

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

**HISTAMINA E TIRAMINA EM  
EMBUTIDOS CÁRNEOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Carlos Vladimiro Málaga Peña**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

# **HISTAMINA E TIRAMINA EM EMBUTIDOS CÁRNEOS**

**por**

**Carlos Vladimiro Málaga Peña**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientador: Prof. Ernesto Hashime Kubota**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

Málaga Peña, Carlos Vladimiro, 1973-

M236h

Histamina e tiramina em embutidos cárneos / por Carlos Vladimiro Málaga Peña ; orientador Ernesto Hashime Kubota. – Santa Maria, 2006.

84 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2006.

1. Tecnologia de alimentos 2. Histamina 3. Tiramina 4. Aminas biogênicas 5. Salame 6. Salame cozido I. Kubota, Ernesto Hashime, orient. II. Título

CDU: 664.9.036.1

Ficha catalográfica elaborada por  
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos  
Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**HISTAMINA E TIRAMINA EM  
EMBUTIDOS CÁRNEOS**

elaborado por  
**Carlos Vladimiro Málaga Peña**

como requisito parcial para obtenção do título de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Ernesto Hashime Kubota, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Lisiane de Marsillac Terra, Dra. (UFSM)**

**Nelcindo Nascimento Terra, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 22 de dezembro de 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, luz que ilumina o caminho a trilhar na jornada da vida.

Agradeço a minha mãe Edelmira pelo imenso amor, a compreensão e apoio ao longo de minha vida.

Agradeço a minha esposa Casandra, pelo amor, carinho e compreensão nos momentos difíceis.

Agradeço ao professor Ernesto Kubota pela paciência, disposição e orientação sempre atenta e oportuna.

Agradeço ao professor Nelcindo Terra pela disposição e contribuição com as valiosas informações para a prática profissional.

Agradeço aos professores Renato Zanella e Martha Adaime pela auxílio e disponibilidade dos laboratórios do Departamento de Química.

Agradeço a meu colega e amigo Alessandro Terra pela grande amizade e companheirismo sempre presentes.

Agradeço aos professores do Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade de vivenciar e compartilhar experiências e conhecimentos.

Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos pela assistência nos laboratórios.

Agradeço a professora Ana Laura na realização das análises estatísticas.

Agradeço a professora Lisiane Terra pela contribuição com as pertinentes sugestões para o trabalho.

Agradeço ao Sr. Luis Marchiotti, chefe da biblioteca setorial do CCR, pela elaboração da ficha catalográfica.

Agradeço a Liana Milani, chefe do laboratório de microbiologia, aos bolsistas do laboratório Cedenir, Roger, Cristiano, Paulo Cezar, Valéria; a Aline e Karine, bolsistas do laboratório de química analítica; pela ajuda na realização das análises.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade de continuar o aperfeiçoamento profissional.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento da presente.

Para todos muito obrigado.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### HISTAMINA E TIRAMINA EM EMBUTIDOS CÁRNEOS

AUTOR: CARLOS VLADIMIRO MÁLAGA PEÑA

ORIENTADOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de dezembro de 2006.

O consumo de alimentos fermentados tem sido relacionado com surtos de intoxicações alimentares e as aminas biogênicas são associadas ao consumo destes produtos. Os objetivos foram avaliar o potencial de formação de aminas em salame tipo Italiano, adicionado ou não, de cultura *starter* e fibra; determinar a formação de aminas no salame cozido, adicionado ou não de ácidos orgânicos. Os salames foram elaborados e embutidos em tripa artificial de colágeno não comestível. Maturados sob condições de temperatura, umidade e velocidade do ar controlados. Na fabricação do salame cozido, foram adicionados ácidos orgânicos (lático e cítrico), embutidos em tripa artificial de colágeno não comestível e as peças cozidas. Os produtos se apresentaram conforme os padrões microbiológicos vigentes. A histamina alcançou valores de 145,61; 93,38 e 130,10 mg·kg<sup>-1</sup> e a tiramina valores de 67,05; 70,28 e 71,87 mg·kg<sup>-1</sup> para os tratamentos do salame controle, *starter* e *starter* e fibra respectivamente. A histamina alcançou valores de 48,06; 55,37 e 49,16 mg·kg<sup>-1</sup> e a tiramina valores de 11,00; 11,06 e 11,35 mg·kg<sup>-1</sup> para os tratamentos do salame cozido controle, ácido lático e ácido cítrico respectivamente. Não houve diferenças ao nível testado ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que o *starter* comercial não evitou a formação de aminas, atribuída às bactérias contaminantes encontradas já nas matérias-primas. A temperatura e os ácidos orgânicos não influenciaram nos níveis finais de aminas no salame cozido. A análise sensorial não foi influenciada pela presença das aminas. A adição de glicose e sacarose evitou maiores acúmulos de aminas no salame fermentado e a fibra de trigo não interferiu no metabolismo dos microrganismos.

Palavras-chaves: Histamina, Tiramina, Aminas Biogênicas, Salame, Salame Cozido.

## **ABSTRACT**

Masters Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **HISTAMINE AND TYRAMINE IN MEAT SAUSAGES**

AUTHOR: CARLOS VLADIMIRO MÁLAGA PEÑA

ADVISOR: ERNESTO HASHIME KUBOTA

Date and Place of Defense: Santa Maria, December 22<sup>th</sup> 2006.

The consumption of fermented goods has been related with outbreaks of foods intoxications, like these biogenic amines have been associated to the consumptions of these products. The aims went to assess the potential of amines formation in dry fermented sausage added or not with starter and fiber, determination of amines formation in cooked salami added or not with organic acids. The dry fermented sausages were fabricated and cased in artificial collagen no eatable gut then, ripening under controlled conditions of temperature, moisture and air stream. The cooked salamis were added with organic acids (lactic and citric), cased in artificial collagen no eatable gut and cooked. The products were according to the microbiologic available legal patterns. The histamine reached amounts of 145,61; 93,38 and 130,10 mg·kg<sup>-1</sup> and the tyramine reached amounts of 67,05; 70,28 and 71,87 mg·kg<sup>-1</sup> for the dry fermented sausages treatments: control, starter and starter and fiber respectively. The histamine in the cooked salami treatments: control, lactic acid and citric acid reached amounts of 48,06; 55,37 and 49,16 mg·kg<sup>-1</sup> and the tyramine reached amounts of 11,00; 11,06 and 11,35 mg·kg<sup>-1</sup> respectively. There were no differences at the level tested ( $p < 0,05$ ). In conclude the starter did not avoid the amine formation, attributed to the polluting bacterium found already in the raw materials. The temperature and the organic acids did not influence in the final amounts of amines in the cooked salami. The taste assess was not influenced by the presence of amines. The addition of glucose and sucrose avoided larger amines amounts in the fermented salami and the wheat fiber did not interfere in the metabolism of the microorganisms.

Key words: Histamine, Tyramine, Biogenic Amines, Dry Sausage, Cooked Salami.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura – 1 Síntese de aminas a partir de aminoácidos precursores (CIRILO, 2003; HALÁSZ, 1994; LIMA; GLÓRIA, 1999).....	17
Figura 2 – Estrutura química de algumas aminas (IZQUIERDO-PULIDO,1996; LIMA; GLÓRIA, 1999; SMITH, 1980) .....	19
Figura 3 – Classificação das AO de acordo com o grupo prostético (BENEDETTI, 2001) .....	33
Figura 4 – Fluxograma de produção do salame tipo Italiano.....	34
Figura 5 – Fluxograma de produção do salame cozido.....	37
Figura 6 – Valores médios de histamina e tiramina das massas que originaram os tratamentos dos embutidos cárneos.....	44
Figura 7 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ( <i>Staphy.</i> ) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano no início da fabricação.....	46
Figura 8 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias aeróbias mesófilos (AM) e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ( <i>Staphy.</i> ) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame cozido no início da fabricação.....	49
Figura 9 – Valores de pH para os tratamentos do salame tipo Italiano e para o salame cozido no início da fabricação.....	50
Figura 10 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias aeróbias mesófilos (AM) e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ( <i>Staphy.</i> ) para os tratamentos do salame cozido.....	54
Figura 11 – Valores de pH para os tratamentos do salame cozido durante o período de fabricação.....	55
Figura 12 – Valores médios para histamina e tiramina para os diferentes tratamentos do salame tipo Italiano.....	58
Figura 13 – Valores de pH para os tratamentos do salame tipo Italiano durante o período de fabricação.....	60
Figura 14 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ( <i>Staphy.</i> ) e coliformes fecais	

(CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano para a primeira semana de fabricação .....	63
Figura 15 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ( <i>Staphy.</i> ) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano para a segunda semana de fabricação.....	64
Figura 16 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ( <i>Staphy.</i> ) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano para o produto acabado ...	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis de aminos nos tratamentos do salame cozido.....	52
Tabela 2 – Características físico-químicas do salame cozido .....	56
Tabela 3 – Níveis de aminos nos tratamentos de salame tipo Italiano.....	59
Tabela 4 – Características físico-químicas do salame tipo Italiano .....	61
Tabela 5 – Características sensoriais dos salames cozidos .....	66
Tabela 6 – Características sensoriais dos salames fermentados .....	67

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Precursores das ABs nos alimentos (SILLA, 1996).....	18
Quadro 2 – Aminas freqüentemente encontradas em alimentos (BARDÓCK, 1995) .....	20
Quadro 3 – Microrganismos usados como culturas <i>starter</i> (TERRA, 2001).....	24
Quadro 4 – Manifestações clínicas atribuíveis a alergias alimentares (FMEDIC, 2003) .....	27
Quadro 5 – Drogas que inibem a ação da DAO (ORTOLANI, 1999) .....	30
Quadro 6 – Esquema usado na câmara de maturação para o salame .....	35
Quadro 7 – Características dos microrganismos da cultura SPX (NASSU, 1999) ...	36
Quadro 8 – Tempo e temperatura para obtenção do salame cozido (BALCHEM, 2001) .....	38

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Ficha usada para a análise sensorial do salame tipo Italiano e do salame cozido .....	83
---	----

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	6
LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE QUADROS .....	9
LISTA DE ANEXOS .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	16
3.1 Aminas Biogênicas .....	16
3.2 Classificação .....	19
3.3 Ocorrência de aminas biogênicas em alimentos .....	20
3.3.1 Ocorrência de aminas em alimentos não fermentados .....	21
3.3.2 Ocorrência de aminas em alimentos fermentados .....	22
3.4 Matérias-primas e fontes de contaminação.....	22
3.5 <i>Starter</i> e microrganismos da fermentação cárnea.....	23
3.6 Embutidos Fermentados Curados Salame.....	26
3.7 Alergias e intolerância alimentares.....	26
3.8 Limite tóxico .....	28
3.9 Toxicologia das aminas biogênicas.....	30
3.10 Metabolismo de aminas.....	32
4 MATERIAL E METODOS .....	34
4.1 Formulação do salame tipo Italiano.....	34
4.1.1 Tratamentos para o salame tipo Italiano .....	35
4.1.2 <i>Starter</i> .....	36
4.1.3 Fibra de trigo .....	36
4.2 Formulação do Salame Cozido .....	37
4.2.1 Tratamentos para o Salame Cozido.....	38
4.2.2 Ácidos encapsulados.....	38

4.3	Análises físico-químicas.....	39
4.3.1	Determinação de umidade .....	39
4.3.2	Determinação de proteínas .....	39
4.3.3	Determinação de gordura.....	39
4.3.4	Determinação de cinzas .....	40
4.3.5	Determinação da atividade de água (Aa) .....	40
4.3.6	Determinação do pH.....	40
4.4	Análises microbiológicas .....	40
4.4.1	Determinação de bactérias aeróbias mesófilas.....	41
4.4.2	Determinação de bactérias ácido lácticas .....	41
4.4.3	Determinação de estafilococos coagulase positivo .....	41
4.4.4	Determinação de coliformes totais .....	41
4.4.5	Determinação de coliformes fecais .....	41
4.5	Determinação das aminas biogênicas.....	42
4.6	Análise sensorial .....	43
4.7	Análise estatísticas.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Aminas biogênicas na massa dos embutidos.....	44
5.1.1	Análise microbiológicas na massa do salame tipo Italiano.....	46
5.1.2	Análises microbiológicas da massa do Salame Cozido.....	48
5.1.3	Determinação de pH e atividade de água (Aa).....	49
5.2	Aminas biogênicas no Salame Cozido .....	51
5.2.1	Características microbiológicas.....	53
5.2.2	Características físico-químicas.....	55
5.3	Aminas biogênicas no salame tipo Italiano.....	56
5.3.1	Análises físico-químicas .....	59
5.3.2	Características microbiológicas .....	62
5.4	Características sensoriais .....	66
6	SUGESTÕES .....	68
7	CONCLUSÕES .....	69
8	REFERÊNCIAS.....	70
9	ANEXOS .....	82

# 1 INTRODUÇÃO

Na maioria dos países a segurança dos alimentos tem-se convertido em um elemento fundamental do seu sistema de abastecimento. O conhecimento e controle dos contaminantes e a capacidade tóxico-gênica requer o emprego de técnicas que vão desde métodos sofisticados de laboratório a simples regras de culinária passando por uma apropriada engenharia industrial (LESSOF, 1995).

Os embutidos cárneos, em especial os fermentados, são apontados como produtos contendo teores consideráveis de aminas. As aminas biogênicas encontram-se presentes naturalmente em pequenas quantidades numa ampla variedade de alimentos, sua presença dentro de certos limites não implica em risco para a saúde.

Uma meta para as indústrias de carnes é fabricar produtos com baixos conteúdos de aminas (MONTEL, 1996). A fabricação de salames, no país, compreende uma significativa fatia do mercado de produtos cárneos, mudanças à procura da qualidade, redução de custos e adoção e novas tecnologias foram percebidas pelo consumidor (TERRA, 2003).

Estudos toxicológicos e inquéritos epidemiológicos têm comprovado o risco potencial advindo do consumo de alimentos contendo níveis elevados de histamina e outras aminas biogênicas (LEITÃO, 1995). No Brasil, existe pouca informação quanto à incidência do agente tóxico e consumo de alimentos em casos de intoxicação humana (SINITOX, 2005).

A histamina tem sido apontada como a principal responsável por sintomas de intoxicação alimentar, entretanto outras aminas também são apontadas como possíveis causas de intoxicação (v.g. tiramina, triptamina, putrescina, cadaverina).

A presença de aminas em alimentos constituiu-se de especial interesse para saúde pública, devido aos efeitos fisiológicos e toxicológicos que estas substâncias produzem (BOVER-CID, 1999b). Especial ênfase é tomada respeito às aminas, tiramina e histamina que provavelmente sejam as mais importantes aminas biogênicas de origem microbiana (BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999c).

Devido à estrutura semelhante com as aminas endógenas (catecolaminas, serotonina) as aminas biogênicas, quando atingem a circulação sangüínea podem causar efeitos sobre a função vascular (BAILEY, 2003).

Inúmeras reações adversas têm sido atribuídas às aminas biogênicas provenientes da dieta. A urticária tem sido freqüentemente associada à tiramina, mas também, a histamina. Vários sintomas foram alegados por causa da ingestão de histamina, a saber, dores de cabeça, diminuição da pressão sanguínea, rubor, espirros e angústia respiratória e gastrointestinal (JANSEN, 2003).

A relação entre tiramina e enxaquecas tem sido extensamente estudada. A dor de cabeça supostamente atribuída à ingestão de feniletilamina também há recebido considerável atenção (JANSEN, 2003). A tiramina age no sistema circulatório apresentando transtornos da visão, enjôo, vômito, diarreia e intensas dores de cabeça, frequentemente unilaterais. Em casos isolados o aumento da pressão sangüínea pode originar a ruptura de capilares cerebrais tornando-se um perigo a vida, inclusive com desenlaces fatais. Admite-se também que manifestações de enxaqueca de etiologia desconhecida podem estar associadas ao consumo de alimentos contendo triptamina (FEHLHABER; JANESTSHKE, 1995).

A irritação da mucosa intestinal, o álcool, os medicamentos inibidores de enzimas participantes no metabolismo de aminas e a interação entre aminas poderão levar a um agravamento do quadro clínico do paciente.

Na literatura existem propostas pela adoção de limiares tóxicos toleráveis, podendo ser adequados ao tipo de alimento consumido desde que, se considerem outros fatores que afetem estes valores. Assim, vários países estão adotando limites para aminas biogênicas em diferentes alimentos.

A relação estrita dos alimentos com a saúde pública e seu papel na economia de um país requer a necessidade por padrões sanitários que atendam a qualidade, segurança e redução de transmissão de doenças veiculadas por alimentos. Portanto, respeitando os critérios de equivalência, a probabilidade de exigência para adoção de padrões de aminas biogênicas para carne e produtos cárneos, por parte dos países importadores pode sinalar uma adaptação da legislação vigente. Esta já é uma realidade para aceitação de pescado pelo mercado externo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a formação de aminos biogênicas em embutidos cárneos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar o potencial de formação de aminos biogênicas no salame tipo Italiano e no salame cozido;
- Avaliar o efeito da cultura *starter* na formação de aminos biogênicas;
- Avaliar a influencia de fibra insolúvel na formação de aminos;
- Verificar a influencia das aminos biogênicas nas características sensoriais do salame tipo Italiano e do salame cozido.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Aminas Biogênicas

As aminas biogênicas (ABs) são definidas de forma geral como bases orgânicas de baixo peso molecular (alifáticas, acíclicas ou heterocíclicas), biologicamente ativas (FADDA, 2001; HÁLASZ, 1994; LIMA; GLÓRIA, 1999; GENNARO, 2003) que atuam sobre o sistema nervoso central e vascular, neste grupo encontram-se as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina), a serotonina, e outras (BOURGEIOS; LARPENT, 1994).

