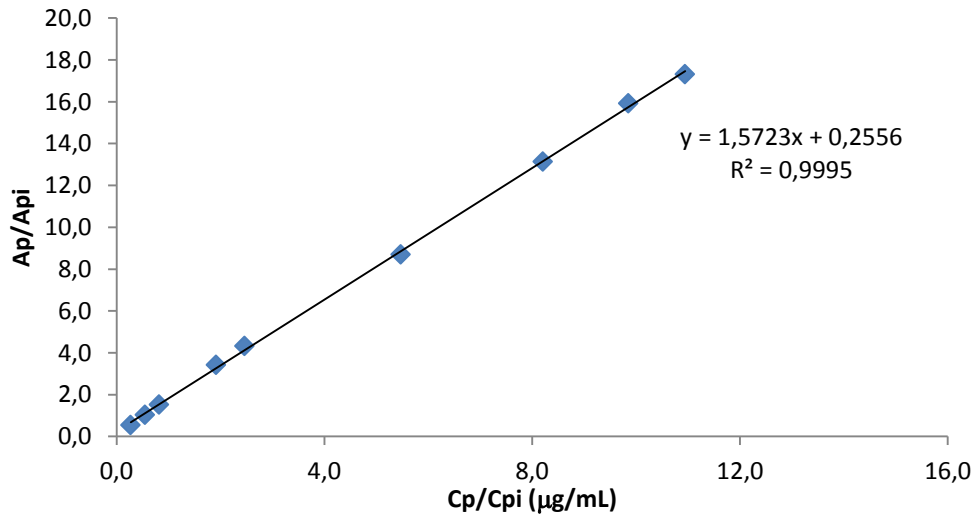
4.1.2 Linearidade

A linearidade da resposta cromatográfica foi avaliada através da razão entre as áreas A_a/A_{pi} de cada amina biogénica padrão e do padrão interno em função da razão entre a concentração de cada amina padrão e a concentração do padrão interno. Considerou-se que a razão A_a/A_{pi} apresenta uma resposta linear muito satisfatória em função de C_a/C_{pi} , sendo esta relação utilizada como curva padrão ou curva de calibração para cada amina biogénica. Em seguida, apresentam-se graficamente (Figura 16) as curvas de calibração para cada amina, nomeadamente, as retas consideradas para o estudo da linearidade.

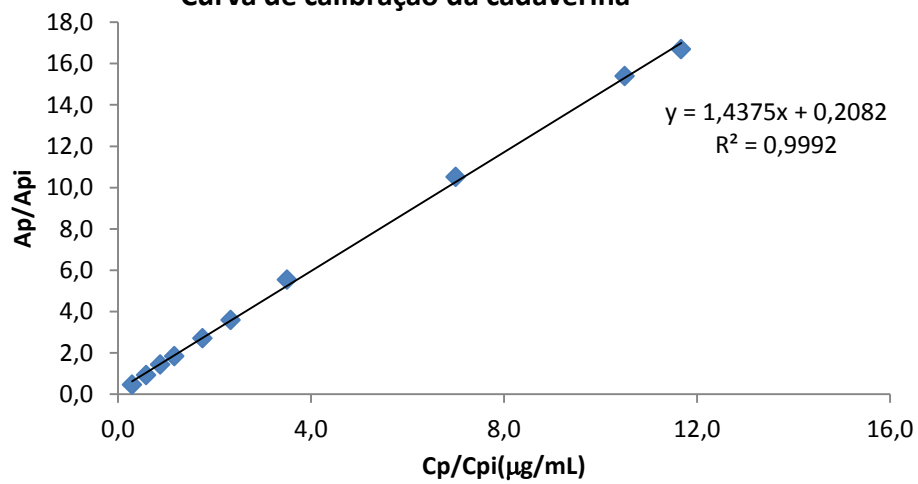
Figura 16: Curvas padrão das aminas biogénicas em estudo.



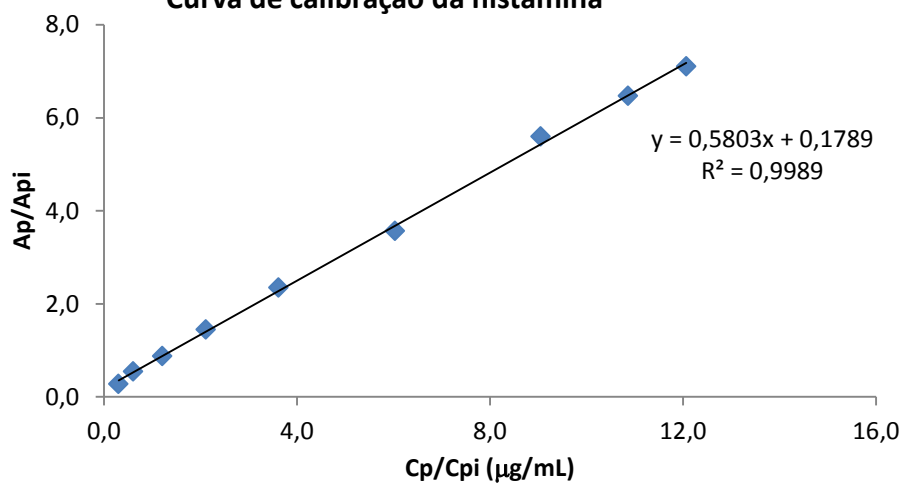
Curva de calibração da putrescina

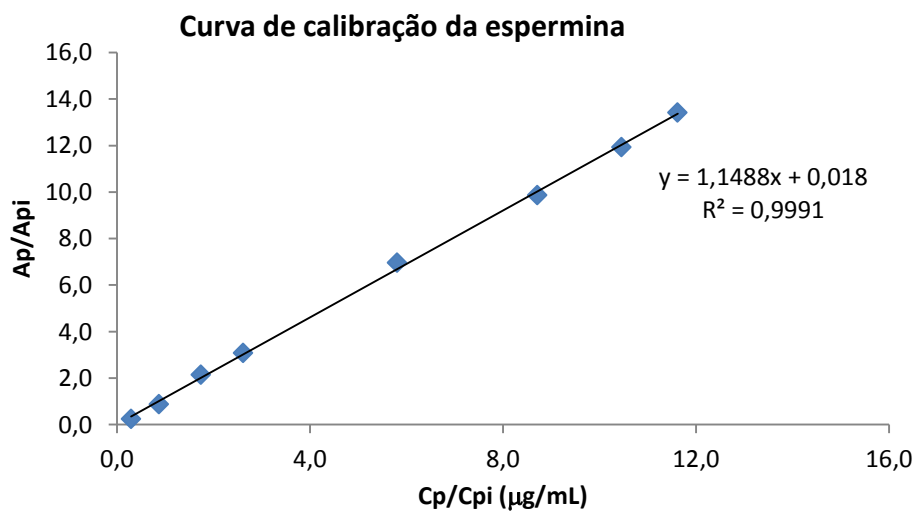
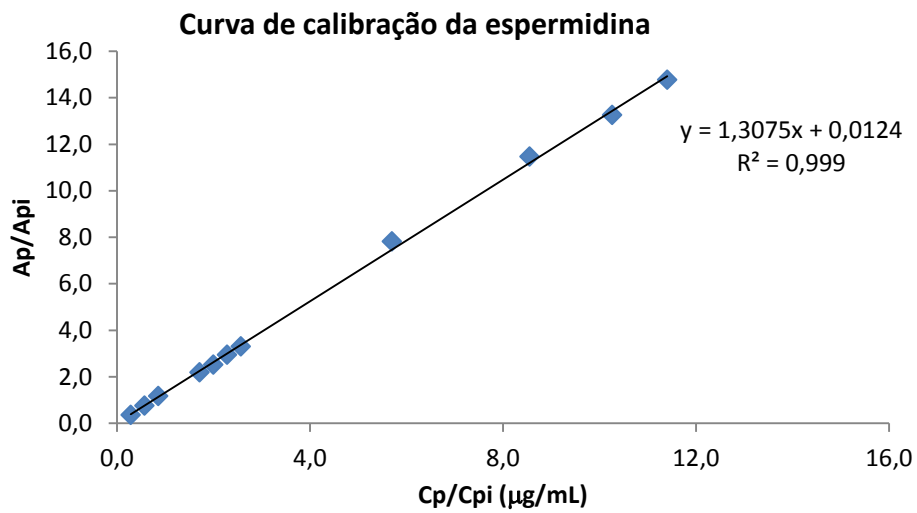
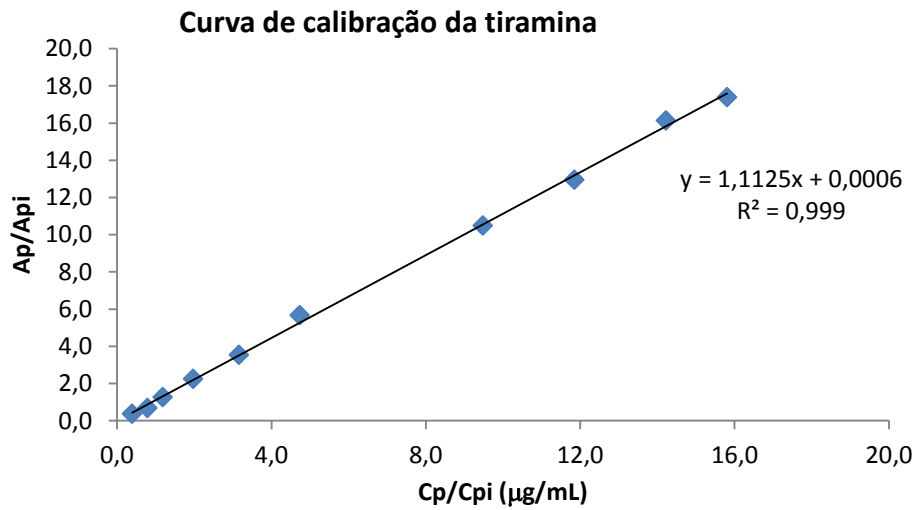


Curva de calibração da cadaverina



Curva de calibração da histamina





4.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores obtidos para os limites de detecção (LD), expressos em $\mu\text{g/mL}$ e para os limites de quantificação (LQ), expressos em $\mu\text{g/mL}$, estão apresentados na Tabela 7:

Tabela 7: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de determinação de aminas biogénicas.

Amina	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
TRP	0,39	1,31
PHE	0,25	0,83
HIS	0,31	1,02
TYR	0,28	0,94
CAD	0,17	0,58
PUT	0,15	0,50
SPM	0,25	1,64
SPD	0,18	1,18

TRP, Triptamina; PHE, 2-Feniletilamina; PUT, Putrescina; CAD, Cadaverina; HIS, Histamina; TYR, Tiramina; SPD, Espermidina; SPM, Espermina

O limite de quantificação foi estipulado como sendo 3 vezes maior que o limite de detecção para a maioria das aminas biogénicas, com exceção dos valores encontrados para a espermina e espermidina que foram 6,5 vezes maior.

4.1.4 Precisão

Para o estudo da repetibilidade, que expressa a precisão do método de ensaio sob as mesmas condições operativas num curto intervalo de tempo, efetuaram-se 10 determinações de uma mesma solução padrão da mistura dos sais das 8 aminas biogénicas na concentração $5 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 8) e de uma amostra (Tabela 9).

Tabela 8: Repetibilidade na quantificação das aminas biogénicas na solução padrão da mistura dos 8 sais das aminas biogénicas a 5 µg/mL.

Amina	n	Média [amina](µg/mL)	d.p.	CV (%)
TRP	10	3,02	0,1	3,7
PHE	10	1,85	0,1	4,4
PUT	10	1,62	0,0	1,0
CAD	10	1,71	0,0	2,4
HIS	10	1,98	0,1	3,0
TYR	10	3,24	0,0	1,2
SPD	10	2,88	0,1	1,8
SPM	10	2,37	0,0	2,1

TRP, Triptamina; PHE, 2-Feniletilamina; PUT, Putrescina; CAD, Cadaverina; HIS, Histamina; TYR, Tiramina; SPD, Espermidina; SPM, Espermina; d.p. = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Tabela 9: Repetibilidade na quantificação das aminas biogénicas numa amostra de extrato bacteriano.

Amina	n	Média [amina](mg/mL)	d.p.	CV (%)
TRP	10	62,5	3,4	5,4
PHE	10	152,7	5,2	3,4
PUT	10	55,7	0,9	1,7
CAD	10	n.d.		
HIS	10	n.d.		
TYR	10	3088,6	63,5	2,1
SPD	10	n.d.		
SPM	10	3,1	0,1	4,1

TRP, Triptamina; PHE, 2-Feniletilamina; PUT, Putrescina; CAD, Cadaverina; HIS, Histamina; TYR, Tiramina; SPD, Espermidina; SPM, Espermina; n.d. = não detetado; d.p. = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Os coeficientes de variação obtidos para os ensaios de repetibilidade são inferiores a 8% e semelhantes em ambos os testes efetuados (padrão e amostra), verificando-se uma diferença mais significativa no caso da espermina: $CV[espermina_{amostra}] \approx 2 \cdot CV([espermina_{padrão}])$.

Para a precisão intermédia, que expressa a precisão do mesmo procedimento experimental impondo uma variável exterior ao método (por exemplo, ensaios em diferentes dias),

efetuaram-se 5 determinações, em duplicado e em 5 dias consecutivos, de uma solução padrão da mistura dos sais das 8 aminas biogénicas na concentração 5 µg/mL (Tabela 10) e de uma amostra de extrato bacteriano (Tabela 11).

Tabela 10: Precisão intermédia na quantificação das aminas biogénicas na solução padrão da mistura dos 8 sais das aminas biogénicas a 5 µg/mL.