Na área de alimentos, o termo aminas biogênicas é usado para designar o grupo de aminas não voláteis como a histamina, cadaverina, espermina, putrescina, tiramina, triptamina (BOURGEIOS; LARPENT, 1994).

Estas são formadas e degradadas como resultado normal do processo metabólico nos animais, plantas e microrganismos geralmente produzidos pela descarboxilação de aminoácidos, mas também pela aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (BELITZ; GROSCH, 1997; HALÁSZ, 1994; SILLA, 1996; SMITH, 1980; TEN BRINK, 1990).

Um subgrupo de ABs de baixo peso molecular são os compostos catiônicos sintetizados de metionina e ornitina, denominadas de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), participantes nas vias de regulação (SMITH, 2000). As poliaminas são compostos estáveis capazes de resistir a condições ácidas, alcalinas e inclusive ao calor (BARDÓCZ, 1995). São importantes na regulação da função dos ácidos nucléicos, síntese de proteínas e provavelmente na estabilização de membranas (SMITH, 1980).

A pesar de não se conhecer exatamente as funções da putrescina, espermina e espermidina, elas são amplamente distribuídas na natureza, havendo altas concentrações nas células e tecidos com altas taxas de crescimento (LIMA; GLÓRIA, 1999). Acredita-se que sejam compostos anabólicos com propriedades semelhantes aos hormônios (SMITH, 2000). A síntese de aminas encontra-se representado esquematicamente na Figura 1.

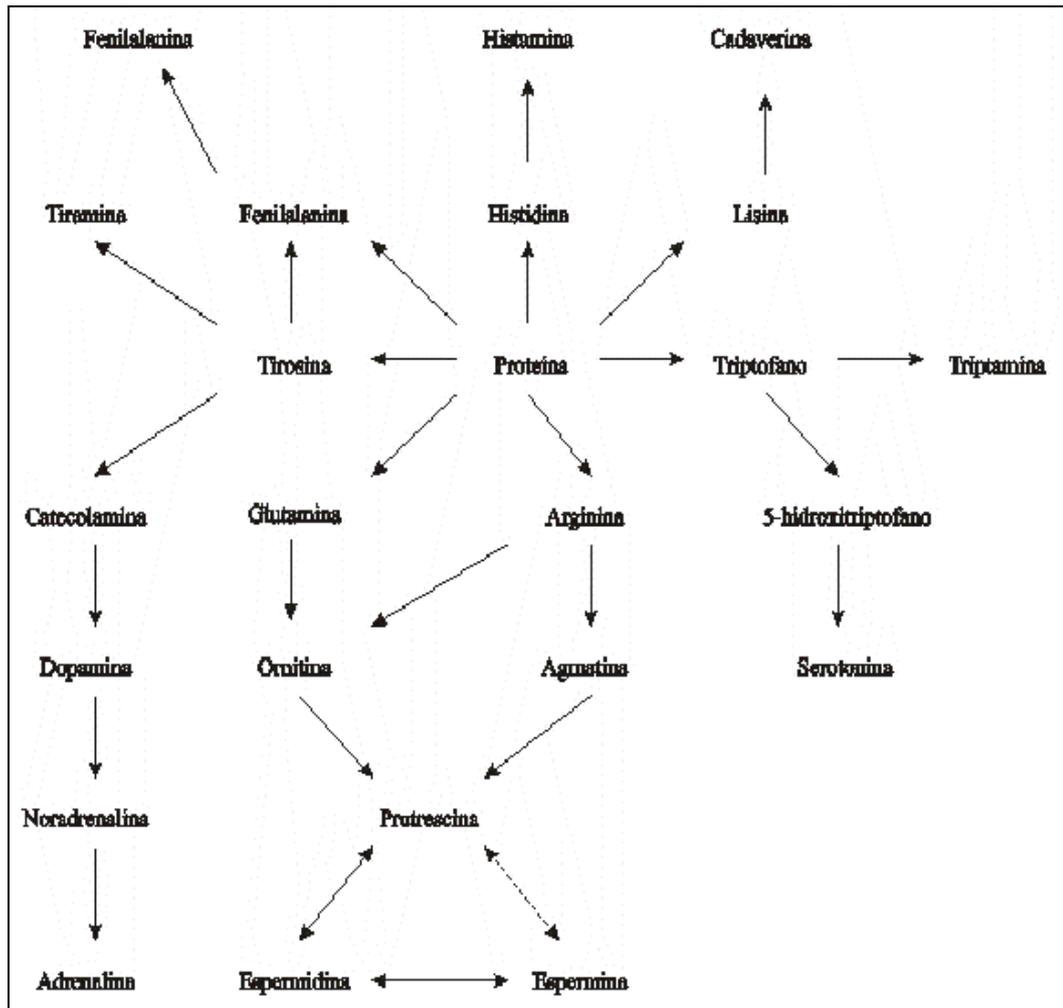


Figura – 1 Síntese de aminas a partir de aminoácidos precursores (CIRILO, 2003; HALÁSZ, 1994; LIMA; GLÓRIA, 1999)

Otimizando-se os teores de espermina e espermidina na ração, pode-se obter maior crescimento e desempenho animal. Contudo, o excesso destas na dieta pode induzir crescimento exagerado de alguns órgãos e acelerar o câncer (GLÓRIA, 2001). As aminas serotonina, histamina e tiramina desempenham papéis importantes em muitas funções fisiológicas humanas e animais (HALÁSZ, 1994).

Tkachenko (2001) destaca a importância da putrescina, envolvida na proteção celular contra o estresse oxidativo como um modulador na expressão dos genes. A putrescina desempenha um papel importante no metabolismo de células epiteliais, apresentando uma forte regulação dos seus níveis (BARDÓCZ, 1998).

As aminas são essências para o crescimento e saúde, porém, se presentes no alimento em altas concentrações podem causar efeitos adversos, sendo

acentuados em indivíduos sensíveis ou em tratamento com fármacos inibidores da monoaminoxidase (LIMA; GLÓRIA, 1999).

A formação de ABs através da descarboxilação de aminoácidos precursores produz: histamina (histidina), tiramina (tirosina), triptamina (triptofano), putrescina (ornitina), cadaverina (lisina) também, espermina 1,4-bis-(3'-amino-propilamino)-butano e espermidina 3'-aminopropil-1,4-diamino-butano, em quantidades muito pequenas (Quadro 1). A autólise prolongada e incipiente decomposição bacteriana podem dar lugar a incremento das ABs (BELITZ; GROSCH, 1997).

Aminoácidos	→	Aminas
Histidina	→	Histamina
Tirosina	→	Tiramina
Hidroxitriptofano	→	Serotonina
Triptofano	→	Triptamina
Lisina	→	Cadaverina
Ornitina	→	Putrescina
Arginina	→	Espermina
Arginina	→	Espermidina

Quadro 1 – Precursores das ABs nos alimentos (SILLA, 1996)

Um critério essencial da qualidade dos alimentos é o estado de higiene, o qual será determinado decisivamente pela presença de atividade dos microrganismos (TREVÍÑO, 1997). De qualquer forma a ação dos microrganismos é muito complexa envolvendo diversas reações enzimáticas (LEUSCHNER; HAMMES, 1998).

A determinação de ABs, em carnes, resulta de um método apropriado para detectar uma incipiente decomposição, sendo que, a sua quantificação outorga uma visão sobre o grau de frescor da carne (VINCI; ANTONELLI, 2002). Assim, o chamado índice de aminas biogênicas foi proposto por Treptow; Askar (1987) como um critério para o controle de qualidade dos alimentos. Este índice também foi proposto como indicador de frescor para peixes e produtos marinhos (MIETZ; KARMAS, 1977).

### 3.2 Classificação

As aminas apresentam variadas formas de classificação. Podem ser classificadas em função do número de grupos amina, de sua via sintética e da sua estrutura química (BARDÓCK, 1995; IZQUIERDO-PULIDO, 1996; LIMA; GLÓRIA, 1999; SILLA, 1996; SMITH, 1980; VECIANA-NOGUÉS, 1997a). A representação da estrutura química de algumas aminas pode ser observada na figura 2.

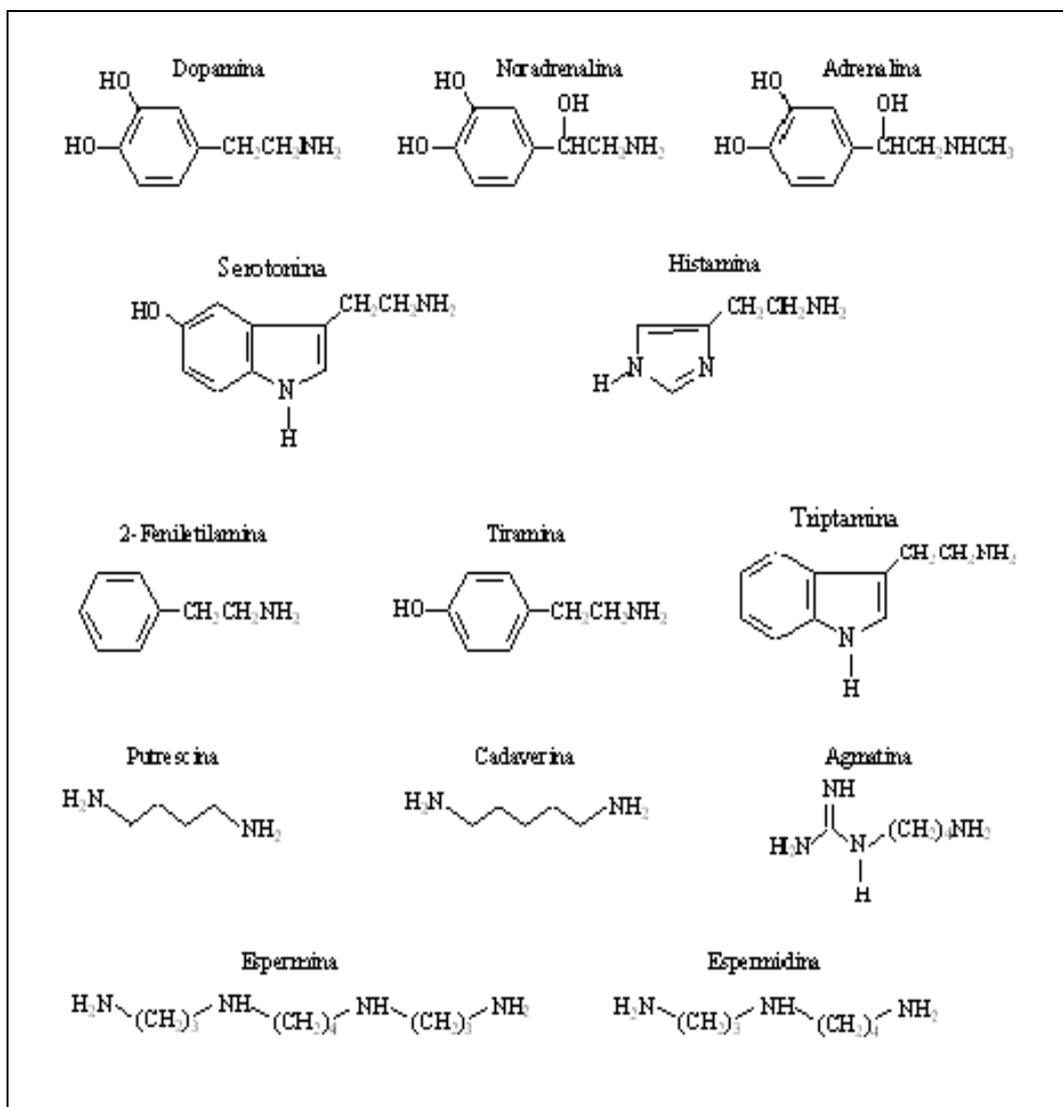


Figura 2 – Estrutura química de algumas aminas (IZQUIERDO-PULIDO, 1996; LIMA; GLÓRIA, 1999; SMITH, 1980)

- Quanto ao número de grupos amina. As ABs classificam-se como: monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina, e agmatina).
- Quanto à via sintética se dividem em: biogênicas e naturais. As primeiras formadas pela descarboxilação dos aminoácidos precursores por enzimas microbianas tais são; histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina. Já as naturais são formadas *in situ* à medida que são necessárias (putrescina, agmatina, espermina e espermidina).
- Quanto à sua estrutura química classificam-se como: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina). Ainda quanto à sua estrutura química a classificação em função ao grupo químico tem-se: catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolaminas (histamina).

### 3.3 Ocorrência de aminas biogênicas em alimentos

Teoricamente, todo o alimento que contenha proteínas e esteja sujeito a condições que facilitem o crescimento de microrganismos ou a atividade bioquímica destes, poderá favorecer o surgimento de aminas biogênicas (Quadro 2).

<b>Aminas Naturais</b>		
<b>Monoaminas</b>	<b>Diaminas</b>	<b>Poliaminas</b>
	putrescina, cadaverina	espermina, espermidina, agmatina
<b>Aminas Biogênicas</b>		
<b>Monoaminas</b>	<b>Diaminas</b>	<b>Poliaminas</b>
feniletilamina, serotonina, tiramina	histamina, triptamina, putrescina, cadaverina	Agmatina

Quadro 2 – Aminas freqüentemente encontradas em alimentos (BARDÓCK, 1995)

A quantidade total das diferentes ABs formadas depende fortemente da natureza do alimento e da presença de microrganismos (TEN BRINK, 1990).

Encontramos as ABs presentes numa faixa ampla de alimentos que incluem pescados, carnes, laticínios, vinhos, cervejas, frutas, nozes, chocolates, e outros. Inúmeras publicações reportam a presença de ABs em alimentos, podendo destacar: Arena; de Manca, 2001; Bover-Cid, 1999a; Glória; Izquierdo-Pulido, 1999; Goñi, 2001; Kerr, 2002; Landete, 2001; Leuchner, 1998; Özogul, 2002; Soares, 1998.

### 3.3.1 Ocorrência de aminas em alimentos não fermentados

A presença de ABs em alimentos não fermentados é um indicativo de atividade microbiana, podendo ser usado como indicador da deterioração de origem microbiana (TEN BRINK, 1990). Muito embora, a presença de ABs em alimentos não está necessariamente correlacionado com o crescimento de microrganismos deteriorantes (VIDAL-CAROU, 1990b).

Os peixes da família *Scombridae* têm sido freqüentemente associados com quadros de intoxicação decorrentes da presença de histamina (SILLA, 1996). As crianças apresentam maior sensibilidade à histamina do que os adultos (SU, 2000).

As aminas trimetilamina e dimetilamina estão presentes em pescados (TRICKER, 1991). Onde altos níveis de trimetilamina é resultado da atividade enzimática bacteriana (indicativo do grau de deterioro microbiológico em pescados), já dimetilamina é um produto da atividade enzimática dos músculos do pescado (VECIANA-NOGUES, 1997b).

Halász (1994) refere níveis elevados de aminas em suco de laranja (noradrenalina, triptamina); tomate (tiramina, triptamina, histamina); banana (tiramina, noradrenalina, triptamina, serotonina); ameixas (tiramina, noradrenalina); espinafre (histamina).

No leite materno apresentando grande variabilidade individual foram detectadas espermina, espermidina e putrescina (TEN BRINK, 1990). A metilamina encontra-se presente no músculo bovino em quantidades da ordem de  $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , outras aminas alifáticas voláteis (dimetil-, trimetil-, etil-, dietil-, isopropilamina) existem em quantidades traços (BELITZ; GROSCH, 1997).

### 3.3.2 Ocorrência de aminas em alimentos fermentados

Durante o processamento de alimentos, os produtos são incubados por dias, semanas ou meses para obterem as propriedades desejáveis aos embutidos fermentados e maturados. Nos períodos iniciais da fermentação pode se esperar o surgimento de vários tipos de microrganismo (TEN BRINK, 1990).

O *Lactobacillus sake* parece ser de fundamental importância no processamento de carnes. Esta espécie está adaptada ao ambiente e constitui uma das espécies características de microrganismos responsáveis pelas fermentações naturais (LANGELLA, 1996).

Os queijos e produtos lácteos depois dos pescados são alimentos comumente associados com intoxicações por histamina, presente no queijo tipo gouda (LINDNER, 1995).

Nos produtos cárneos o conteúdo de aminas está na dependência do tipo de microrganismo ou composição de microrganismos presentes. Grandes diferenças são encontradas na fabricação de salames de diferentes origens, apesar de ter se usado a mesma cultura *starter* no processo de fabricação (TEN BRINK, 1990).

Níveis elevados de histamina foram encontrados em escombrídeos, ao passo que a tiramina foi encontrada em queijos maturados. Níveis médios são freqüentemente observados em produtos fermentados incluindo o saurkraut (KALAC, 1999).

## 3.4 Matérias-primas e fontes de contaminação

O tecido animal vivo é livre de microrganismos, os glóbulos brancos e os anticorpos produzidos controlam eficazmente os agentes infecciosos (FORREST, 1979). Os animais destinados à produção de carne apresentam superfícies corporais extensas, regiões úmidas, trato gastrointestinal desenvolvido e aberturas naturais (boca, conduto auditivo, etc.), podendo constituir fontes de contaminação, desde que, não se tomem as medidas pertinentes (PRÄNDL, 1994).

Durante as operações de abate, desossa e preparação de cortes a carne é contaminada por diferentes espécies de microrganismos, provenientes especialmente da parte externa do animal, trato gastrointestinal, assim também, pelo uso de equipamentos contaminados (facas, bandejas, e outros). A maioria das

espécies de microrganismos é capaz de produzir alterações desde que, encontrem as condições apropriadas para seu crescimento (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Boas condições higiênicas, após a divisão das carcaças e no início do resfriamento apresentam entre  $10^3$  e  $10^5$  microrganismos por centímetro quadrado, comumente os coliformes e psicrotrofos constituem de  $10^1$  a  $10^2$  microrganismos por centímetro quadrado, ocorrendo alterações organolépticas quando os microrganismos superam  $10^7$  por grama (PRÄNDL, 1994).

Após o abate dos animais as mudanças associadas com a transformação do músculo em carne, armazenamento e manipulação subsequente trazem certo grau de deterioro, muito embora, se tomem os cuidados apropriados durante a manipulação e o processamento (FORREST, 1979).

A refrigeração é o ponto crítico de controle que determina a qualidade microbiológica da carne; de forma geral, à refrigeração deve ser adotada o mais rápido possível (BELITZ; GROSCH, 1997; VARNAM; SUTHERLAND, 1998).

A carne moída fresca apresenta contagens de microrganismos para bactérias aeróbias mesófilas de  $10^5$  a  $10^7$ /g. Em 1903 Marxer propôs  $10^6$ /g (JAY, 1996). O número máximo de microrganismos mesófilos aeróbicos aceitáveis na carne refrigerada é de  $10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> (TERRA, 1998).

### **3.5 Starter e microrganismos da fermentação cárnea**

Em carnes (*in natura* ou curadas) encontramos bactérias lácticas pertencentes aos gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Brevibacterium* e *Pediococcus* apresentando capacidade de multiplicação sob temperaturas de refrigeração, sua multiplicação limitada não diminui a qualidade da carne; pelo contrário, em certos tipos de embutidos, como o salame a fermentação láctica é estimulada (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

As culturas *starter* usadas no processamento de carnes podem conter leveduras, mofos e bactérias (HAMMES; KNAUF, 1994), são, por definição, microrganismos inoculados na massa ou peças cárneas, a fim de garantir à indústria a padronização dos métodos de elaboração dos produtos (LACAZ, 1992), reduzido o tempo de maturação, obtendo produtos com melhores características organolépticas, nutricionais, químicas e mercadológicas (GRIS, 2002) tendo

importante papel nas fermentações originando o *flavor* e mudanças na textura, junto ao efeito conservador que resulta no incremento de vida útil (HUGAS, 1998).

Entre as bactérias naturalmente presentes em salames (MONTEL, 1993), espécies úteis foram selecionadas como *starter* (os gêneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* não patogênicos e *Micrococcus*).

Dentre os produtos cárneos onde se inoculam os *starters*, destacam-se os embutidos fermentados (LACAZ, 1992) onde, as bactérias ácido lácticas são agentes essenciais no processo de maturação (HAMMES, 1990). O quadro 3 ilustra alguns microrganismos usados como culturas *starter*.

<b>Produto cárneo</b>	<b>Microrganismos</b>
Presunto	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>
Salame	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> & <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> & <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> & <i>Staphylococcus carnosus</i>
Embutido	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus casei</i> & <i>Micrococcus</i> 104
	<i>Lactobacillus plantarum</i> & <i>Micrococcus violagabriella</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i> & <i>Staphylococcus carnosus</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i> & <i>Micrococcus aurianticus</i>
	<i>Debaromyces hansenii</i> & <i>Micrococcus</i> 104
	<i>Micrococcus violagabriella</i>
	<i>Micrococcus</i> 104 & <i>Streptococcus lactis</i>
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> & <i>Staphylococcus carnosus</i>

Quadro 3 – Microrganismos usados como culturas *starter* (TERRA, 2001)

Os *Micrococcus* e *Staphylococcus* atuam na coloração, sabor e aroma dos salames. Na coloração a atuação se dá de duas formas distintas; reduz o nitrato a nitrito aumentando a disponibilidade de óxido nítrico para reagir com a mioglobina e destrói a água oxigenada (possui catalase) que pode ser liberada ao meio face à ação de lactobacilos heterofermentadores (TERRA, 1998).

O desenvolvimento de cor ocorre em condições de acidez quando, o óxido nítrico é produzido a partir do nitrito podendo reagir com a mioglobina. A inibição dos microrganismos patogênicos e deteriorantes é consequência do acúmulo do ácido láctico e em menor proporção do ácido acético, ácidos graxos, peróxido de hidrogênio, bacterocinas e outros (HUGAS; MANFORT, 1997).

Os organismos nitrato-redutores em produtos cárneos são representados por *Micrococcus* e algumas linhagens de *Streptococcus faecium* redutores de nitratos embora, sejam indesejáveis devido a possuírem outras características como a capacidade proteolítica (*Staphylococcus*). Também pertencem à flora do curado, além dos microrganismos do grupo sorológico D (*Micrococcus*, *Streptococcus*), os *Lactobacillus* e algumas estreptobactérias atípicas como *Leuconostoc* e *Pediococcus* (PRÄNDL, 1994).

Os *Lactobacillus* e *Pediococcus* são essencialmente acidificantes, pois, a partir de açúcares produzem ácido láctico, o que impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, melhorando a coloração, acelerando a desidratação, o que comunica o típico sabor ácido característico dos produtos cárneos fermentados (TERRA, 1998).

Além das espécies citadas podem-se mencionar outras como: *Escherichia*, *Achromobacter* e *Pseudomonas*; sarcinas e leveduras aceitas como microrganismos da maturação, atribuindo-lhes a produção do aroma; embora, grande número possa influenciá-lo devido as diferentes capacidades metabólicas (PRÄNDL, 1994).

A melhoria do sabor e aroma é conseguida pelo fato dos microrganismos possuírem enzimas proteolíticas e lipolíticas que, ao agirem sobre as proteínas e gorduras, geram peptídios, aminoácidos e ácidos graxos (TERRA, 1998).

Em fermentações espontâneas, os LABs derivados da matéria-prima ou do ambiente são responsáveis pela produção do ácido láctico e o decréscimo do pH (5,9 a 4,6). Assim, obtém-se a coagulação de proteínas musculares, resultando na fatiabilidade, firmeza e coesão do produto final (HUGAS; MANFORT, 1997).

### **3.6 Embutidos Fermentados Curados Salame**

Os embutidos fermentados são produtos da fermentação láctica, de carne picada, misturadas com gordura, sal, agentes de cura (nitrito e nitrato), açúcar e especiarias (CAPLICE, 1999).

A fabricação do salame ocorre em duas etapas distintas. Na etapa inicial, ocorre a fermentação com o desenvolvimento das características sensoriais do salame e em uma etapa final a desidratação que, além de reforçar algumas propriedades sápidas, reduz a atividade de água a níveis insuportáveis aos microrganismos responsáveis pela deterioração do produto (TERRA, 1998).

A maioria dos embutidos curados é produzida de carne suína embora seja possível o curado de carne bovina (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). O curado dos embutidos cárneos consiste na adição de substâncias como: cloreto de sódio, nitrito ou nitrato de sódio, açúcar (sacarose, glicose), podendo agregar-se especiarias para influenciar no sabor.

Outrora, o propósito do curado era a conservação, hoje, as carnes curadas são elaboradas para satisfazer a demanda por produtos com características sensoriais especiais e quando necessária à conservação, opta-se por outros métodos (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

### **3.7 Alergias e intolerância alimentares**

A intolerância alimentar é uma reação reproduzível adversa a um alimento específico que não oferece bases psicológicas e que ocorre quando o alimento é ingerido de forma que resulte impossível identificá-lo (LESSOF, 1995).

O termo hipersensibilidade alimentar, é usado para designar uma reação adversa aos alimentos (JOHANSSON, 2001). Alguns alimentos e aditivos alimentares podem desencadear dores de cabeça, principalmente agentes farmacológicos presentes em alimentos como as aminas; tiramina, feniletilamina, histamina, álcool etílico, nitrato e glutamato monossódico (VAUGHAN, 1994). A intolerância é uma forma de hipersensibilidade que não é mediada pelo sistema imune em contraste com as reações alérgicas (JANSEN, 2003).

Alergia alimentar é uma intolerância aos alimentos onde são evidentes reações imunológicas similares, as que ocorrem com o organismo quando este se defende do ataque de agentes infecciosos ou agentes com capacidade de danificá-lo (LESSOF, 1995). O termo alergia alimentar é usado quando ocorre a manifestação do sistema imunológico mediado por imunoglobulinas aumentando a atividade da IgE (JOHANSSON, 2001).

As reações adversas resultado de ABs tem sido classificadas freqüentemente como reações de intolerância, também conhecidas como, pseudo-alergias ou falsas alergias alimentares (JANSEN, 2003). O quadro 4 resume algumas manifestações clínicas presentes nas alergias alimentares.

<b>Digestivas</b>	<b>Respiratórias</b>	<b>Cutâneo-mucosas</b>	<b>Outras</b>
Dor abdominal	Renite	Urticária	Anafilaxia
Náusea e vômitos	Asma	Angioedema	Conjuntivites
Diarréia, constipação	Tosse crônica	Prurido	Artrites
Má absorção	Otopatia serosa	Dermatite atópico	Sín. Tensão-fadiga
Enteropatia	Edema de glotes	Dermatite perianal	Enurese, cistite
Colite ulcerativa	Pneumonia recorrente	Dermatite herpetiforme	Cefaléia
Cólicas	Hemossiderose pulmonar	Síndrome oral, aftas	Rechaço
Enfermidade celíaca		Rash de contacto	Morte súbita

Quadro 4 – Manifestações clínicas atribuíveis a alergias alimentares (FMEDIC, 2003)

Por anos, se prático a prescrição de dietas livres de histamina para pacientes que sofriam de urticária crônica. Pessoas saudáveis podem experimentar dores agudos de cabeça e vermelhão após a ingestão de quantias abundantes de histamina. Isto pode ocorrer em intoxicações por escombrídeos (ORTOLANI, 1999).

Os sintomas aparecem entre 10 a 30 minutos depois de comer pescado deteriorado. Porém, a ingestão de fortes doses de histidina/histamina não é *per se* suficiente para causar a síndrome. Para isto, é necessário que a histamina seja realçada por outras toxinas presentes no pescado (ORTOLANI, 1999). O efeito toxicológico da histamina depende da concentração ingerida, presença de outras amins, atividade de aminoxidasas e da fisiologia intestinal do individuo (SILLA, 1996).

Embora existam inúmeras publicações sobre efeitos adversos associados ao consumo de alimentos ricos em amins; Jansen (2003) não encontrou relação entre ingestão oral de ABs e reações de intolerância aos alimentos, concluindo que existe falta de bases científicas para recomendações dietéticas envolvendo as ABs.

Não em tanto, Fankhauser (1994) identificou a dose de  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  *per os* como o limiar para induzir um significativo aumento hipertensivo, observando o incremento no pico na pressão sistólica em aproximadamente 7 a 8 minutos após administração de tiramina. A hipertensão sanguínea consequência da ingestão de tiramina muitas vezes origina o quadro de enxaqueca (FEHLHABER; JANETSHKE, 1995). A histamina representa apenas um elemento do enigma bioquímico que constitui a enxaqueca (HAIMART, 1987).

A dificuldade no diagnóstico das reações alérgicas induzidas por alimentos reside na diversidade dos mecanismos implicados; a subjetividade na interpretação das manifestações clínicas, em especial quando existem alimentos com altos níveis de histamina ou substâncias que liberam histamina; e a falta de extratos alérgenos disponíveis (FMEDIC, 2003).

O diagnóstico de alergia a pescado inclui adicionalmente dificuldades desde o envenenamento por escombrídeos, que é causado pela ingestão de escombriotoxina acumulada durante o deterioro dos peixes. De perto, se assemelha a uma reação de alergia aguda (SMART, 1992). A intoxicação pelo atum assemelha-se muito a intoxicação por histamina e eventualmente pode ser idêntica (LINDNER, 1995).

### **3.8 Limite tóxico**

Muito embora, hoje em dia não esteja definitivamente bem estabelecido quais são as quantias de ABs que deveriam ser consideradas como habituais/inevitáveis, ou como micro-componentes dos alimentos e quais os níveis de ABs que indiquem processo de deterioração e/ou defeitos nos processos de elaboração (BOVER-CID, 1999b).

Na literatura existem limiares toxicológicos propostos assim, ten Brink (1990), considera níveis entre  $500$  e  $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para alimentos, potencialmente perigosos para a saúde humana, deste modo, sugere um limite legal máximo de  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

para histamina em alimentos,  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  para bebidas alcoólicas; entre 100 e 800  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para tiramina e  $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para feniletilamina.

Níveis entre 5 mg e 10 mg de histamina em 100g como produtores de ligeiros sintomas de intoxicação, quantias superiores a 100 mg em 100g provocam sintomas graves de intoxicação aguda (dor de ventre, náuseas, desmaios e dor de cabeça), aparecendo no decorrer de uma hora pós ingestão. A intoxicação desaparece em poucas horas (LINDNER, 1995). A tiramina apresenta a dose tóxica de 250 mg embora pessoas sensíveis apresentem reação a concentrações menores. Já o período de incubação e semelhante ao da histamina (FEHLHABER; JANETSHKE, 1995).

Em geral, de 8 mg a 40 mg de histamina pode causar um ligeiro envenenamento, acima de 100 mg envenenamento moderado e acima de 1000 mg envenenamentos severos. Entre 10 mg a 80 mg de tiramina podem causar inflamações tóxicas e acima de 100 mg pode causar enxaqueca Maijala; Eerola (1993).

Leitão (1995) destaca que ao assumir uma eventual conversão de histidina livre em histamina (hipótese remota), valores potencialmente tóxicos superiores a 20 mg em 100g poderiam ser atingidos em queijos. A dose tóxica para tiramina é de 10 mg a 80 mg em 100g de alimento e para 2-feniletilamina é de 300 mg em 100g de alimento, já para histamina a dose tóxica de 100 mg em 100g de alimento e 2 mg por litro em bebidas alcoólicas (LIMA; GLÓRIA, 1999).

Os níveis referidos aos produtos cárneos são mais altos que os encontrados em produtos pesqueiros, mais estudados, tendo em vários países limites máximos aceitáveis para a histamina. A comunidade Européia determina níveis máximos (em nove amostras) de  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para o pescado fresco ou enlatado e  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para produtos maturados (KARAÇAM, 2002).

O Mercosul tem adotado limite semelhante ( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) para os pescados da família *Scombridae* e outras (SOARES, 1998). O FDA (1995) revisou o nível de ação deletéria de histamina em pescados, diminuiu o valor para menos de  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , recomendando o uso de outras análises para avaliar o frescor de pescado, incluindo a presença de outras aminas. A ocorrência de outras aminas pode potencializar ou causar efeitos fisiológicos negativos adicionais (LEUSCHENER, 1998a), as aminas putrescina e cadaverina estão associadas com este efeito aditivo (DEN BRINKER, 1995).

### 3.9 Toxicologia das aminas biogênicas

O efeito tóxico das aminas resulta difícil de ser estabelecido, pois depende da variabilidade individual, da eficiência de sistemas de destoxificação entre outros. A toxicidade pode ser pronunciada quando os mecanismos naturais do catabolismo das aminas estão deficientes ou inibidos por fármacos. A quantidade de alimento consumido e o conteúdo de aminas em outros alimentos pertencentes a uma mesma dieta são também fatores importantes a considerar.

Efeitos aditivos decorrentes do consumo de produtos como: vinhos, queijos, carnes e pescados em curtos períodos de tempo podem resultar em uma intoxicação por ABs, considerando que, o consumo isolado destes produtos não causaria prejuízo algum (IZQUIERDO-PULIDO, 1996). No quadro 5 encontramos alguns fármacos com capacidade de bloquear a diaminoxidase (DAO).