Amina	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Média	d.p.	CV (%)
TRP	2,89	2,92	2,84	2,90	2,95	2,99	2,85	2,98	2,97	2,58	2,89	0,121	4,2
PHE	1,75	1,84	1,81	1,84	1,65	1,63	1,55	1,66	1,67	1,72	1,71	0,098	5,7
PUT	1,61	1,61	1,69	1,72	1,59	1,58	1,61	1,73	1,74	1,72	1,66	0,065	3,9
CAD	1,63	1,71	1,66	1,64	1,66	1,58	1,57	1,77	1,50	1,59	1,63	0,077	4,7
HIS	2,06	2,05	2,21	2,33	2,14	2,09	2,33	2,10	2,03	2,23	2,16	0,111	5,2
TYR	3,29	3,22	3,23	3,27	2,90	3,01	2,95	2,96	2,90	3,17	3,09	0,161	5,2
SPD	2,94	2,87	2,86	2,99	2,97	2,91	3,00	3,06	3,14	2,72	2,95	0,118	4,0
SPM	2,44	2,35	2,36	2,62	2,21	2,22	2,68	2,60	2,31	2,16	2,40	0,186	7,7

TRP, Triptamina; PHE, 2-Feniletilamina; PUT, Putrescina; CAD, Cadaverina; HIS, Histamina; TYR, Tiramina; SPD, Espermidina; SPM, Espermina; d.p. = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Tabela 11: Precisão intermédia na quantificação das aminas biogénicas numa amostra de extrato bacteriano.

Amina	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Média	d.p.	CV (%)
TRP	45,9	38,3	36,9	36,3	39,3	39,7	43,1	37,0	43,9	36,8	39,7	3,40	8,5
PHE	148,2	146,8	140,7	145,4	142,9	150,9	133,6	158,4	140,3	150,0	145,7	6,85	4,7
PUT	53,6	53,4	49,0	55,5	50,4	55,8	51,2	58,6	58,9	58,2	54,5	3,54	6,5
CAD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HIS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TYR	3045,2	3051,9	3120,1	2976,7	3583,2	3432,1	3415,0	3279,3	3161,1	3347,2	3241,2	200,43	6,2
SPD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPM	3,2	3,1	2,4	2,7	2,9	2,8	2,5	2,6	2,3	2,5	2,7	0,29	10,8

TRP, Triptamina; PHE, 2-Feniletilamina; PUT, Putrescina; CAD, Cadaverina; HIS, Histamina; TYR, Tiramina; SPD, Espermidina; SPM, Espermina; d.p. = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Os coeficientes de variação obtidos para os ensaios de precisão intermédia são inferiores a 11%. Os resultados obtidos na precisão intermédia de quantificação das aminas biogénicas

numa amostra de extrato bacteriano revelaram-se, na sua maioria, superiores aos obtidos com a solução padrão de aminas, verificando-se diferença mais significativa para a triptamina: $CV([\text{triptamina}_{\text{amostra}}]) \approx 2 \cdot CV([\text{triptamina}_{\text{padrão}}])$.

4.1.5 Exatidão

A exatidão do método analítico utilizado é a sua capacidade de obter valores quantitativos dos analitos próximos dos valores reais. Não existindo um método analítico de referência, de modo que os resultados pudessem ser comparados, neste trabalho, a exatidão foi avaliada através do estudo das taxas de recuperação. Assim, a partir da solução de trabalho padrão dos sais das 8 aminas biogénicas, foram retirados 100 μL , 50 μL , 25 μL e 12,5 μL da solução padrão a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e adicionados à amostra. Em seguida tratou-se e analisou-se cada toma de ensaio, com e sem adição das aminas, tal como indicado no tópico 4.3 (Determinação de aminas biogénicas). Na Tabela 12 são apresentadas as taxas de recuperação das aminas biogénicas numa amostra de extrato bacteriano.

4.1.6 Análise descritiva

Os parâmetros de estatística descritiva calculados para as observações de cada variável em estudo foram:

a média aritmética, \bar{x} ,

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

o desvio padrão, $\sigma(x)$,

$$\sigma(x) = \sqrt{\frac{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x\right)^2}{n(n-1)}}$$

e o coeficiente de variação, $cv(x)$,

$$cv(x)\% = \frac{\sigma(x)}{\bar{x}} \cdot 100$$

Tabela 12: Taxas de recuperação das aminas biogénicas numa amostra de extrato bacteriano a diferentes concentrações.

Amina	[amina] (mg/L)		Taxa de recuperação (T _R)/%							
	A ^e	A ^f	valores parciais				valores totais			
			T _R	T _R (média)	d.p.	CV (%)	T _R (média)	d.p.	CV (%)	
Triptamina	0,9	a	68,8 68,0	84,5 83,5	84,0	0,5	0,6	81,6	0,5	0,6
		b	33,5 33,6	82,3 82,5	82,4	0,1	0,2			
		c	16,6 16,1	81,4 79,0	80,2	1,2	1,5			
		d	8,1 8,2	79,6 80,1	79,9	0,3	0,3			
2- Feniletilamina	5,5	a	73,6 72,3	95,7 94,0	94,9	0,9	0,9	98,3	1,3	1,3
		b	38,0 37,0	98,9 96,2	97,6	1,3	1,4			
		c	20,3 19,2	105,4 99,8	102,6	2,8	2,7			
		d	9,4 9,4	98,1 98,3	98,2	0,1	0,1			
Putrescina	1,0	a	46,2 45,7	84,4 83,5	83,9	0,4	0,5	82,7	1,3	1,6
		b	23,0 23,3	84,1 85,3	84,7	0,6	0,7			
		c	11,4 10,7	83,5 77,9	80,7	2,8	3,5			
		d	5,5 5,7	80,2 82,8	81,5	1,3	1,6			
Cadaverina	n.d.	a	46,2 47,7	80,0 81,7	80,8	0,8	1,0	77,9	0,7	0,9
		b	23,0 22,9	78,9 78,3	78,6	0,3	0,4			
		c	11,3 11,0	77,5 75,6	76,6	1,0	1,3			
		d	5,5 5,6	74,9 76,5	75,7	0,8	1,0			
Histamina		a	27,1	44,9	44,2	0,7	1,5			

Amina	[amina] (mg/L)		Taxa de recuperação (T _R)/%								
	A ^e	A ^f	valores parciais				valores totais				
			T _R	T _R (média)	d.p.	CV (%)	T _R (média)	d.p.	CV (%)		
		26,3	43,6								
	b	17,6	58,2	57,6	0,6	1,0	55,7	1,0	1,8		
	n.d.	17,2	57,0								
	c	8,7	57,5	59,0	1,5	2,5					
		9,1	60,5								
	d	4,6	60,4	61,8	1,4	2,2					
		4,8	63,2								
Tiramina	a	81,0	102,5	102,0	0,5	0,5	103,8	0,6	0,6		
		80,2	101,5								
	b	42,2	106,8	107,2	0,4	0,3					
	109,6	42,5	107,6								
	c	21,0	106,2	105,7	0,5	0,5					
		20,8	105,1								
	d	9,8	99,3	100,3	1,0	1,0					
		10,0	101,3								
Espermidina	a	35,0	61,4	61,9	0,5	0,8	73,3	1,0	1,3		
		35,6	62,4								
	b	21,3	74,5	72,8	1,7	2,3					
	0,4	20,3	71,1								
	c	11,1	78,0	78,2	0,2	0,3					
		11,2	78,5								
	d	5,8	81,7	80,1	1,6	2,0					
		5,6	78,6								
Espermina	a	27,1	46,6	46,4	0,2	0,5	64,1	0,6	0,8		
		26,8	46,1								
	b	16,8	57,7	57,2	0,5	0,8					
	0,1	16,5	56,8								
	c	10,4	71,9	72,4	0,5	0,7					
		10,6	72,9								
	d	5,9	81,3	80,3	1,1	1,3					
		5,8	79,2								