Acetilcisteína	Ambroxol	Aminofilina
Amitriptilina	Cloroquina	Ácido Clavulônico
Dihidrolazina	Isoniazina	Metamizole
Metoclopramida	Pancuronium	Propafenona
	Verapamil	

Quadro 5 – Drogas que inibem a ação da DAO (ORTOLANI, 1999)

A intoxicação mais freqüente causada por aminas envolve a histamina, como resultado da ingestão de alimentos contendo níveis elevados deste composto (LIMA; GLÓRIA, 1999). A histamina é um vasodilatador que causa uma inflamação característica no tecido epitelial. Provoca outros sintomas menos freqüentes como: vômito, enjôo, diarreia e hipertensão (WONG, 1995). Os efeitos da histamina podem ser potencializados na presença de cadaverina, que inibe a ação da enzima encarregada do seu metabolismo (SALAZAR, 2002).

A tiramina é um vasodilatador aumenta a pressão sangüínea (SMITH, 2000), induz a liberação de norepinefrina (noradrenalina) das terminações nervosas simpáticas, responsáveis pela elevação da pressão (FANKHAUSER, 1994;

LINDNER, 1995), é considerada a segunda amina envolvida em intoxicações alimentares (LIMA; GLÓRIA, 1999).

A feniletilamina e as catecolaminas (e.g. a tiramina) causam aumentos da pressão sanguínea pela contração do sistema vascular e o incremento da frequência e força de contração do coração. Estas são conhecidas como aminas vasopressoras; em contraste, a histamina reduz a pressão sanguínea causando vasodilatação (SMITH, 1980). Já cadaverina e putrescina diminuem a pressão arterial (LINDNER, 1995).

Embora a toxicidade individual das ABs esteja fora de dúvidas (TEN BRINK, 1990), resulta muito difícil determinar o limiar tóxico destes compostos (IZQUIERDO-PULIDO, 1995). Este depende da eficiência dos mecanismos de destoxificação sujeitos as variações individuais (TEN BRINK, 1990). Resultando importante não só focalizar a atenção sobre a concentração de uma amina em particular; devido a que efeitos potencializadores aditivos são passíveis de ocorrer.

Mudanças dinâmicas na legislação de alguns países permitem o uso de aditivos que poderiam ocasionar efeitos indesejáveis como reações adversas sobre determinados grupos populacionais, assim como, mudanças que poderiam mascarar a baixa qualidade sanitária dos produtos (LAUZURICA, 1997). Os alimentos preparados industrialmente podem conter aditivos como: conservantes, antioxidantes, enzimas, saborizantes, corantes e substancias para amaciar ou mudar a consistência (LINDNER, 1995).

Neste sentido, a procura por informações que possam melhor esclarecer as possíveis interações destas substancias com os alimentos ocasionando eventuais riscos à saúde, em especial, ao se tratar de pessoas sob tratamento médico com fármacos que inibam o metabolismo de xenobióticos ou indivíduos imunodeprimidos que por ventura consumam estes produtos.

As aminas putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina podem reagir com nitrito em condições ácidas formando substancias cancerígenas; as nitrossaminas (BILLS, 1973; GLÓRIA; IZQUIERDO-PULIDO, 1999, HOTCHKIISS, 1977; LIMA; GLÓRIA, 1999; WARTHESEN, 1975). As nitrosaminas são substâncias químicas com forte efeito tóxico, mutagênico, neurotóxico, nefrotóxico e cancerígeno (RYSZARD, 2002). Evitar a formação de nitrosaminas é outra razão para evitar o acúmulo de ABs em alimentos (IZQUIERDO, 1996). Por este motivo, torne-se importante à prevenção no acúmulo de ABs em alimentos curados (HALÁSZ, 1994).

Em contraste, à procura por propriedades funcionais nos produtos cárneos assim como, substâncias adicionadas neles devem formar futuras perspectivas de investigação. Neste sentido, Terra (2003a) propõe a fabricação de embutidos adicionados de fibra alimentar, esta, contribui a oferta de produtos *light* e *diet*, parte indissociável da modernidade e da cultura ao corpo (TERRA, 2003b).

### 3.10 Metabolismo de aminas

Em circunstâncias normais, às aminas são rapidamente destoxificadas por reações de conjugação ou por desaminação oxidativa, catalisada por aminoxidases mitocondrias, obtendo-se os correspondentes aldeídos inativos (WONG, 1995; SMITH, 1980; LESSOF, 1998; LIMA; GLÓRIA, 1999; LINDNER, 1995).

A primeira barreira contra a ingestão de histamina é a diaminoxidase (DAO) entérica, de suma importância para o efetivo catabolismo da histamina (VAN GELDEREN, 1992). Assim, temos a transformação da histamina pela ação da diaminoxidase em acetaldeído de imidazol e ácido imidazol acético; alternativamente a histamina pode ser *N*-metilada pela ação da *N*-metiltransferase (HMT), antes de sua conversão a ácido *n*-metilimidazolacético pela ação da monoaminoxidase.

A tiramina pode ser convertida em ácido 4-hidroxifenilacético através da ação seguida da aminoxidase e da aldeídodehidrogenase (COOPER,1997) sendo excretada na forma de ácido *p*-hidroxifenilacético (SMITH, 1980). Pacientes submetidos a tratamentos com substâncias como a tranilcipromina, inibidora de enzimas, podem acumular no sangue aminas suficientes para causar hipertensão arterial (WONG, 1995).

As aminoxidases (AO) podem ser divididas em dois grupos de acordo com o grupo prostético assim, temos: AO FAD-dependentes e as não dependentes. A monoaminoxidase (MAO) se subdivide em duas unidades MAO-A e MAO-B. A MAO oxida aminas primárias, secundárias e terciárias. A habilidade de atuar sobre aminas terciárias não é considerada uma característica de MAO-B (BENEDETTI, 2001).

A MAO cumpre um papel importante na degradação de neurotransmissores no sistema nervoso central e periférico, metaboliza monoaminas como a dopamina, serotonina e norepinefrina (ARAI, 2002).

As poliaminoxidases (PAO) são enzimas FAD-dependentes, envolvidas na conversão de poliaminas, oxidam grupos amina secundários em substratos como a monoacétilespermina e monoacétilespermidina formando espermidina e putrescina respectivamente (BENEDETTI, 2001). As poliaminas são primeiro acetiladas e em seguida oxidadas pela DAO e PAO (BARDÓCZ, 1995).

As AO não dependente de FAD também conhecidas como aminoxidases semi-carbazina sensíveis (SSAO), catalisam apenas a conversão oxidativa das aminas primarias desde que, o grupo amino este presente nas mono-, di- ou poliaminas. Dentre as AO (teciduals), as SSAO oxidam preferencialmente diaminas alifáticas (putrescina, cadaverina, histamina), sendo denominadas de diaminoxidases (DAO, histaminases), Benedetti, (2001). A continuação à Figura 3 representa de forma esquemática a classificação das aminoxidases.

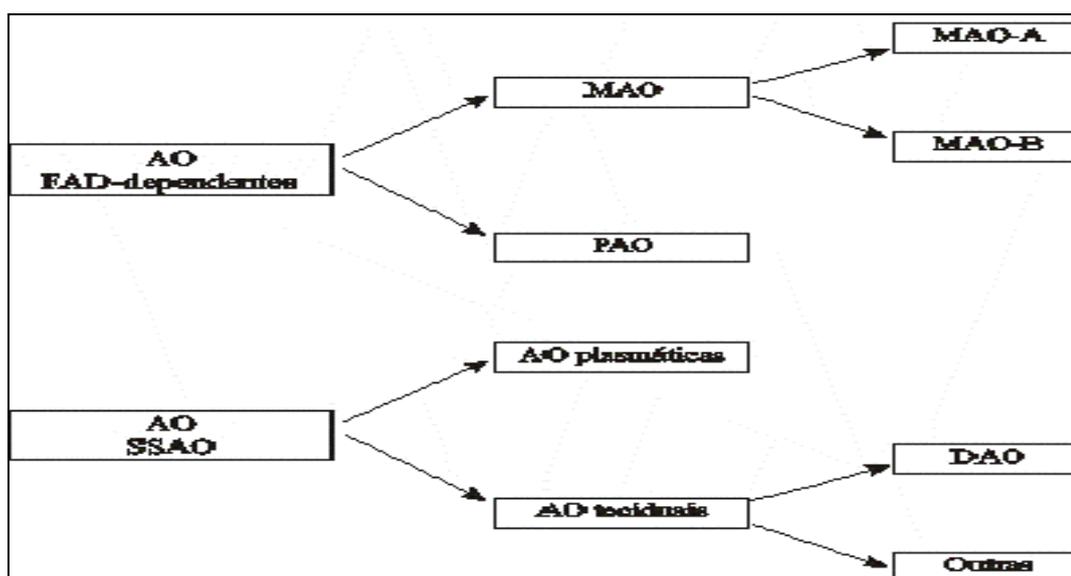


Figura 3 – Classificação das AO de acordo com o grupo prostético (BENEDETTI, 2001)

## 4 MATERIAL E METODOS

Os experimentos foram desenvolvidos na planta piloto de carnes do departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, UFSM. As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório do Departamento de Química.

### 4.1 Formulação do salame tipo Italiano

A formulação constou de 60kg de carne suína, 20kg de carne bovina e 20kg de toucinho. Observando a figura abaixo apreciamos o fluxograma de fabricação do salame.

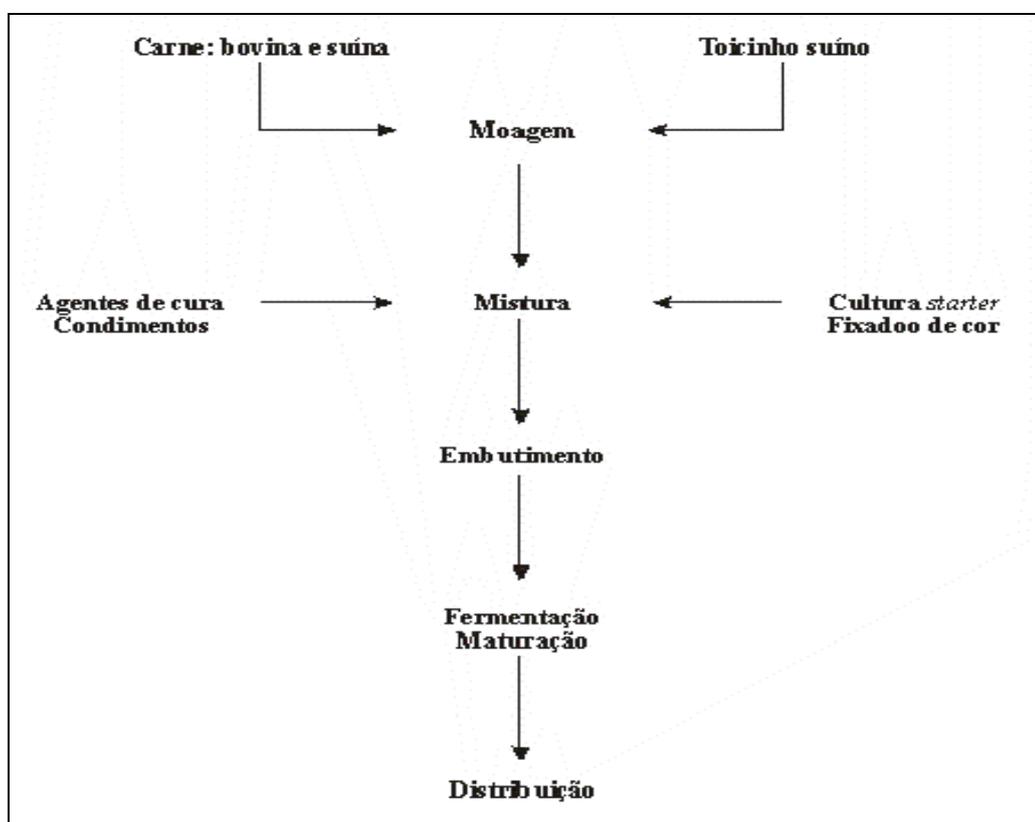


Figura 4 – Fluxograma de produção do salame tipo Italiano

Os ingredientes adicionados à massa foram: 3% de sal (Mossoró, RN); 500ml de água; 0,50% de glicose (Jonhson, SP); 0,50% sacarose; 0,20% de pimenta branca (Fucks, SP); 0,50% de alho natural (Fucks, SP); 0,02% de noz moscada (Fucks, SP); 0,25% de fixador A-80 (Laboratórios Kraki, SP) e 100g de fibra insolúvel de trigo (Vitacel, SP).

#### 4.1.1 Tratamentos para o salame tipo Italiano

A elaboração do salame tipo Italiano, constou de três lotes (o controle, *starter* e *starter* e fibra). A moagem das carnes suínas e bovinas foi realizada utilizando disco de 16mm e 3mm respectivamente. Após a moagem, as carnes foram misturadas ao sal, à cura e aos demais ingredientes, deixando-se por último a adição do fixador (massa comum). A partir desta massa foram elaborados os seguintes tratamentos: O tratamento um ( $T_1$ ) originou o controle, não tendo adição de qualquer *starter* ou fibra. O tratamento dois ( $T_2$ ) e o tratamento três ( $T_3$ ) sofreram a adição da cultura *starter* SPX (CH. HANSEN, Dinamarca), sendo que o  $T_3$  recebeu ainda a adição de fibra de trigo insolúvel, previamente dissolvida em 300mL de água. A quantidade de *starter* adicionada à massa foi de 25g para cada 100kg de massa cárnea.

Os três tratamentos foram embutidos em tripas artificiais de colágeno não comestível previamente mergulhadas em solução de ácido láctico a 2%. Em seguida foram identificados e maturados em câmara de maturação, durante vinte e um dias sob controle de temperatura, umidade relativa e velocidade do ar (Quadro 6).

Tempo (dias)	UR (%)	Temperatura (°C)	Velocidade do ar (m·s <sup>-1</sup> )
1°	95	25	0,5
2°	93	24	0,5
3°	90	23	0,5
4°	85	22	0,5
5°	80	21	0,5
6°	75	20	0,5
7°	75	18	0,2
↓	↓	↓	↓
30°	75	18	0,2

Quadro 6 – Esquema usado na câmara de maturação para o salame

#### 4.1.2 Starter

A cultura de *starter* comercial adicionada à massa cárnea do salame estava composta por linhagens de *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus pentosaceus* (Bactoferm T-SPX; CHR. HANSEN), a adição foi conforme as recomendações do fabricante. A cultura foi previamente dissolvida em água livre de cloro, sendo adicionado nos tratamentos do salame. O quadro 7 ilustra as características dos microrganismos que compõem a cultura do *starter*.

<b>Cultura Starter</b>	<b><i>Staphylococcus xylosus</i></b>	<b><i>Pediococcus pentosaceus</i></b>
Faixa de temperatura (°C)	10 - 40	15 - 48
Temperatura ótima (°C)	30	35
Limite de sal	máximo 15% em água	máximo 7% em água
pH	4,7 - 8,0	3,7 - 7,0
Necessidade de O <sub>2</sub>	anaeróbio facultativo	microaerófilo
Padrão de fermentação	glicose/galactose/ frutose/maltose/ lactose/sacarose (+) rafinose/dextrina/ amido(-)	glicose/galactose/ frutose/maltose/ lactose/sacarose/ rafinose (+) dextrina/amido (-)
Outros	catalase positivo nitrito redutor lipólise (+) proteólise (+)	Produtor de ácido láctico D/L

Quadro 7 – Características dos microrganismos da cultura SPX (NASSU, 1999)

#### 4.1.3 Fibra de trigo

A fibra de trigo adicionado ao tratamento T<sub>3</sub> (*starter* e fibra) do salame foi fornecida pela VITACEL. É composta por 98% de fibras dietéticas. Sua extração é feita a partir das várias partes do grão de trigo, por meio do refino de fibras pelo processo termo-físico, de várias partes da estrutura do trigo (VITACEL®).

## 4.2 Formulação do Salame Cozido

A formulação foi composta por 8,8 kg de carne suína; 7,3 kg de carne bovina; 5,6 de toucinho; 1,6 litros de água fria; 540g de sal (Mossoró, RN); 54g de cura comercial (Lab. Kraki, SP); 36g de eritorbato de sódio (Lab. Germinal, SP); 570g de tempero (Lab. Germinal, SP). Na Figura 5 podemos observar o fluxograma de fabricação do salame cozido.

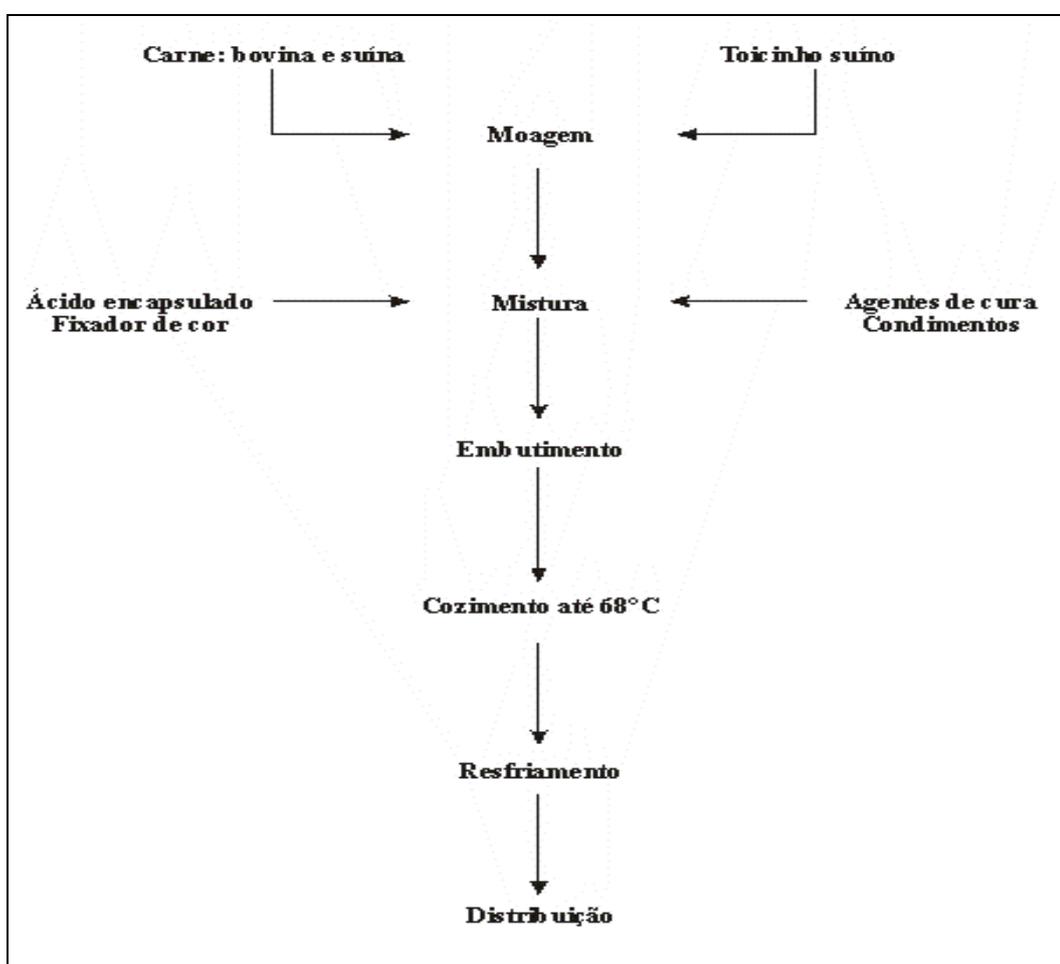


Figura 5 – Fluxograma de produção do salame cozido

O salame adicionado de ácido orgânico encapsulado e cozido é uma inovação no Brasil, portanto ainda sem uma legislação específica para padrões de identidade e qualidade (TERRA, 2003). O Sucedâneo de salame tem como

característica a inoculação de ácido orgânico micro-encapsulado e processo e cocção diminuindo o tempo de fabricação quando comparado com o processo tradicional de obtenção do salame.

#### 4.2.1 Tratamentos para o Salame Cozido

Para o salame cozido realizaram-se três lotes (controle, ácido láctico, ácido cítrico). As carnes foram moídas em discos de 16mm para carne suína e 3mm para a bovina, após moagem, adicionou-se o sal, cura comercial, e demais ingredientes.

A partir da massa comum, foram separados três lotes. O controle não sofreu adição de qualquer ácido, em quanto os outros tratamentos receberam a adição de 500g de ácido cítrico encapsulado e 400g de ácido láctico encapsulado respectivamente. Os tratamentos foram embutidos usando tripa fibrosa de colágeno não comestível, previamente mergulhada em solução de ácido láctico a 2%, identificados e cozidos em estufa de acordo com o tratamento descrito no quadro 8.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
46	45
55	75
60	105
68	30
77	Até atingir 68°C (temperatura interna)

Quadro 8 – Tempo e temperatura para obtenção do salame cozido (BALCHEM, 2001)

#### 4.2.2 Ácidos encapsulados

O ácido cítrico encapsulado (MEATSHURE™ 341) composto de 48% a 50% de ácido cítrico e por 48% a 50% de óleo vegetal parcialmente hidrogenado. O ácido láctico encapsulado (MEATSHURE™ 509), composto por 48% a 52% de lactato de cálcio contendo 27% a 33% de ácido láctico e 48% a 52% por óleos parcialmente

hidrogenados de algodão e soja. A proporção usada nos tratamentos do salame cozido foi 1,073% para o ácido cítrico e 0,515% para o ácido láctico.

### **4.3 Análises físico-químicas**

Estas análises foram realizadas ao longo dos experimentos, sendo retiradas amostras sem reposição para os ensaios.

#### **4.3.1 Determinação de umidade**

A determinação de umidade fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis a 105°C. Realizada conforme Terra; Brum (1998).

#### **4.3.2 Determinação de proteínas**

Este método se baseia na determinação de nitrogênio total, pela digestão do ácido sulfúrico, liberando carbono, gás carbônico e hidrogênio na forma de água. O nitrogênio é transformado em  $\text{NH}_3$  e fixado sobre a forma de sal amoniacal (sulfato de amônia). Na destilação a solução concentrada de hidróxido de sódio libera amônia é destilada e recebida em solução de ácido sulfúrico, de título conhecido, com o auxílio de um indicador e posteriormente titulada com solução alcalina (TERRA; BRUM, 1998).

#### **4.3.3 Determinação de gordura**

A gordura foi determinada pelo método do butirômetro utilizado para leite. O fundamento do método esta no ataque seletivo da matéria orgânica por meio do ácido sulfúrico, exceto a gordura. Logo, esta é separada usando centrifugação, com o auxílio do álcool amílico que modifica a tensão superficial (TERRA; BRUM, 1998).

#### 4.3.4 Determinação de cinzas

Segundo Terra; Brum (1998). Realizada pela perda de peso que ocorre quando o produto é incinerado (500 - 550°C), com a destruição de matéria orgânica, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização.

#### 4.3.5 Determinação da atividade de água (Aa)

A análise foi realizada usando o aparelho Testo 400 CE, comercializada pelo TESTO GMBH & CO. Seguindo a orientação do fabricante.

#### 4.3.6 Determinação do pH

A análise foi realizada usando dez gramas de amostra, homogeneizada em 100 mL de água destilada. O homogeneizado foi submetido aos electrodos do pHmetro Digimed<sup>®</sup> por 5 minutos, procedendo a leitura do pH (TERRA; BRUM, 1988).

### 4.4 Análises microbiológicas

As determinações para as amostras do sucedâneo foram às mesmas que as do salame tipo Italiano, com exceção da determinação de das bactérias ácido lácticas, que foi substituída pela contagem total de bactérias aeróbias mesófilas.

Onde alíquotas de 25g das amostras foram retiradas assepticamente, diluídas em 225mL de solução de água peptonada e homogenizadas. Realizaram-se as diluições respectivas; procedeu-se ao emplacamento, após identificação, incubação para depois fazer a contagem das placas.

#### 4.4.1 Determinação de bactérias aeróbias mesófilas

Utilizou-se Agar Padrão para Contagem - PCA (MERCK®). Tomou-se o número de colônias ou media das placas de diluições diferentes que estavam entre 30 - 300 colônias transformando-as em logaritmos decimais (SIQUEIRA, 1995).

#### 4.4.2 Determinação de bactérias ácido lácticas

As análises foram realizadas segundo Siqueira (1995), usando o Ágar para *Lactobacillus* segundo DE MAN, ROGOSA E SHARPE (ÁGAR M.R.S., MERCK®). A contagem das colônias foi realizada nas placas da mesma diluição apresentando entre 30 - 300 colônias. As médias das contagens foram transformadas em logaritmos decimais.

#### 4.4.3 Determinação de estafilococos coagulase positivo

Realizada usando Agar BAIRD PARKER (MERCK®) e a prova bioquímica da coagulase com plasma de coelho (MERCK®). Segundo Siqueira (1995).

#### 4.4.4 Determinação de coliformes totais

Segundo Siqueira (1995), usando Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (Ágar VRB, MERCK®). Tomaram-se os números de colônias ou media das placas de diluições diferentes que estavam entre 25 - 250 colônias. Logo depois os valores foram transformados em logaritmo decimal.

#### 4.4.5 Determinação de coliformes fecais

A partir das placas do Agar VRB, selecionou-se 3 - 5 colônias, semeando-se em tubos contendo caldo *Escherichia coli* (caldo EC, MERCK®), COM TUBOS DE

Durhan. Após incubação, identificaram-se os tubos com produção de gás, considerando estes positivos para a presença de *E. coli* (SIQUEIRA, 1995).

#### 4.5 Determinação das aminas biogênicas

O procedimento seguido foi de acordo com o método para determinação de ABs segundo Eerola (1993), 2g de amostra foram homogeneizadas com ácido perclórico usando Ultra-Turrax, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3000rpm, filtrou-se e retirou-se o sobrenadante para um balão. Repete-se a extração, ajusta-se no balão a combinação de ambas as extrações para 25mL.

Em seguida, 1mL do extrato obtido foi adicionado de 200 $\mu$ L de solução de hidróxido de sódio e 300 $\mu$ L bicarbonato de sódio. Depois foram adicionados 2mL de cloreto de Dansil, ficando em banho-maria a 40°C durante 45 minutos. Depois se adicionou 100 $\mu$ L de amônia para remover o excesso de Dansil, após repouso por 30 minutos ajustou-se o volume para 5mL com acetonitrila sendo centrifugado a 3000rpm por 10 minutos e retirando alíquotas de 20 $\mu$ L para injeção com o auxílio de uma micro-seringa.

A separação foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução utilizando cromatógrafo líquido 9002 Varian com injetor Rheodyne 7125 Varian em coluna de fase reversa C18 Spherisorb ODS 250 x 4,6mm, 5 $\mu$ m com pré-coluna C18 20 x 1mm, 5 $\mu$ m usando um gradiente de eluição com dois solventes.

O fluxo foi de 1mL por minuto e a detecção dos derivados dansilados a 254nm utilizando detector espectrofotométrico UV-visível 9050 Varian, Califórnia, USA. Os padrões foram adquiridos junto a SIGMA CHEMICAL CO. Os reagentes com pureza analítica, a água destilada por Milli-Q (Millipore Corp.).

A identificação das aminas foi realizada pela comparação dos tempos de retenção das amostras com os tempos de retenção dos padrões. A reta de calibração foi determinada usando-se o método de ajuste dos mínimos quadrados obtendo um coeficiente de correlação de 0,9987 e um coeficiente de determinação de 99,74 e um desvio padrão relativo inferior a 5%. Os testes de recuperação, limite de quantificação e precisão foram realizados com adição dos padrões sobre a matriz. As porcentagens de recuperação foram acima de 95% com um coeficiente de variação inferior a 5%. O limite de quantificação foi de 1mg·kg<sup>-1</sup>. A repetibilidade apresentou um coeficiente de variação de 6,69%.

#### **4.6 Análise sensorial**

As análises foram realizadas segundo método descritivo por comparação pareada, segundo Anzaldúa-Morales (1994). As análises foram realizadas por um painel de provadores não treinado composto por 20 membros avaliando as amostras do salame tipo Italiano e do salame cozido quanto aos requisitos conforme descrito no Anexo A.

#### **4.7 Análise estatísticas**

Os dados coletados num contexto de experimento inteiramente casualizado foram interpretados através da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o programa Excel, Microsoft® Office Excel 2003.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Aminas biogênicas na massa dos embutidos

As análises realizadas nas amostras de ambos os experimentos provenientes das massas (início da fabricação) que originaram os embutidos cárneos apontaram maiores concentrações de histamina, alcançando  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  na massa do salame e  $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para a massa do salame cozido. Já as concentrações de tiramina alcançaram valores de  $13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  e  $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para a massa do salame e do salame cozido respectivamente (Figura 6). A análise da massa permitiu obter uma visão geral do conteúdo de aminas no início da fabricação. Entretanto, não foi possível estabelecer a origem das aminas, considerando as matérias-primas (carnes e toucinho) usadas na elaboração dos produtos.

O toucinho não interfere nos níveis finais de aminas biogênicas (SPINELLI, 1974). Já a conservação da carne resfriada depende do seu estado higiênico, isto é, do grau de contaminação da superfície com microrganismos, que não é mais do que a higiene durante o abate (PRÄNDL, 1994).

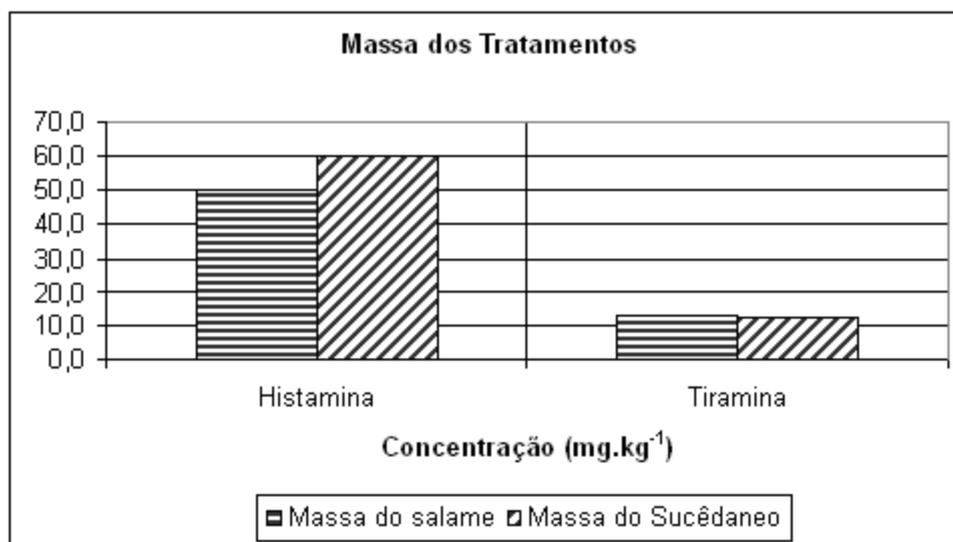


Figura 6 – Valores médios de histamina e tiramina das massas que originaram os tratamentos dos embutidos cárneos

Durante o armazenamento de carne usando temperatura entre 20°C a 22°C e 4°C a 5°C; Vidal-Carou (1990b) observou concentrações similares de histamina e tiramina (65 mg·kg<sup>-1</sup>) em carne suína em ambas as temperaturas usadas ao final do período de armazenamento (40 e 110 horas). Na carne bovina o aumento dos níveis de tiramina foi maior do que da histamina, quando usada temperatura ambiente, havendo comportamento contrario sob temperatura de refrigeração (5 mg·kg<sup>-1</sup> a 25 mg·kg<sup>-1</sup>). Como consequência do resfriamento, os processos bioquímicos que ocorrem na carne de animais recém abatidos (glicólise e maturação da carne) são retardados, mas, sem chegar a deter-se por completo (PRÄNDL, 1994).

As matérias-primas foram adquiridas no comercio varejista local estando aptas para o consumo ou processamento. Existe a possibilidade que estas sofreram variação na temperatura de resfriamento seja durante o transporte ou na conservação em balcão prévias a fabricação dos produtos e coleta de amostras para análise. Isto explicaria as concentrações de aminas já encontradas no inicio da fabricação (massa dos produtos).

A presença de aminas leva a considerar a possibilidade que, a temperatura de conservação da carne anterior à análise foi superior a 7°C (SLEMR; BEYERMANN, 1985).

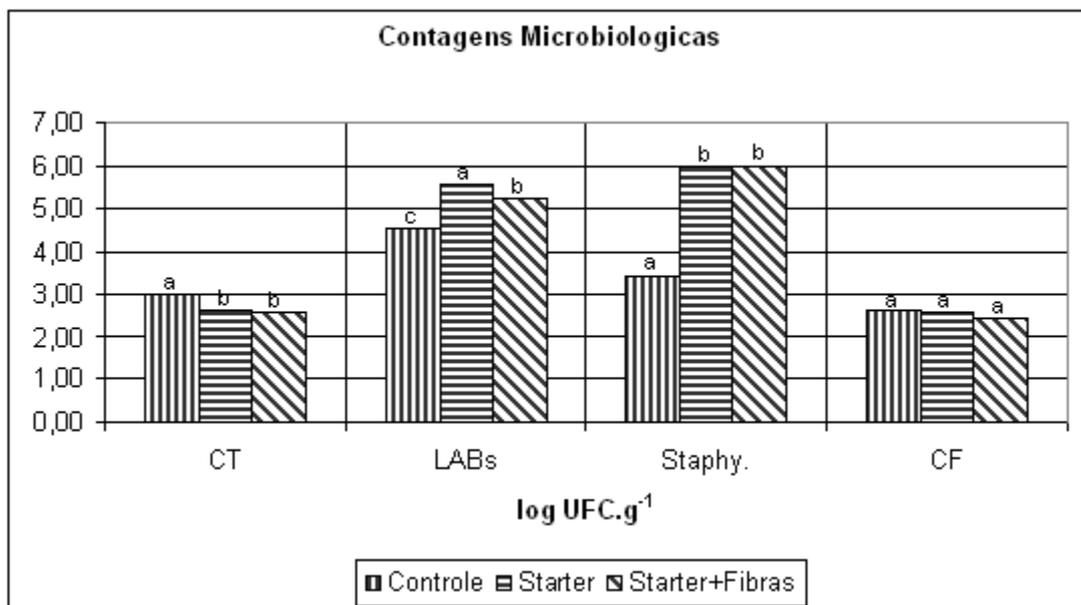
A proteólise proporciona aminoácidos livres que poderão ocasionalmente transformar-se em aminas biogênicas (HERNÁNDEZ-JOVER, 1997). Assim, o aparecimento das ABs em carne poderia estar relacionado com deterioração e em alguns casos com a degradação protéica (VINCI; ANTONELLI, 2002).