a, Amostra fortificada com 100 mg de aminas na forma de sal por L de meio; b, Amostra fortificada com 50 mg de aminas na forma de sal por L de meio; c, Amostra fortificada com 25 mg de aminas na forma de sal por L de meio; d, Amostra fortificada com 12,5 mg de aminas na forma de sal por L de meio; ^eAmostra sem adição de aminas padrão; ^fAmostra fortificada pela adição de diferentes concentrações de aminas padrão na forma de sal.

Da análise dos resultados obtidos para o estudo da exatidão do método analítico podemos considerar que as taxas de recuperação aumentam com a quantidade de aminas biogénicas na amostra e que os valores das taxas de recuperação médias variaram entre o valor mínimo de 55,7% para a histamina e o valor máximo de 103,8% para a tiramina.

4.2 Avaliação da capacidade descarboxilativa das estirpes no meio descarboxilativo sólido (*screening medium*)

O meio descarboxilativo sólido (*screening medium*) mostrou ser eficiente na triagem da maioria das estirpes (análise qualitativa), constatação confirmada por HPLC (análise quantitativa). Para as estirpes de *Enterococcus* ($n = 6$), 100% das estirpes estudadas foram positivas tanto no meio descarboxilativo quanto por HPLC (Tabela 13). Porém, para 91% das estirpes de *Staphylococcus* ($n = 11$) e 17% das estirpes de *Lactobacillus* ($n = 24$) (Tabela 13), o meio demonstrou ser pouco sensível devido a reações falso-positivas e falso-negativas, respetivamente, para as aminas biogénicas estudadas. Este resultado corrobora as constatações de Bover-Cid e Holzapfel (1999) que referem que o meio descarboxilativo apresenta algumas limitações em termos de sensibilidade na deteção de aminas biogénicas produzidas por microrganismos. Contudo, comparado com a análise cromatográfica, o meio descarboxilativo permite uma seleção preliminar rápida de estirpes com baixa atividade descarboxilativa.

A adição do aminoácido fenilalanina ao caldo descarboxilativo mostrou-se bastante importante na deteção de grandes quantidades de 2-feniletilamina produzidas especialmente por *Enterococcus* e *Lactobacillus curvatus*, o que difere dos valores encontrados por Bover-Cid e Holzapfel (1999) que não quantificaram esta amina biogénica por não terem adicionado o aminoácido livre precursor (fenilalanina) ao caldo. Em contrapartida, Bover-Cid *et al.* (2001) e Latorre-Moratalla *et al.* (2010) também obtiveram níveis consideráveis desta amina. Na Tabela 13 faz-se um resumo dos resultados quanto à sensibilidade do meio de *screening* (sólido) e a análise por HPLC para as estirpes estudadas.

O meio descarboxilativo sólido (meio de triagem) mostrou ser eficiente para todas as estirpes de *Lactobacillus plantarum* estudadas ($n = 10$), sendo os resultados concordantes com os obtidos por HPLC. Para as estirpes de *Lactobacillus sakei* ($n = 7$), o meio demonstrou ser eficiente para a maioria das estirpes estudadas, porém pouco fiável para duas das estirpes. Uma das estirpes foi positiva no meio descarboxilativo e apresentou quantidades vestigiais de aminas biogénicas por HPLC (resultado falso-positivo para o meio de triagem), a outra estirpe foi negativa no meio de triagem e produziu uma concentração apreciável de aminas biogénicas quantificadas por HPLC (falso-negativo). As estirpes de *Lactobacillus curvatus* ($n = 6$) apresentaram valores elevados de tiramina e expressivos de 2-feniletilamina. Três destas estirpes foram negativas no meio de triagem e revelaram-se descarboxilase-positivas quando quantificadas por HPLC (resultado falso negativos para o meio).

Tabela 13: Caracterização qualitativa e quantitativa das estirpes estudadas.

GÊNERO	ESPÉCIE	meio c/aa	meio s/ aa	TRIPTAMINA	FENILETILAMINA	PUTRECINA	CADAVERINA	HISTAMINA	TIRAMINA	ESPERMIDINA	ESPERMINA
<i>Staphylococcus</i>	<i>carneus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,4±3,21	48,0±1,95	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>carneus</i>	+	+	18,1±0,09	25,1±0,15	n.d.	n.d.	n.d.	43,3±0,06	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24,8±0,01	43,6±0,35	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24,2±0,10	43,7±0,13	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27,6±0,08	51,0±0,03	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33,6±0,24	69,3±0,41	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31,6±0,03	34,1±0,17	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30,8±0,34	51,3±0,04	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31,6±0,23	54,6±0,27	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	65,4±0,58	119,5±0,14	n.d.
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	+	-	8,9±1,35	730,9±1,02	1187,1±1,96	n.d.	n.d.	2538,2±1,41	50,7±0,06	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43,2±3,28	72,7±0,30	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,7±0,27	57,9±0,21	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	63,0±4,15	124,0±0,70	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	70,1±0,25	115±0,39	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44,2±±0,22	80,5±0,17	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100,2±3,05	122,0±2,78	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	144,6±1,6	119,8±1,28	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,8±0,22	53,4±0,22	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	38,6±0,27	57,7±0,15	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	45,5±1,28	n.d.	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	-	-	2,5±0,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64,2±1,07	120,6±1,03	1,7±0,11
<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	60,4±2,65	102,5±0,69	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	-	-	3,0±1,36	n.d.	65,8±0,10	n.d.	n.d.	65,8±0,10	104,3±0,10	0,2±0,10
<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	65,0±7,01	113,9±2,10	0,4±0,14
<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42,5±0,67	n.d.	n.d.

<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	+	-	n.d.	215,8±2,92	n.d.	n.d.	n.d.	3110,6±4,69	110,4±012	1,2±0,26
<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	-	-	25,6±3,6	1098±1,52	n.d.	n.d.	n.d.	2708,5±2,32	50,0±3,4	0,2±0,08
<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1041±1,55	97,8±0,11	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	+	+	n.d.	n.d.	659±1,44	n.d.	n.d.	1505,7±0,71	n.d.	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	+	+	68,7±0,27	n.d.	372,9±1,44	n.d.	n.d.	1517,2±1,38	n.d.	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	-	-	n.d.	404,6±4,48	11,0±0,12	n.d.	n.d.	848,2±6,98	161,0±3,54	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	-	-	6,1±1,75	172,5±1,32	48,9±0,31	n.d.	n.d.	3119,7±9,37	109,7±0,13	2,2±0,39
<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>	+	+	20,3±0,94	858,4±8,18	n.d.	n.d.	n.d.	2225,5±6,93	42,7±0,39	0,8±0,06
<i>Lactobacillus</i>	<i>sp</i>	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1434,1±2,95	101,9±0,12	n.d.
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	+	+	7,4±0,29	873,8±2,51	n.d.	n.d.	n.d.	2135,2±2,64	7,7±0,90	n.d.
<i>Enterococcus</i>	<i>sp</i>	+	-	n.d.	142,0±0,03	n.d.	n.d.	n.d.	2609±11,73	30,0±0,51	n.d.
<i>Enterococcus</i>	<i>sp</i>	+	-	n.d.	537,3±7,85	n.d.	n.d.	n.d.	1532,6±13,15	31,3±0,16	n.d.
<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	+	-	11,3±0,50	953,0±0,47	n.d.	n.d.	n.d.	2324,0±1,81	9,7±0,15	0,5±0,11
<i>Enterococcus</i>	<i>sp</i>	+	+	n.d.	944,3±3,78	n.d.	n.d.	n.d.	1997,4±1,48	6,1±0,67	n.d.
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	+	-	n.d.	645,8±6,41	n.d.	n.d.	n.d.	2954,8±8,89	9,9±2,37	n.d.

Meio c/ aa= meio com aminoácido; Meio s/ aa= meio sem aminoácido; Os resultados referem-se ao teor médio (mg/L) ± desvio padrão (d. p.) na amostra ($n = 2$); n.d. = não detetado

4.3 Avaliação da produção de aminas biogénicas por HPLC em estirpes de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*

De acordo com o estabelecido anteriormente na introdução, o desenvolvimento deste estudo teve como principal objetivo, selecionar estirpes não produtoras de aminas biogénicas com o intuito de utilizá-las tecnologicamente como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados tradicionais Portugueses. De um modo geral, as estirpes *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* bem como *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* estudadas não produziram quantidades expressivas de aminas biogénicas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Masson *et al.* (1996), que constataram que as estirpes pertencentes à família *Micrococcaceae* e a espécie *Lactobacillus sakei* não produziram tiramina. Das estirpes *Staphylococcus xylosus* ($n = 8$) apenas uma produziu valores elevados de 2-feniletilamina, putrescina e tiramina, o que corrobora com Masson *et al.* (1996), Bover-Cid *et al.* (2001) e Simonová *et al.* (2006) que referem que esta espécie de *Staphylococcus* geralmente apresenta atividade descarboxilativa fraca ou negativa. Porém, Martin *et al.* (2006) referem que das estirpes estudadas incluindo *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. epidermidis* e *S. carnosus* apenas 15% apresenta atividade descarboxilase negativa. Para Matuscelli *et al.* (2000), 50% das estirpes *Staphylococcus xylosus* estudadas são fracos produtores de aminas biogénicas. Das estirpes *L. sakei* ($n = 7$), duas foram produtoras de grandes quantidades de tiramina e 2-feniletilamina. Estes resultados são similares aos obtidos por Bover-Cid e Holzapfel (1999) quanto à produção de tiramina e aos de Bover-Cid *et al.* (2001) quanto à produção das duas aminas. No entanto, Batturini *et al.* (1995) afirmam que *L. plantarum* são, em menor frequência, produtores de aminas biogénicas. Mais recentemente, Latorre-Moratalla *et al.* (2010) referem que *Lactobacillus*, especialmente as espécies *L. plantarum*, *L. sakei* e *Staphylococcus xylosus*, do ponto de vista aminogénico, seriam as espécies mais adequadas para serem utilizadas como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados tradicionais.

Do total de lactobacilos ($n = 24$) estudados, 38% foram produtores de aminas biogénicas, o que está de acordo com os trabalhos de vários autores (Edward *et al.*, 1987; Tschabrun *et al.*, 1990; Maijala & Aerola, 1993; Maijala *et al.*, 1993), que afirmaram que as BAL são os microrganismos mais frequentemente usados na indústria de produtos cárneos, e que inclusivamente, algumas destas bactérias, nomeadamente *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Carnobacterium piscícola*, *Carnobacterium divergens*, têm sido identificadas como microrganismos

descarboxilase-positivos e conseqüentemente consideradas produtoras de amins biogénicas.

As estirpes de enterococos e *Lactobacillus curvatus* foram as que produziram quantidades apreciáveis de tiramina, seguida de 2-feniletilamina. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Latorre-Moratalla *et al.* (2010), que referem também concentrações elevadas de tiramina e quantidades significativas de 2-feniletilamina nas estirpes por eles analisadas. Outros autores verificaram também uma produção muito apreciável de tiramina por *Carnobacterium* e por algumas estirpes *Lactobacillus curvatus* (Masson *et al.*, 1996). Bover-Cid *et al.* (2001), encontraram também teores elevados de triptamina e de putrescina produzidos por *Enterococcus* e *L. curvatus*.

Neste estudo, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* foram as espécies que apresentaram teores mais elevados de tiramina, seguida da 2-feniletilamina. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Bover-Cid *et al.* (2001) e por Latorre-Moratalla *et al.* (2010), que referem *Enterococcus faecium* como os principais produtores de tiramina e de 2-feniletilamina, embora menos significativa, em produtos fermentados tradicionais europeus. A histamina não foi detetada em nenhuma das estirpes estudadas. Bover-Cid e Holzapfel (1999) também referem uma produção não significativa de histamina em qualquer das estirpes testadas. Contrariamente, Tiecco *et al.* (1986) observaram que alguns dos microrganismos que se desenvolvem em produtos cárneos, como *Pseudomonas*, *Staphylococci*, *Micrococci* e *Enterococci*, são histidina descarboxilase-positivos, e possivelmente podem produzir amins biogénicas, em particular histamina, em produtos cárneos.

A cadaverina, tal como a histamina, também não foi detetada em nenhuma das estirpes isoladas. Quanto à outra diamina, a putrescina, foi produzida em quantidades consideráveis em duas estirpes de *L. curvatus* (PO5-4 e PO5-119). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Latorre-Moratalla *et al.* (2010) para as mesmas estirpes bacterianas, apresentando, no entanto, teores mais elevados. Bover Cid e Holzapfel (1999) também encontraram níveis elevados de putrescina produzidos por *L. curvatus* associando a formação destas amins às *Enterobacteriaceae*.

As poliaminas naturais, espermina e espermidina, foram encontradas em quantidades muito baixas sendo esta última detetada na maioria das estirpes estudadas, porém em quantidades irrelevantes.

A tabela 15, apresenta um resumo dos principais resultados obtidos por outros autores relativos à presença de estirpes e da sua capacidade descarboxilativa classificando-se como microrganismos descarboxilase-positivos ou descarboxilase-negativos.

Tabela 14: Produção de aminas biogénicas (mg/L) por diferentes estirpes isoladas de produtos cárneos fermentados.