A formação da histamina no atum não esta unicamente relacionada com as contagens microbiológicas, mas evidencia sua maior dependência nas temperaturas de conservação. Quando ocorre a quebra da cadeia do frio durante a comercialização ou distribuição, o risco potencial de formação de níveis tóxicos de histamina aumenta (VECIANA-NOGUÉS, 1997b).

O armazenamento de carne por longos períodos resulta em maiores concentrações de aminas. Embutidos produzidos com carne fresca apresentam concentrações menores. Em contraste, com estas diferenças as propriedades bacteriológicas dos embutidos permaneceram sem alteração (PAULSEN, 1997). A qualidade higiênica das matérias-primas influencia a composição das concentrações de ABs. O conteúdo depende das matérias-primas usadas e da temperatura no armazenamento e maturação (BOVER-CID, 2000a).

### 5.1.1 Análise microbiológicas na massa do salame tipo Italiano

As determinações microbiológicas visam avaliar a qualidade dos alimentos, fornecendo informações quanto, ao processamento, armazenamento e distribuição (SIQUEIRA, 1995). O grupo de coliformes (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*) apresenta por *habitat* o trato gastrointestinal do homem e dos animais. Na contagem de coliformes diferenciam-se dois grupos: coliformes totais e coliformes fecais; aqueles; conhecidos como indicadores da qualidade sanitária ou da contaminação de alimentos, evidenciando falhas nas práticas de higiene e sanificação; estes, utilizados como indicadores de contaminação fecal, denotando condições higiênico-sanitárias deficientes. A determinação de ambos os grupos indica a qualidade higiênica em relação a procedimentos de abate, manipulação e armazenamento. A análise estatística usando o nível de significância ( $p < 0,05$ ) demonstrou diferenças para todos os gêneros de microrganismos enumerados com exceção dos coliformes fecais que apresentaram contagens consideradas altas próximas a  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> (Figura 7).



Valores médios (n=3; duas determinações) sem letra em comum diferem  $p < 0,05$

Figura 7 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), *Staphylococcus* coagulase negativa (*Staphy.*) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano no início da fabricação

Os valores alcançados para os coliformes totais apresentaram maiores contagens no tratamento controle ( $10^3$  UFC·g<sup>-1</sup>). Alcançando contagens próximas a  $10^2$  UFC·g<sup>-1</sup> nos outros tratamentos (*starter* e *starter* e fibra). Os valores encontrados são considerados constituintes da flora presente nas matérias-primas (PRÄNLD, 1994), compatíveis com os limites máximos aceitáveis para industrialização (TERRA, 1998).

Existe grande probabilidade que os microrganismos presentes na massa dos produtos componham gêneros capazes de produzir aminas biogênicas. Muito embora, não tenham sido identificados, às contagens microbiológicas permitem realizar esta afirmação. Estes gêneros determinaram os teores totais das aminas nos produtos acabados.

As bactérias ácido lácticas apresentaram contagens próximas a  $10^4$  UFC·g<sup>-1</sup> para o tratamento controle e contagens próximas a  $10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> para os tratamentos *starter* e *starter* e fibra. Grande número de bactérias ácido lácticas (LABs) no alimento tem com principais causas: matérias-primas contaminadas, limpeza e desinfecção inadequadas dos equipamentos e utensílios, condições inadequadas de processamento especialmente com relação à exposição do produto a temperatura de multiplicação e contaminação cruzada (SIQUEIRA, 1995).

O tratamento controle apresentou as menores contagens de *Staphylococcus* spp. ( $10^3$  UFC·g<sup>-1</sup>) quando comparado com o *starter* e o *starter* e fibra que alcançaram contagens de  $10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> para ambos os tratamentos. A maior presença de LABs e *Staphylococcus* spp. nos tratamentos T<sub>2</sub> (*starter*) e T<sub>3</sub> (*starter* e fibra) se deve à adição da cultura *starter* em ambos tratamentos.

Nota-se também a presença de gêneros de LABs e *Staphylococcus* spp. no T<sub>1</sub> (controle), consideram-se estes, como pertencentes à flora nativa da carne usada na elaboração do produto ou procedentes do entorno ou da contaminação das matérias-primas. A prova bioquímica da coagulase usando plasma de coelho realizado nas amostras mostrou-se sempre negativa.

Muito importante no uso de culturas *starter* é a quantidade a ser adicionada a massa cárnea, pois o número de microrganismos *starter* deve superar ao menos em dois ciclos logarítmicos ao número de organismos presentes nas carnes usadas como matérias-primas (TERRA, 1998). Adição de *starter*, condições tecnológicas favoráveis para seu crescimento e matérias-primas com boa qualidade higiênica,

fazem possível produzir embutidos com pequenas quantias de aminas (BOVER-CID, 2000b; 2000c).

A origem e em especial a temperatura de conservação das matérias-primas têm que ser consideradas variáveis importantes no controle da formação de aminas, procurando assim, vir a ter embutidos seguros do ponto de vista higiênico-sanitário, prevenindo em certos estratos populacionais, possíveis reações adversas a este tipo de produto ou ainda, efeitos aditivos pelo consumo conjunto de outros produtos contendo aminas ou à ação de fármacos inibidores de aminoxidasas.

O uso de cultura *starter* e manipulação apropriada da carne influencia os níveis de ABs formadas nos embutidos (MAIJALA, 1995a). Elevado número de bactérias nas matérias-primas, pobres em qualidade higiênica, diminuem os efeitos benéficos da cultura *starter*. Assim, a eficiência desta depende fortemente da qualidade higiênica das matérias-primas (BOVER-CID, 2001c).

### 5.1.2 Análises microbiológicas da massa do Salame Cozido

Os microrganismos aeróbios mesófilos constituem o grupo que inclui a maioria de microrganismos acidificantes. Estes têm sido utilizados como indicadores microbiológicos de qualidade, proporcionando uma idéia sobre o tempo de vida útil; apontando matérias-primas contaminadas ou processamento insatisfatório, bem como, tempo e temperatura inadequados durante produção ou armazenamento.

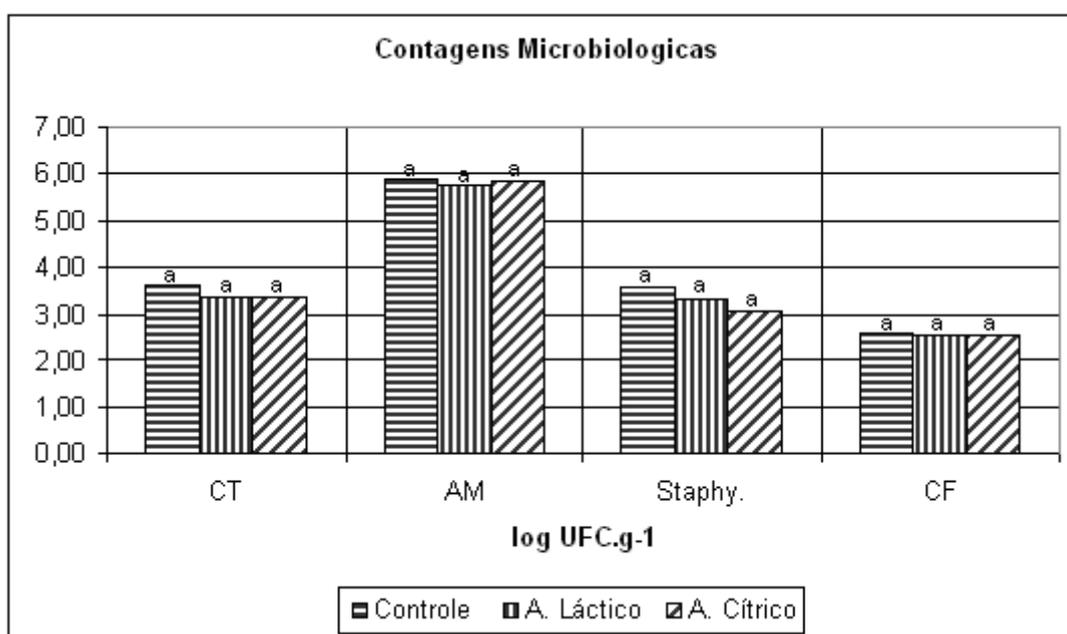
A contagem detecta bactérias aeróbias ou facultativas e mesófilas presentes nas amostras seja na forma vegetativa ou esporulada (SIQUEIRA, 1995).

Os coliformes totais apresentaram valores próximos a  $10^3$  UFC·g<sup>-1</sup>, já a contagem para os microrganismos aeróbios mesófilos foi menor que  $10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> e para os *Staphylococcus* ssp. foram encontrados valores em torno de  $10^3$  UFC·g<sup>-1</sup>. Estes valores apresentam-se compatíveis com os valores máximos aceitáveis para o processamento das matérias-primas na indústria de carnes (TERRA, 1998).

A prova bioquímica da coagulase usando plasma de coelho realizada nas amostras apresentou resultado negativo. A presença de *S. aureus* nos alimentos é interpretada como indicativo de contaminação a partir da pele, boca e fossas nasais, bem como, limpeza e sanitização inadequada dos materiais e equipamentos. A identificação de cepas tóxico-gênicas se realiza usando a prova bioquímica com

plasma de coelho (SIQUEIRA, 1995). O elevado número de microrganismos pertencentes a gêneros capazes de produzir aminas reforça a idéia de possíveis detrimientos na temperatura de conservação das matérias-primas.

A análise estatística (teste de Tukey) constatou que não houve diferença para o nível testado ( $p < 0,05$ ). Podemos observar a representação gráfica dos resultados na Figura 8.



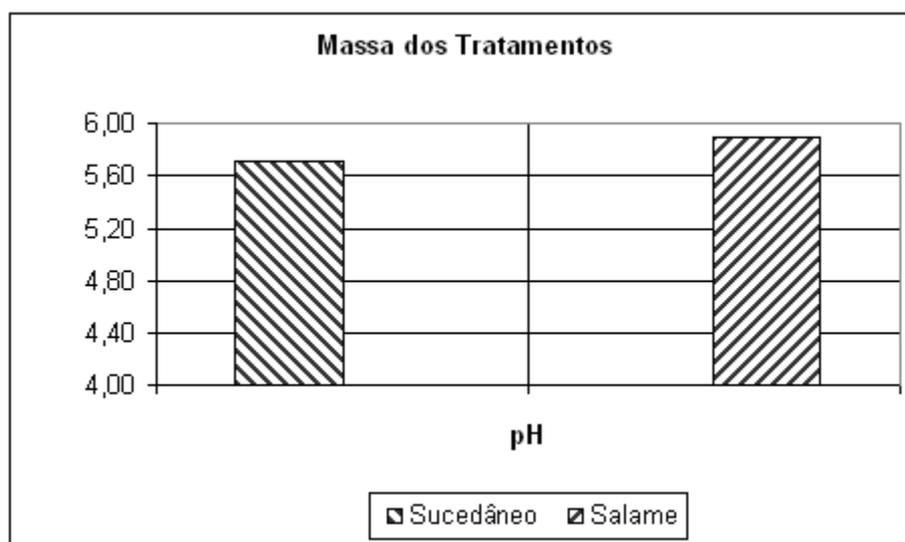
Valores médios (n=3; duas determinações) não apresentaram diferença  $p < 0,05$

Figura 8 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias aeróbias mesófilos (AM) e *Staphylococcus* coagulase negativa (*Staphy.*) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame cozido no início da fabricação

### 5.1.3 Determinação de pH e atividade de água (Aa)

As matérias-primas e os ingredientes necessários ao processamento constituem o principal ônus do fabricante. Assim, um rígido controle de qualidade é exigido, ademais dos aspetos microbiológicos, provas físicas e químicas são requeridas antes de aceitar estas matérias que irão ser processadas (HAYES, 1993).

O pH apresentou valores médios de 5,71 para o salame, sendo que o valor de pH alcançado pelo salame cozido foi de 5,9. No início da fabricação o ponto de partida foi à mesma massa cárnea, respectivamente, para o salame e o sucedâneo de salame, não havendo diferenças.



Valores médios (n=2; duas determinações) não apresentaram diferença  $p < 0,05$

Figura 9 – Valores de pH para os tratamentos do salame tipo Italiano e para o salame cozido no início da fabricação

A atividade de água apresentou valores médios próximos a 0,96 para ambas as massas, considerando as porcentagens de carne (*in natura*) usadas na formulação dos produtos.

Os valores de pH e Aa mostraram-se propícios para o desenvolvimento dos microrganismos presentes na massa dos produtos. O protocolo de fabricação do salame cozido inclui: temperatura, adição de ácidos orgânicos, aditivos e resfriamento obtendo produtos com desejável segurança microbiológica como será visto adiante.

Os níveis de Aa e o baixo pH que predominam nos produtos cárneos fermentados junto com a presença de aminoácidos estimulam a formação de aminas (ORDOÑEZ, 1999).

## 5.2 Aminas biogênicas no Salame Cozido

A seleção de matérias-primas para a fabricação de embutidos, mostra ser um importante ponto crítico de controle com relação à formação de altos níveis de ABs no produto acabado (MAIJALA, 1995b).

As amostras do salame cozido analisadas para os três tratamentos obtiveram níveis semelhantes, tanto de histamina como de tiramina, quando comparados com as concentrações encontradas no início da fabricação (massa do produto). O processo tecnológico para obtenção de salame cozido não envolve a formação de aminas. Deste modo, as concentrações encontradas no produto acabado sustentam à sua origem nos ingredientes usados como matérias-primas. A afirmação onde, as concentrações totais de aminas no salame cozido acabado estão ligadas e são dependentes das matérias-primas utilizadas na fabricação do embutido cárneo, contribui com a idéia da variação da temperatura durante o transporte e/ou conservação.

As ABs podem ser encontradas em produtos cárneos como conseqüência da atividade microbiológica relacionada aos processos fermentativos envolvidos na fabricação dos embutidos. Mas, existe a possibilidade que se encontrem presentes em matérias-primas de baixa qualidade, resultado da contaminação microbiana (VIDAL-CAROU, 1990b). Níveis altos encontrados no presunto cozido podem estar relacionados com o uso de carne suína de baixa qualidade higiênica desde que, o processo de fabricação não envolve a formação de aminas (HERNÁNDEZ-JOVER, 1996a). A fabricação de mortadela envolve, uso de pequena quantia de carne, aditivos e cocção; condições que impedem o desenvolvimento da flora residente e conseqüentemente, formação de aminas (HERNÁNDEZ-JOVER, 1997). Muito embora microrganismos comumente associados com a formação de aminas fossem encontrados nas matérias-primas (HERNÁNDEZ-JOVER, 1996b). Desta forma, quando procedimentos corretos de fabricação são aplicados adequadamente, às únicas ABs que poderiam ser encontradas nos produtos cárneos cozidos procedem das matérias-primas utilizadas (HERNÁNDEZ-JOVER, 1996b).

O tratamento térmico adotado na fabricação do salame cozido não parece ter afetado as concentrações finais de aminas no produto acabado. Assim, os níveis um tanto menores encontrados são atribuídos à diluição junto aos demais ingredientes durante o processamento. A histamina é termoestável, resiste ao processo de

cozido, assado e esterilização. Já a tiramina também é termoestável (FEHLHABER; JANETSHKE, 1995). A fabricação de atum enlatado envolve os processos de cozimento e esterilização, os quais não interferem nos níveis finais de aminas, sendo estas oriundas das matérias-primas *in natura* (VECIANA-NOGUÉS, 1997b). Na fabricação de queijo, (EL-SAYED, 1996) o tratamento térmico não interferiu nas concentrações finais de aminas, tendo como origem a matéria-prima utilizada. Os valores obtidos para histamina e tiramina nas amostras do salame cozido analisadas podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Níveis de aminas nos tratamentos do salame cozido

Aminas	Controle	Ácido Lático	Ácido Cítrico
Histamina (mg·kg <sup>-1</sup> )	48,06 <sup>a</sup> (10,41)	55,37 <sup>a</sup> (2,34)	49,16 <sup>a</sup> (4,59)
Tiramina (mg·kg <sup>-1</sup> )	11,00 <sup>a</sup> (1,59)	11,06 <sup>a</sup> (1,07)	11,35 <sup>a</sup> (0,63)

<sup>a</sup> Média e desvio padrão (n=3; duas determinações) das amostras analisadas

Estas concentrações estão dentro dos níveis considerados seguros para a saúde (TEN BRINK, 1990). Porém em embutidos cozidos, valores próximos a 50 mg·kg<sup>-1</sup> sugerem de certo modo o uso de matérias-primas com baixa qualidade higiênica (HERNÁNDEZ-JOVER, 1997).