<i>E. faecalis</i>	nd	80-585	nd	nd	419-3736	Bover-Cid et al (2001)
					601-4986	Bover-Cid and Holzapfel (1999)
<i>E. faecium</i>	nd	40-432	nd	nd	474-4334	Bover-Cid et al (2001)
	8.5-13.0	440-720.4			1006.5-2867.4	Latorre et al. 2010
					379-4339	Bover-Cid and Holzapfel (1999)
<i>E. durans</i>				610		Bover-Cid and Holzapfel (1999)
<i>L. plantarum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	Bover-Cid et al (2001)
					12-1099	Masson et al. 1996
					3331	Bover-Cid and Holzapfel (1999)
<i>L. curvatus</i>	8-1321	2-2061	37-906	19-29	9-2986	Bover-Cid et al (2001)
		15.1-38.1			76.6-106.1	Latorre et al. 2010
		175,1	1673,60	20,20	2561,70	PO5/119
		154,1	1616,30	20,80	2198,8	PO5/4
			37-906	18-30	302-3494	Masson et al. 1996
<i>L. sakei</i>	nd	nd	nd	nd	15-2121	Bover-Cid et al (2001)
					62-2121	Bover-Cid and Holzapfel (1999)
<i>L. sp</i>	446-507			19		Bover-Cid et al (2001)
				19	446-2943	Bover-Cid and Holzapfel (1999)
<i>S. carnosus</i>	20,2	161,1				Latorre et al. 2010
					5-30	PO6/8
<i>S. xylosum</i>					5-30	Masson et al. 1996
					2-39	Masson et al. 1996

Apesar da histamina não ter sido detetada e dos valores elevados de tiramina e de 2-feniletilamina, que segundo vários autores são um alerta à não utilização destas estirpes, ainda não foram estabelecidos limites legais destas aminas em produtos cárneos, em particular da histamina e da tiramina.

5 CONCLUSÕES

A finalidade primária deste estudo foi selecionar, a partir de uma coleção de estirpes previamente isoladas de produtos cárneos fermentados/fumados tradicionais Portugueses e do ambiente de produção de 6 unidades fabris da região do Alentejo, as estirpes não produtoras de amins biogénicas potencialmente utilizáveis como culturas *starter*.

De entre as estirpes estudadas, os enterococos foram os que apresentaram teores de tiramina mais elevados e quantidades consideráveis de 2-feniletilamina, inviabilizando assim a sua utilização como culturas de arranque, apesar do seu potencial aminogénico não ser dependente da espécie.

Entre os lactobacilos, a produção de tiramina foi principalmente relacionada com a espécie *L. curvatus*. A maioria das estirpes desta espécie foram também produtoras de concentrações significativas de 2-feniletilamina, e inclusivamente de putrescina (duas estirpes), razão pela qual não parecem ser recomendadas como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados. De um modo geral, *L. plantarum* e *L. sakei* parecem ser não produtores de amins biogénicas e, portanto, viáveis para serem introduzidos em produtos cárneos fermentados como culturas *starter*.

Também as espécies de *Staphylococcus*, tais como *S. xilosus*, *S. equorum* e *S. carnosus* não mostraram atividade descarboxilativa expressiva, não produzindo amins biogénicas em quantidades apreciáveis.

Assim, com base neste estudo, podemos concluir que *L. plantarum* e *L. sakei* bem como *S. xilosus*, *S. equorum* e *S. carnosus* são as espécies com melhor aptidão para serem utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação de produtos cárneos, sem qualquer efeito prejudicial para a qualidade e segurança do produto final e consequentemente para a saúde do consumidor.

6 BIBLIOGRAFIA

- Alfaia, C. M. R. P. M. (2002). Perfil de aminoácidos livre, amins biogénicas e outras frações azotadas em presunto de cura rápida: Sua influência na qualidade e no risco toxicológico do alimento. Dissertação de Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Lisboa: Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa.
- Alfaia, C. M., Castro, M. F., Reis, V. A., Prates, J. M., de Almeida, I. T., Correia, A. D. & Dias, M. A. (2004). Changes in the Profile of Free Amino Acids and Biogenic Amines During the Extended Short Ripening of Portuguese Dry-Cured Ham. *Food Science and Technology International*, 10, 297-304.
- Anderson, A. K. (2008). Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets. *Food Chemistry*, 107, 761-767.
- Aymerich, M. T., Hugas, M. & Monofort, J. M. (1998). Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Science and Technology International* 4 (3), 141-158.
- Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends of Food Science and Technology*, 6, 341-346.
- Benito, M. J. A., Martin, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S. & Córdoba, M. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented Salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*, 72, 193-201.
- Bernardi, S., Golineli, B. B. & Contreras-Castillo, C. J. (2010). Aspectos da aplicação de culturas starter na produção de embutidos cárneos fermentados. *Brazilian Journal Food Technology*, Campinas, 13, n. 2, 133-140. Acedido Set. 24. 2012 em: <http://www.ital.sp.gov.br/>

- Bouchereau, A., Guénot, P. & Larher, F. (2000). Analysis of amines in plants material. *Journal of Chromatography*, 747, 49-67.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and reservation. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 131-149.
- Bover-Cid, S. & Holzapfel, W. H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 55, 33-41.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M. C. (2001). Effect of the interaction between a low tiramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic Staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 113-123.
- Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. & Huis in't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Microbiology*. Amsterdam, 11, 73-84.
- Brinker, C., Kerr, M. & Raynner, C. (2002), Investigation of biogenic amines in fish and fish products. *Victorian Government Department of Human Services*. Edition 1, 17.
- Carvalho, L. M. C. P. Q. (2010). *Identificação e caracterização de isolados de Staphylococcus: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados*. Tese de mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Claro, F. S. G. (2009). *Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de amins biogénicas em enchidos*. Tese de mestrado em Engenharia Química. Bragança: Escola Superior de Tecnologia e de Gestão. Bragança.
- Casaburi, A., Aristoy, M-Conception., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Todrá, F. & Vilani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented

- sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, 76, 295-307.
- Cassetari, V. C., Strabelli, T. & Medeiros, E. A. S. (2005). Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacilin resistance on mortality? *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 9 (I), 70-76.
- Cocconcelli, P. S. (2007). Starter cultures: bacteria. In F. Toldrá (Eds), Handbook of fermented meat and poultry. Oxford, UK, *Blackwell Publishing Professional*, 137-145.
- Collins, J. K., Thornton, G. & Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, 6487-6490.
- Cook, P. E. (1994). Fermented foods as biotechnological resources. *Food Research International*, 27, 309-316.
- Cooper, R. A. (1997). On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiology Letters*, 146, 85-89.
- Davis, T. P., Gehrke, C. W., Gehrke Jr., C. W., Cunningham, T. D., Kuo, K. C., Gerhardt, K. O., Johnson, H. D. & Williams, C. H. (1979). High-performance Liquid Chromatographic analysis of biogenic amines in biological materials as o-phthaldehyde derivatives. *Journal of Chromatography*, 162, 293-310.
- Decreto-Lei nº 113/2006 de 12 de Junho. Diário da República nº 113/2006 - Série I-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa
- Draisici, R., Volpe, G., Lucentini, L. Cecilia, A., Federico, R. & Palleschi, G. (1998). Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chemistry*, 225-232.
- Dunne, C., Murphy, L., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O'Sullivan, G.