Hernández-Hierro (1999) sugere a difusão na salmoura de parte das aminas e outras frações nitrogenadas durante o processamento. Níveis menores poderiam decorrer da diluição produzida quando incorporados outros componentes na salmoura (HERNÁNDEZ-JOVER, 1996a; 1996b).

Em 1977, Mietz; Karmas, propuseram a presença de aminas como parâmetro de avaliação para produtos marinhos processados e *in natura*. Para Vinci; Antonelli (2002), a determinação de aminas é apropriada para avaliar o deterioro incipiente e as concentrações poderiam ser relacionadas com o frescor da carne. O significado da pesquisa de aminas (*v.g.* a tiramina), considerando a higiene do alimento, está na predição do risco de crises hipertensivas em pacientes sob tratamento com fármacos inibidores da monoaminoxidase (YANO, 1995).

O teste químico para avaliar o grau de frescor da carne tem sido de longo interesse, podendo eliminar a desvantagem de métodos rotineiros como as

contagem do número de bactérias ou o jurado sensorial (SLEMR; BEYERMANN, 1985). No entanto a análise química mostra escasso valor quando dirigido a determinar o grau de frescor ou o grau de alteração da carne. A analítica falha na tentativa de prever a possível capacidade de conservação da carne (PRÄNDL, 1994).

Os métodos químicos supõem a formação de algum ou alguns compostos pelo metabolismo da flora deteriorante. Alterações em carne (figorificada) acompanham a produção de compostos de odor desagradável (aminas, amoníaco, indol e H<sub>2</sub>S) o inconveniente está em que não todos os microrganismos são igualmente capazes de produzir tais compostos. Modificações significativas nas concentrações de aminas em carne não se apresentam antes que as contagens bacterianas em placa (PCA) não ultrapassem 4·10<sup>7</sup> UFC·g<sup>-1</sup> (JAY, 1994).

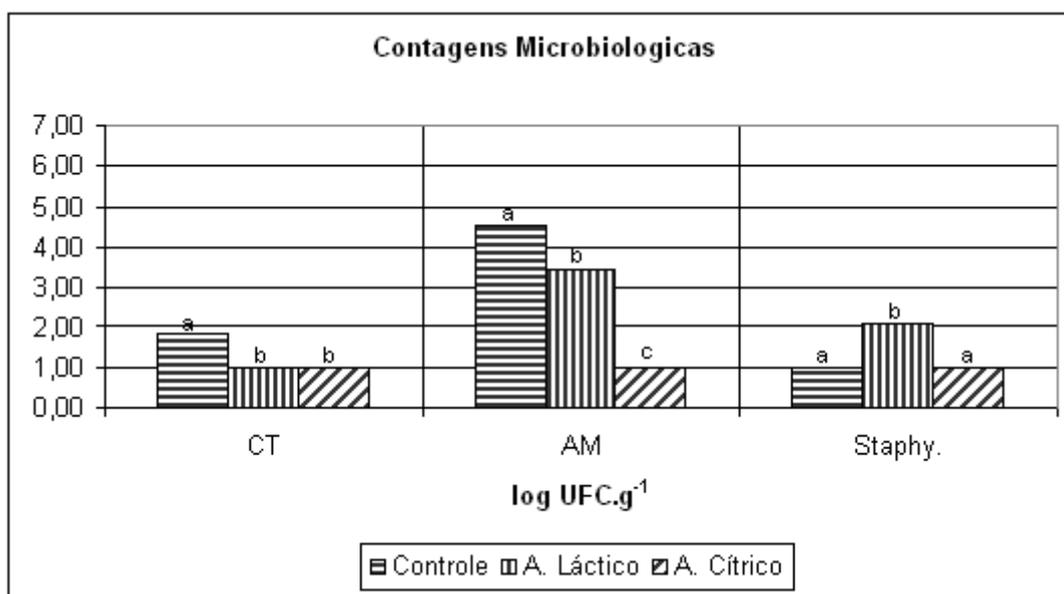
### 5.2.1 Características microbiológicas

Dentro da flora microbiana presente em carne em condições de consumo considera-se, os microrganismos do alimento ou os contaminantes, obtidos durante as etapas de manipulação, embalagem e armazenamento (JAY, 1994).

A taxa presente é um parâmetro para classificar a qualidade da carne; assim, microrganismos toleráveis em carne fresca, embutidos curados e outros são inclusive, benéficos pelas mesmas propriedades que os consideram indesejáveis em produtos cozidos, a presença destes tem que ser analisada em relação à procedência do produto (PRÄNDL, 1994).

Todos os valores obtidos na enumeração de microrganismos apresentaram redução nas contagens. O tratamento controle apresentou contagens de coliformes totais próximos a 10<sup>2</sup> UFC·g<sup>-1</sup>, os aeróbios mesófilos alcançaram valores próximos a 10<sup>5</sup> UFC·g<sup>-1</sup> e as contagens para os *Staphylococcus* spp. ficaram em 10<sup>1</sup> UFC·g<sup>-1</sup>. O controle não sofreu a adição de ácidos, o que demonstra que o tratamento térmico mostrou ser eficiente para reduzir a flora microbiana existente. O tratamento adicionado com ácido láctico apresentou contagens microbiológicas com valores de 10<sup>1</sup> UFC·g<sup>-1</sup> para os coliformes totais, 10<sup>3</sup> UFC·g<sup>-1</sup> para os aeróbios mesófilos e 10<sup>2</sup> UFC·g<sup>-1</sup> para os gêneros *Staphylococcus* spp.

O tratamento adicionado com ácido cítrico apresentou o melhor desempenho microbiológico. Alcançando contagens de  $10^1$  UFC.g<sup>-1</sup>, para todos os gêneros de microrganismos pesquisados. A análise de variância usando o nível de significância ( $p < 0,05$ ) apresentou diferenças entre os tratamentos avaliados (Figura 10).



Valores médios (n=3; duas determinações) sem letra em comum diferem  $p < 0,05$

Figura 10 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias aeróbias mesófilas (AM) e *Staphylococcus* coagulase negativa (*Staphy.*) para os tratamentos do salame cozido

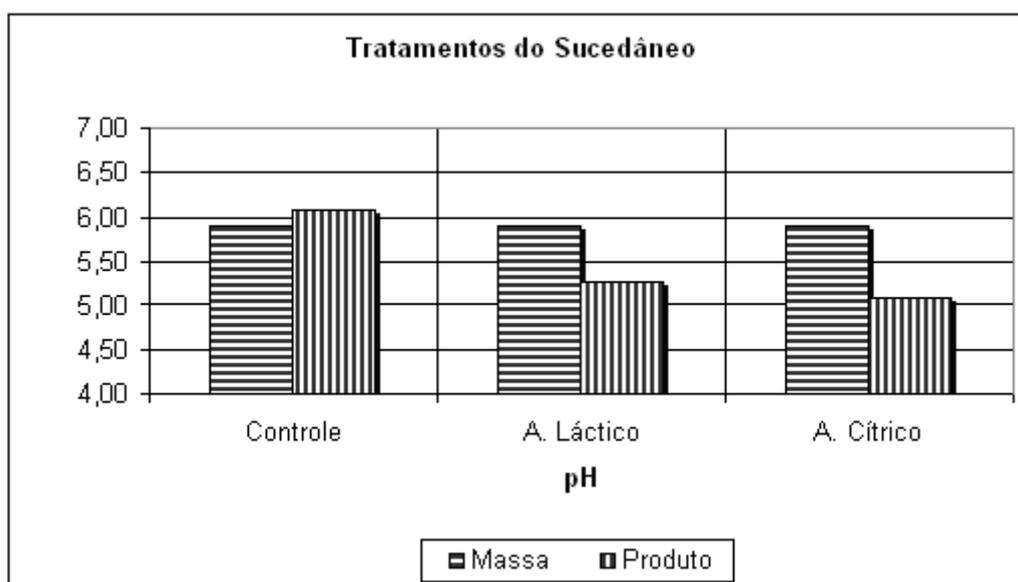
O processo térmico liberou gradativamente os ácidos orgânicos, evitando desta forma a desnaturação protéica refletida na textura e na liberação de água (TERRA, 2003). Os valores de pH contribuíram com a segurança microbiológica dos produtos nos tratamentos adicionados de ácidos orgânicos.

As contagens para coliformes fecais, assim como, a prova da coagulase usando plasma de coelho em todas as amostras pesquisadas apresentaram resultados negativos. Os resultados apresentaram conformidade com a legislação em vigor (BRASIL, 2001).

Os valores revelaram a eficiência do tratamento térmico unido com o efeito aditivo dos ácidos orgânicos e o resfriamento rápido usado na obtenção dos produtos, possuidores de elevada segurança microbiológica.

### 5.2.2 Características físico-químicas

Os valores de pH para os diferentes tratamentos apresentaram valores de 6,09 para o controle; 5,28 para o tratamento com adição de ácido láctico e o salame cozido com adição de ácido cítrico obteve 5,10 (Figura 11).



Valores médios (n=2; duas determinações) não apresentaram diferenças  $p < 0,05$

Figura 11 – Valores de pH para os tratamentos do salame cozido durante o período de fabricação

A diferença entre os valores de pH para os tratamentos adicionados de ácidos orgânicos está nos valores de  $pK_a$  dos ácidos usados promovendo a dissociação de prótons no meio (TERRA, 2003).

Pearson; Gillett (1999), sugerem valores de pH entre 4,6 e 5,2; o salame cozido analisado pode ser classificado como um produto cárneo semi-seco também conhecido como "*Summer sausage*". Os valores de pH obtidos nos produtos estão dentro dos limites propostos para salames cozidos.

O leve aumento no pH do salame cozido controle pode ser atribuído a concentrações iniciais de amins encontradas na massa do produto. Este valor para pH encontra-se entre os níveis aceitáveis para salames (ORDOÑEZ1999).

A continuação à tabela 2, reúne os resultados obtidos nas análises físico-químicas do salame cozido acabado.

Tabela 2 – Características físico-químicas do salame cozido

	Controle	Ácido Láctico	Ácido Cítrico
<b>Aa</b>	0,92	0,90	0,89
<b>Gordura (%)</b>	3,7	3,5	3,1
<b>Proteína (%)</b>	42,7	41,4	37,4
<b>Cinzas (%)</b>	6,1	5,9	5,9

Média (n=3; duas determinações) das amostras analisadas

O salame cozido controle apresentou o maior valor para Aa (0,92) que apesar do cozimento permaneceu com maior atividade de água que os outros dois tratamentos; 0,90 e 0,89 para com tratamento adicionado de ácido láctico e ácido cítrico respectivamente. Estes valores podem ser atribuídos à liberação de água quando as proteínas miofibrilares atingem o seu ponto isoelétrico.

Pearson; Gillet (1999), citam padrões para atividade de água inferior a 0,91; o valor protéico mínimo de 17,5%, o valor máximo de gordura 25,6%, cinzas 4,5% e umidade máxima de 51%.

### 5.3 Aminas biogênicas no salame tipo Italiano

As aminas biogênicas são componentes naturais de muitos alimentos e podem ocorrer em grandes concentrações nos produtos fermentados obtidos de matérias-primas com alto teor protéico (MARTUSCELLI, 2000). Baixas concentrações nos alimentos geralmente não põem em risco a saúde, porém pessoas susceptíveis, com deficiência ou atividade enzimática reduzida (AO), devido à ingestão de drogas inibitórias, álcool ou doenças gastrointestinais poderão ser afetadas (LEUSCHENER; HAMMES, 1998).

A partir da metade da segunda semana a consistência dos embutidos apresentou-se firme. A maturação dos salames terminou na terceira semana.

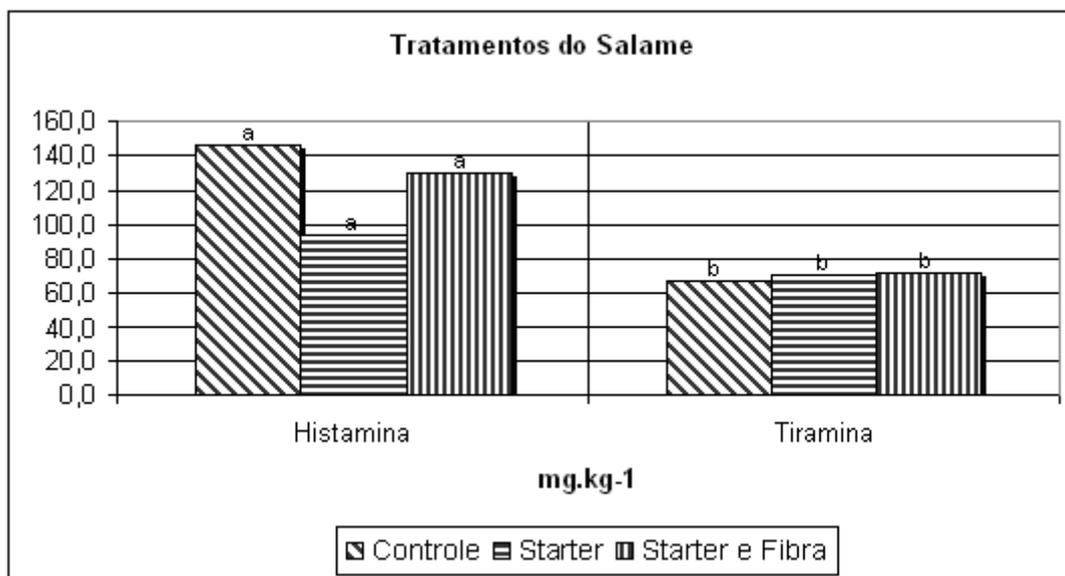
As amostras de salame analisadas para os três tratamentos apresentaram altos níveis de aminas. As concentrações de histamina (entre 93 e 145 mg·kg<sup>-1</sup>) foram maiores que as de tiramina (entre 67 e 71 mg·kg<sup>-1</sup>) o que pode ser atribuído aos valores de pH entre 4,6 e 4,9 (fim da primeira semana) que mostrou ser um fator importante ao influenciar o metabolismo dos microrganismos, originando enzimas (descarboxilases) que determinaram os níveis de aminas nos produtos acabados. Estes microrganismos provavelmente pertençam a gêneros de bactérias ácido lácticas e enterobactérias presentes já na massa do produto (flora nativa). Considerando que, o *starter* comercial composto por linhagens de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosum* mostrou-se negativo quanto à produção de aminas (ANSORENA, 2002).

Segundo Masson (1996), a medida de pH mostra uma indicação satisfatória na produção de aminas pelas LABs. Esta afirmação baseia-se na teoria que a formação de aminas é um mecanismo protetor das bactérias contra o ambiente ácido (ARENA; MANCA, 2001).

Com relação a alimentos fermentados, lactobacilos em particular, linhagens de *L. curvatus*, *L. brevis*, e *L. buchneri* (BOVER-CID, 2001d), enterococos e carnobactérias (MONTEL, 1996; BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999c), apresentam um papel importante na produção da tiramina. A histamina é produzida principalmente por *Enterobacter* spp. (MONTEL, 1996). Bactérias isoladas em salames (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus xylosum*, *Lactobacillus curvatus* e *Hafnia alvei*), apresentaram capacidade para descarboxilar histidina (SILLA, 1998). Já Roig-Sagés (1997), aponta as *Enterobacteriaceae* como produtoras de histamina.

A variação encontrada entre os tratamentos pesquisados referentes aos níveis de aminas foi atribuída ao desenvolvimento dos microrganismos junto ao efeito sinérgico associado com outros fatores, (pH, temperatura, umidade, Aa, uso de aditivos, adição de glicose e sacarose, quantidades iniciais de aminas e condições higiênicas), modificando a flora inicial e favorecendo as reações enzimáticas dos microrganismos responsáveis pelas características do produto.

Concentrações de aminas apresentaram grande variação entre tipos de diferentes embutidos bem como, entre as amostras do mesmo tipo de produto (VIDAL-CAROU, 1990b; PARENTE, 2001; BOVER-CID, 1999b). A análise estatística usando ( $p < 0,05$ ) não identificou diferenças entre os tratamentos (Figura 12).



Valores médios (n=3; duas determinações) com letra em comum não diferem p < 0,05

Figura 12 – Valores médios para histamina e tiramina para os diferentes tratamentos do salame tipo Italiano

O armazenamento incorreto das matérias-primas bem como, uma fermentação descontrolada pode induzir a proliferação de *Enterobacteriaceae*, liberando enzimas responsáveis pela formação de aminas (SUZZI; GARDINI, 2003).

A adaptação dos microrganismos induz a proteção contra o ambiente ácido, produzindo aminas (ARENA; MANCA, 2001), onde o pH é identificado como fator chave influenciando a descarboxilação de aminoácidos (GARDINI, 2002; SUZZI; GARDINI, 2003), bem como, a umidade, Aa (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2003) e a temperatura, influenciando no crescimento dos microrganismos (GARDINI, 2002). Assim, a formação de aminas resulta de um complexo equilíbrio entre a composição do meio e a atividade enzimática dos microrganismos (GARDINI, 2002). Esta formação depende mais da cepa do que da espécie (BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999c; NOVELLA-RODRÍGUEZ, 2002).