- C., Shanahan, F. & Kevin, J. (1999). Probiotics: from myth to reality: Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 279-292.
- Edwards, R. A., Dainty, R. H., Hibbard, C. M. & Ramantanis, S. V. (1987). Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 427-434.
- Eerola, S., Maijala, R., Sagués, A. X. R., Salminen, M. & Hirvi, T. (1996). Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive lactobacillus. *Journal of Food Science*, 61, 1243-1246.
- Eitenmiller, R.P., Koehler, P.E. & Reagan, J. O. (1978). Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine-decarboxylase. *Journal Food Science*. 43, 689-693.
- Euséby, J. P. (2003). Dictionnaire de Bacteriologie Veterinaire. *Société de Bacteriologie Systématique et Veterinaire (SBSV)*. Acedido Out. 10. 2012 em: <http://www.bacterio.cict.fr>
- FDA (2000) – Draft guidance for analytical procedures and methods validation. (2000). www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.htm.
- Fernandez-Garcia, E., Tomillo, J. & Núñez, M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 189-196.
- Flick G. J. & Granata L. A. (2005). Biogenic Amines in Food. In: Dabrowski W. M.; Sikorski, Z. E. (Eds). Toxins in Food. *Chemical and Functional Properties of Food Components Series*. CRC Pres, 121-154.

- Fraqueza, M. J., Alfaia, C. M. & Barreto, A. S. (2012). Biogenic amine formation in turkey meat under modified atmosphere packaging with extended shelf life: Index of freshness. *Poultry Science*, 91(6), 1465-72.
- Friday, M. L. & Firman, J. D. (1999). Effects of biogenic amines on broiler performance. *Applied Poultry Science*, 408-413.
- García-García, P., Balbuena-Brenes, M., Hornero-Mendéz, D., García-Borrego, A. E. & Garrido-Fernández, A. (2000). Content of biogenic amines in table olives. *Journal of Food Protection*, 63, 111-116.
- Glória, M.B.A. (2005). Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Dekker, 4, 1-38.
- Gonçalves, S. M. L. (2009). *Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo tradicional e do ambiente fabril*. Tese de mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa- Faculdade de Medicina Veterinária.
- Gouveia, N. N. F. (2009). *Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de amins biogénicas em tunídeos*. Tese de mestrado em Bioquímica Aplicada. Funchal: Universidade da Madeira.
- Gosetti, F.; Mazzucco, E.; Gianotti, V.; Polati, S.; Gennaro, M. C. (2007). High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical piedmont cheeses. *Journal Chromatography. A* 1149, 151-157.
- Halasz- A. Barath, A., Simon-Sarkadi, L. & Holzapfel, W. H. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Foods Science Tecnology*, 5, 42-49.
- Hammes, W. P. & Bantleon, A. (1996). Min. Saúde. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol.* (87), 165-174.

- Hammes, W. P. & Hertel, C. (1998). New developed in meat starter cultures. *Meat Science*, 49, SI25-SI38.
- Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T. & Vidal.Carou, M. C. (1996). Ion-par high-performance liquid chromatografic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Food Chemistry and Agriculture*, 44, 2710-2715.
- Holzapfel, W. H. & Wood B. J. B. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: Wood B. J. B., Holzapfel, W. H. (Eds). *The genera of lactic acid bacteria*. London: Champmant & Hall, 2, 1-6.
- Hugas, M. & Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for food fermentation. *Food Chemistry*, 54, 547- 554.
- Hurst, W. J. e Toomey, P. B. (1981). High-performance liquid chromatographic determination of four biogenic amines in chocolat, *Analyst*, 106, 304-402.
- Kalač, P., Špička, J., Krizek, M. & Pelikanvá, T. (2000). The effects os lactic acid bacteria inoculants on biogenic amines formation is sauerkraunt. *Food Chemistry*, 70, 355-359.
- Kandler, O. (1983), Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.
- Kim M. K., Mah J. H. & Hwang H. J. (2009). Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chemistry*, 116, 87-95.
- Krizek, A. R., Smith, J. S. & Phebus, R. K. (1995). Biogenic amine formation in fresh vacuum-packaged beef stored at – 2°C and 2 °C for 100 days. *Journal of Food Protection*, 58, 284-288.

- Kvanisčka, F. & Voldřich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103, 145-149.
- Latorre-Moratalla, M. L., Venciana- Nogués, M. T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Freaqueza, M. J., Patarata, L., Drosinos, E. H., Laukova, A., Talon, R. & Vidal-Carou, M. C. (2008). Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*. 107, 912-921.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Elias, M., Drosinos, E. H. & Vidal-Carou, M. C. (2010). Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 20-25.
- Lavizzari, T., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A. & Vidal-Carou, M. C. (2006). Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1129, 67-72.
- Lerayer, A. L. S., Marasca, E. T. G., Moreno, I. & Vialta, A. (2009). Culturas lácticas e probióticas: identificação, classificação, detecção e aplicação tecnológica. In: Oliveira, M. N. (org.) *Tecnologia de produtos lácteos funcionais*. São Paulo. Ed. Atheneu, cap. 4, 125-186.
- Leroy, F., Verluyten, J. & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 106, 270-285.
- Leuschner, R. G. K., Kurihara, R. & Hammes, W. P. (1999). Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Oxford. ISSN 0022-5142, 79, 1141-1144.
- Maijala, R. L. & Eerola, S. H. (1993). Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tiramine. *Meat Science*, 35, 387-395.

- Maijala, R. L., Eerola, S. H., Aho, M. A. & Hirn, J. A. (1993). The effect of GDL- induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, 56, 125-129.
- Maijalla, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P. & Hirvi, T. (1995). Formation of biogenic amine during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *Journal of Food Science*, 60, 1187-1190.
- Mariné, A., Vidal, M. C., Izquierdo, M. & Veciana, T. (1995). Aminas biogénicas en alimentos: unos microcomponentes de interés múltiple. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria*, 138-141.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T. & Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 148-158.
- Martuscelli, M., Crudele, M. A., Gardini, F. & Suzzi, G. (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 228-232.
- Masson, F., Eclache, L., Compte, T., Talon, R. & Montel, M. C. (1996). Qui produit des amines biogènes dans produits carnés? *Viandes des Produits Carnés*. Paris, 7, 287-289.
- Messens, W. & De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactocacilli* isolated from sourdoughs – a review. *International Journal Food Microbiology*, 72, 75-85.
- Moret, S. & Conte, L. S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A.*, 729, 363-369.

- Moretti, V. A., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M. A. & Panseri, S. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science*, 66, 845-854.
- Mossel, D. A. A. & Garcia, B. M. (1985). Intoxicaciones alimentarias agudas: enfermedades producidas por la presencia en los alimentos de toxinas preformadas de origen bacteriano. Síndromes causados por bacterias productoras de aminas vasopresoras. *In: Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza: Acríbia, S. A. ISBN 84-200-0561-4, 29-30.
- Murray, B. E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3 (1):4, 6-65.
- Pinho, O., Fernandes, J. O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Gomes, A. M. P. & Ferreira, M. A. (2000). Aminas biogénicas e os alimentos. *Alimentação Humana*. Porto, 6:1, 29-41.
- Önal, A., (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*. 103, 1475- 1486.
- Ordóñez, A: I., Ibáñez, F. C., Torre, P. & Barcina, Y. (1997). Formation of biogenic amines in idiazábal ewe's s-milk cheese: effect of ripening, pasteurization and starter. *Journal of Food Protection*, 60, 1371-1375.
- Patarata, L. A. S. C. (2002). *Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do Ácido Láctico e Micrococcaceae em produtos de salsicharia*. Tese de doutoramento. Vila Real: Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro.
- Paulsen, P., Bauer, F., Kordesch, M. & Potzelberger, D. (1997). Formation of biogenic amines during storage and spoilage of raw meat. *Proceedings of the Euro Food Chemistry IX*. Switzerland: [s. n.], 301-306.

- Punakivi, K.; Smolander, M.; Niku-Paavola, M. -L.; Mattinen, J. & Buchert, J. (2006). Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta*, 68, 1040–1045.
- Radosevich, J. (2007). Analyzing amines. Acedido em Jun. 13.2012. em <http://www.petfoodin.d.ustray.com/>
- Ranconi, M. C. & Merino, L. A. (2000). Enterococos: Identificación y susceptibilidad antimicrobiana. Universidad Nacional Del Nordeste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Chaco, Argentina. Acedido em Out. 17.2012 em: www.unne.edu.ar/Web/cyt/
- Rantsiou, K., Drosinos, E., Gialitaki, M., Metaxopoulos, I., Comi, G e Cocolin, L. (2006). Use of molecular tools to chracterize *Lactobacillus* spp. Isolated from GGreek traditional fermented sausages. *Journal of Food Microbioly*, 39, 123-128.
- Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à higiene dos géneros alimentícios (29 de Abril de 2004). *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139/1.
- Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão da Comunidade Europeia relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (5 de Dezembro de 2007). *Jornal Oficial da União Europeia*, L 322/12.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. Critical Reviews. *Food Science and Nutrition*, 44, 489-499.
- Saaid M., Saad B., Hashim N. H., Ali A. S. M. & Saleh M. I. (2009). Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry*, 113, 1356-1362.
- Santos M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Food Microbiology*, 29, 213-231.

- Santos, M. (1997). *Aminas biogénicas no queijo*. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Santos, S. F. C. (2011). *The dual role of enterococci in food technology: bacteriocin production versus pathogenicity potencial*. Tese de mestrado em Microbiologia Aplicada. Lisboa: Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, P. & Heller, K. J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species. A review. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 448 – 457.
- Schleifer, K. H. & Fischer, U. (1982). Description of a new specie of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25, 50-61.
- Schleifer, K. H. (1986). Gram positive Cocci. Section 2. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Sneath P. H. A. Vol 2, 999-1035.
- Shalaby A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- Silla-Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.
- Simonová, M., Stropfová, V., Marciňáková, M., Lauková, A., Vesterlund, S., Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S. & Vidal-Carou, M. C. (2006). Characterization of *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*, 73, 559-564.
- Slemr, J. (1981), Biogenic amine als potentieller chemoscher qualitatserdikator für fleisch. *Fleisch-wirtschaft* 61, 921-962.

- Smělá, D. Pechová, P., Komprda, T., Klejdus B. & Kubáň, V. (2003). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in a meat product during fermentation and long-term storage. *Czech Journal of Food Sciences*, 21 (5), 167-175.
- Smith, T. A. (1980-1981). Amines in food. *Food Chemistry*, 6, 169-200.
- Smith, J. S., Kenney, P. B., Kastner, C. L. & Moore, M. M. (1993). Biogenic amine formation in fresh vacuum packaged beef during storage at 1° C for 120 days. *Journal of Food Protection*, 56, 497-532.
- Stadnik, J., Dolatowski, Z. J. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polunorum, Technologia Alimentaria*, 9(3) 2010, 251 – 263.
- Steinkraus. K. H. (1994). Nutritional significance of fermented foods. *Food Research International*, 27, 259-267.
- Straub, B. W., Tichaczek, P. S., Kicherer, M. & Hammes, W. P. (1994). Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* LTH 972. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 199(1), 9-12.
- Stratton, J. E., Hutkins, R. W. & Taylor, S. L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented food. A review. *Journal of Food Protection*, 54, 460-470.
- Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenics amines in dry fermented sausages: a review, *Int. J. Food Microbiology*. 88, 41-54.
- Suzuki, S., Kobayashi, K., Noda, J. Suzuki, T. & Takama, K. (1990). Simultaneous determination of biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 225-228.
- Taylor, S. L. (1985). Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. Geneva. *World Health Organization*, 1-45.

- Talon, R., Leroy, S. & Lebert, L. (2007). Microbial ecosystems of tradicional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77, 55-62.
- Tarján, V. & Jánosy, G. (1978). The role of biogenic amines in foods. *Die Nahrung*, 22:3, 285-289.
- Tiecco, G., Tantillo, G., Francioso, E., Paparella, A. & De Natale, G. (1986). Ricerca qualitativa di alcune amine biogene in insaccati nel corso della stagionatura. *Industrie Alimentari*, 25, 209-213.
- Toldrá, F., Sanz, Y. & Flores, M. (2001). Meat Fermentation Technology, In: Hui, Y. H., NIP, W. K., Roger, R. W., Young, O. *Meat Science and Application*, 23, 537-563.
- Tosukhowong, A., Visessanguan, W., Pumpuang, L., Tepkasikul, P., Panya, A. & Valyasevi, R. (2011). Biogenic amine formation in Nham, a Thai fermented sausage, and the reduction by commercial starter culture, *Lactobacillus plantarum* BBC 9546. *Food Chemistry*. 129, 846-853.
- Tristão, I. H. (2006). *Caracterização bioquímica de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano para uso como culturas starter: atividade antagonista, atividade de catalase e de nitrato redutase e produção e degradação de aminas biogénicas*. Tese de doutoramento em Microbiologia Agrícola. Viçosa-Brasil: Universidade Federal de viçosa.
- Tschabrum, R., Sick, K., Bauer, F. & Kranner, P. (1990). Bildung von Histamin in schnittfesten Roswürsten. *Fleischwirtschaft*, 70, 448-451.
- Vásquez, S. M., Syárez, H. & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36, 64-71.
- Vidal-Carou, M. C., Latorre-Moratalla, M. L. & Bover-Cid S. (2009). Biogenic Amines. In: Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis. L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), Boca Raton, Fla. CRC Press. 665-686.

Vidal-Carou, M. C., Venciana-Noguéz, T., Latorre-Moratalla, M. L. & Bover-Cid, S. (2007). Biogenic Amines: risks and control. In: F. Todrá (ed.), Handbook of fermented meat and poultry. Ames, IA: *Blackwell Publishing Professional*. 455-468.