A capacidade de formação das descarboxilases não é nenhuma característica específica, esta varia muito entre cepas de uma mesma espécie ou inclusive, pode estar ausente (FEHLHABER; JANETSHKE, 1995). Desta forma, resulta recomendável a seleção satisfatória de culturas *starter* (BUNCIC, 1993; ERKKILÄ, 2001), competitivas e sem capacidade de produção de aminas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2003) para serem usados na produção de embutidos fermentados

(BUCKENHÜSKES, 1993). Considerado um fator importante para prevenir a formação de aminas (BOVER-CID, 1999b). Na tabela 3 observa-se a variação dos níveis de aminas obtidos nas amostras pesquisadas.

Tabela 3 – Níveis de aminas nos tratamentos de salame tipo Italiano

Aminas	Controle	<i>Starter</i>	<i>Starter e Fibra</i>
Histamina (mg·kg <sup>-1</sup> )	145,61 <sup>a</sup> (41,59)	93,38 <sup>a</sup> (25,19)	130,10 <sup>a</sup> (38,77)
Tiramina (mg·kg <sup>-1</sup> )	67,05 <sup>a</sup> (33,13)	70,28 <sup>a</sup> (38,86)	71,87 <sup>a</sup> (36,86)

<sup>a</sup> Média e desvio padrão (n=3; duas determinações) das amostras analisadas

Os níveis encontrados estiveram algo acima dos limiares propostos na literatura como não prejudiciais para a saúde humana (MAIJALA; EEROLA, 1993; TEN BRINK, 1990). Normalmente, o consumo de salame ocorre em baixas quantidades (porções, fatias, picadinhos) como petisco ou como ingrediente em vários pratos, dificultando assim, ultrapassar os limiares que poderiam representar perigo à saúde, provocando reações adversas decorrentes do consumo do produto cárneo. Contudo, considerando a variação encontrada nas amostras, um consumo equivalente a 500g do produto poderia ocasionar sintomas de intoxicação.

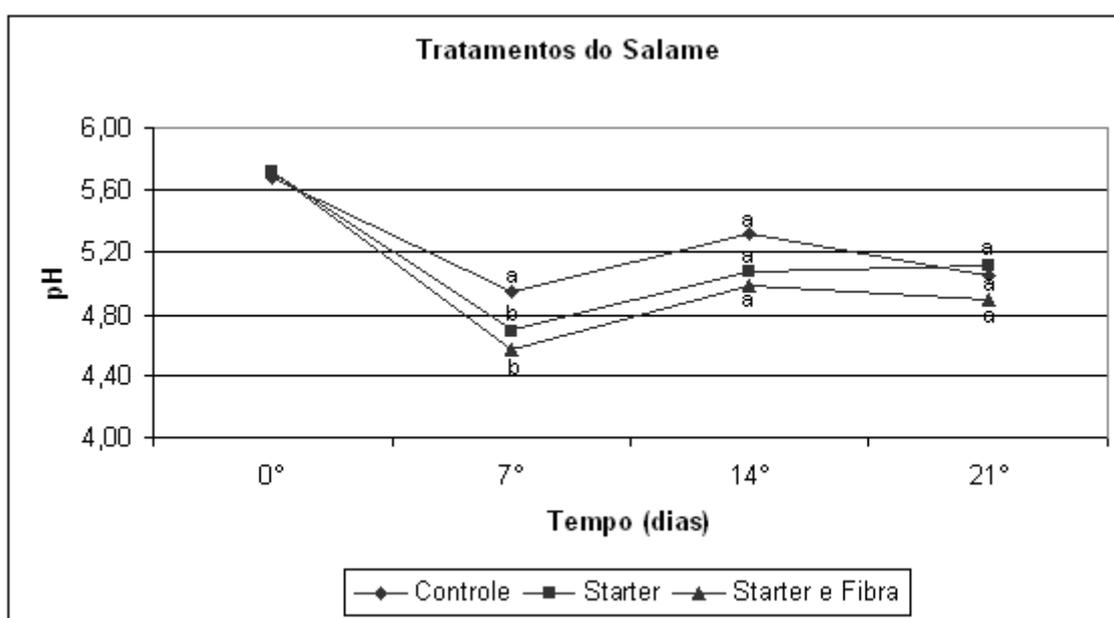
### 5.3.1 Análises físico-químicas

Ao comparar embutidos sem adição de glucona delta lactona (GDL) ou glicose Molly; Greenen (1996), observaram baixas concentrações de tiramina com valores de pH entre 4,7 e 4,8. Discreto incremento de histamina, quando adicionado GDL e quando adicionado glicose (pH 4,9) ocorreu aumento da histamina.

O uso de açúcares influencia a dinâmica populacional e a produção de aminas (SUZZI; GARDINI, 2003) desde que, favoreça o crescimento da cultura *starter* (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2003), que em fermentações espontâneas pouco afeta o pH, mas, afeta a produção de ABs (BOVER-CID, 2001a).

Os valores de pH apresentaram queda acentuada na primeira semana obtendo valores de 4,95 para o controle, 4,69 para o *starter* (T<sub>2</sub>) e 4,57 para o *starter*

e fibra (T<sub>3</sub>). As diferenças encontradas são atribuídas à adição da cultura *starter*, contudo a multiplicação da flora residente (T<sub>1</sub>) revelou suas propriedades acidificantes, beneficiadas provavelmente pela presença de açúcares. A omissão de açúcares na formulação não é recomendada, pois este procedimento levaria ao aumento nos conteúdos de aminas (BOVER-CID, 2001a). Este pH (fim da fermentação) aparece como um fator importante que determinou os valores totais de aminas no produto. As diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ) podem ser observadas na figura 13.



Valores médios (n=3; duas determinações) sem letras em comum diferem  $p < 0,05$

Figura 13 – Valores de pH para os tratamentos do salame tipo Italiano durante o período de fabricação

A queda do pH deve ocorrer até o sétimo dia de forma gradual para valores em torno de 5,0 devido à liberação de ácido láctico, formado a partir das hexoses, pelas bactérias ácido lácticas (BUCKENHÜSKES, 1993). Ao substituir GDL por glicose ocorrem mudanças tanto nos níveis de ABs como nos microrganismos, usando *L. sake*, ocorre elevada produção de tiramina, atribuída à presença de *Enterococcus* spp. (MOLLY, 1996). A presença de tiramina está associada à fermentação cárnea e correlacionada com decréscimo do pH. Em fermentações

espontâneas, os *Staphylococcus* proteolíticos usados como *starters* atenuaram a produção de tiramina (BOVER-CID, 1999a).

No experimento o papel da fibra não foi bem definido, podendo atribuir-se a concentração usada (0,1%). Contudo, a retenção de água por parte da fibra concentrou as quantidades de prótons hidrogênio contribuindo com o valor de pH (TERRA, 2003). A adição de água quando da diluição da fibra no T<sub>3</sub> no início da fabricação não teve efeito sobre a atividade de água. Os grupos hidroxila pertencentes à fibra, quando ligadas a moléculas de água, tornam-lhas indisponíveis para serem usadas nas reações bioquímicas (CLARIANT, 2001).

A liberação de água tem lugar associada com um sistema de saída desta água do embutido e a diferença da pressão de vapor entre o ambiente e a matriz do produto, a água atravessa uma rede de finos capilares formados entre as proteínas da carne e a gordura, onde a fibra (VITACEL<sup>®</sup>) parece ter um papel importante, bem como, não interfere no metabolismo microbiano (SIEG; GLATTHNER, 2005).

Os valores encontrados demonstraram que a atividade de água ficou abaixo de 0,88 o que indica prejuízo na textura do produto (TERRA, 1998). Uma maior liberação de água ocorre quando o ponto isoelétrico das proteínas é atingido aumentando a desidratação e a firmeza do produto. As análises físico-químicas estão resumidas na tabela 4. Os resultados apresentaram conformidade com o regulamento técnico em vigor (BRASIL, 2000).

Tabela 4 – Características físico-químicas do salame tipo Italiano

	<b>Controle</b>	<b>Starter</b>	<b>Starter e Fibra</b>
<b>Aa</b>	0,76	0,80	0,82
<b>Gordura (%)</b>	17,50	19,09	17,63
<b>Proteína (%)</b>	47,70	45,20	44,60
<b>Cinzas (%)</b>	7,47	7,44	7,46

Média (n=3; duas determinações) das amostras analisadas

A fase crucial da elaboração do salame é a fermentação, onde ocorrem reações químicas e bioquímicas que modificam a flora inicial, altera a cor e inicia a formação das características do produto (TERRA, 2003). Mudanças ambientais

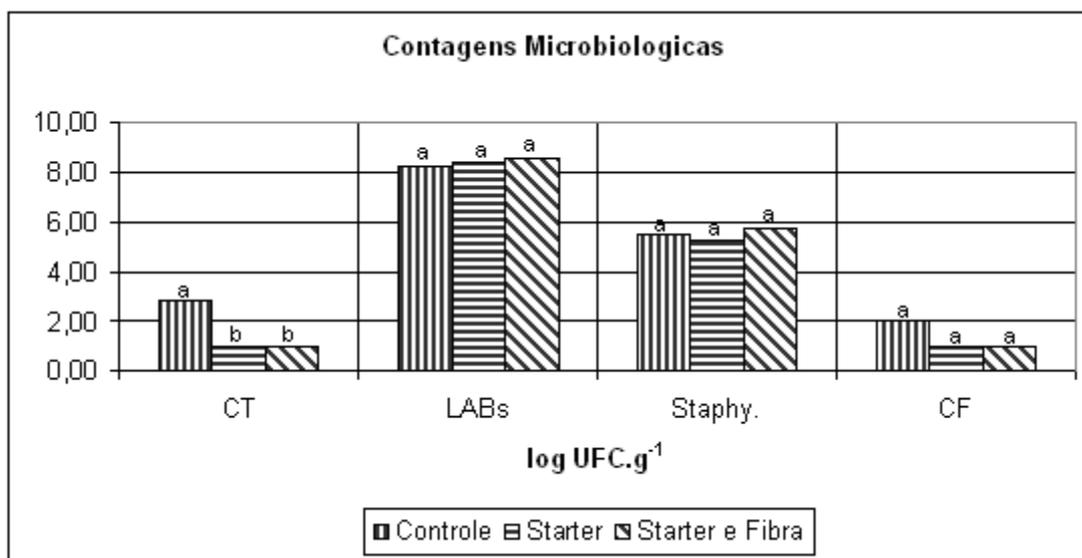
como pH e Aa, podem afetar o metabolismo bacteriano dando como resultado produtos finais diferentes sem diferenças significativas das contagens bacterianas (DEMEYER, 1986). Com a queda do pH ocorre num primeiro momento a insolubilização das proteínas seguida de hidrólise. Esta hidrólise é fundamentalmente de natureza enzimática, com a participação das enzimas do *starter* e da própria carne (TERRA, 2001).

As enzimas endógenas da carne são as principais responsáveis pela proteólise miofibrilar (HIERRO, 1999). A catepsina D, ativada pela queda do pH, é responsável pela quase total quebra da miosina e actina, sendo que 70% do metabolismo adicional dos dipeptídeos e aminoácidos são realizados por enzimas bacterianas (DEMEYER, 1995). A proteólise enzimática varia em extensão, com intenso efeito sobre o *flavor* e a textura do produto final entre espécies de *Lactobacillus* freqüentemente presentes em fermentações cárneas (PEREIRA, 2001). Do sétimo dia em diante os valores de pH aumentam devido a reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos, que liberaram amônia ao meio, alcalinizando-o. O pH pode ser novamente reduzido pela lipólise que libera ácidos graxos livres no meio, ficando ao final entre 5,2 e 5,4 em nosso país (ORDOÑEZ, 1999).

### 5.3.2 Características microbiológicas

Na primeira semana, os coliformes totais apresentaram valores próximos a  $10^3$  UFC·g<sup>-1</sup> para o controle e  $10^1$  UFC·g<sup>-1</sup> para os tratamentos dois tratamentos. A diminuição dos coliformes foi devido à presença de bactérias lácticas que acidificaram o meio diminuindo o valor do pH, fator que inibiu o crescimento dos coliformes, para os três tratamentos pesquisados. As maiores contagens obtidas no controle mostram que também a flora residente foi capaz de acidificar o meio diminuindo o número de coliformes, contudo o *starter* apresentou melhores resultados. O maior número de bactérias ácido lácticas ( $10^8$  UFC·g<sup>-1</sup>) junto a valores próximos de  $10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> para os *Staphylococcus* nos tratamentos auxiliou na queda o pH e ao desenvolvimento das características organolépticas do produto o que motivo sua aceitação no teste sensorial (Tabela 5). Cabe lembrar que o tratamento controle não foi submetido à análise sensorial, mas apresentou valores semelhantes aos descritos para os outros dois tratamentos sendo estes atribuídos à contaminação microbiana.

A prova bioquímica da coagulase usando plasma de coelho realizado nas amostras mostrou-se sempre negativa. As contagens de coliformes fecais apresentaram maiores valores para o controle ( $10^1$  UFC.g<sup>-2</sup>), alcançando valores de  $10^1$  UFC.g<sup>-1</sup> para os tratamentos *starter* e *starter* e fibra sendo sua diminuição atribuída ao pH. A representação gráfica dos resultados encontra-se na Figura 14.



Valores médios (n=3; duas determinações) sem letra em comum diferem p < 0,05

Figura 14 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), *Staphylococcus* coagulase negativa (*Staphy.*) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano para a primeira semana de fabricação

As bactérias ácido-lácticas ao utilizar carboidratos existentes na formulação cárnea, determinam a formação de ácido láctico, produto metabólico importante, gerado na fermentação e responsável pela segurança e qualidade dos produtos.

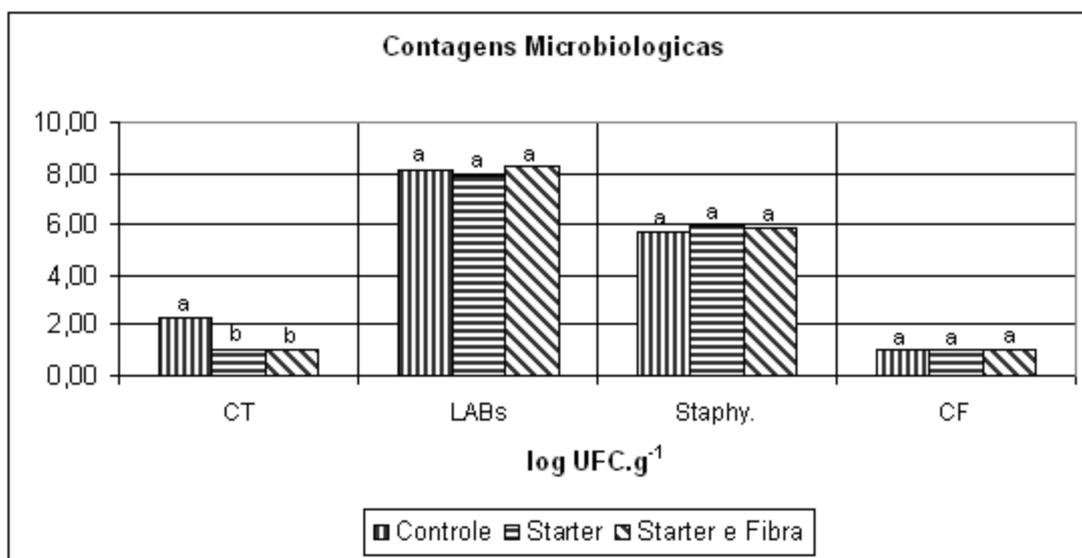
A queda do pH irá refletir-se no efeito protetor contra os microrganismos indesejáveis, bem como na textura, desidratação e coloração do embutido fermentado (TERRA, 1998).

No salame Maijala; Eerola (1993), isolaram LABs agrupados em três complexos: o primeiro composto por *L. pentosus* e *L. plantarum* não produziu histamina nem tiramina. O segundo identificou durante a fermentação: *L. sake / curvatus*; *L. farciminis* e *L. casei* subsp. *Tolerans*. E formando o terceiro complexo

junto com altos níveis de tiramina e histamina microrganismos contaminantes relacionados com *L. casei* subsp. *tolerans*.

As *Enterobacteriaceae* são contaminantes comuns da carne, sendo encontrados em substratos fermentados e seus números dependem da carga inicial da matéria-prima, tipo de embutido e fase de maturação (HAMMES; KNAUF, 1994). Resulta evidente que a contaminação por LABs desempenhe um papel importante na formação de aminas durante a fermentação de salames (MAIJALA; EEROLA, 1993).

No décimo quarto dia, as contagens de coliformes totais continuaram diminuindo com valores de  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> para o controle e  $10^1$  UFC.g<sup>-1</sup> para os outros dois s tratamentos. A diferença foi atribuída aos valores de pH por parte da flora residente do tratamento controle que resultou em uma diminuição menos intensa dos coliformes. A presença da flora natural na industrialização de embutidos fermentados dificulta o controle da eficiência do inoculo adicionado (MOLLY, 1996). Diferentes quantidades e tipos de LABs desempenham um papel importante na formação de aminas durante a fermentação (MAIJALA; EEROLA, 1993).



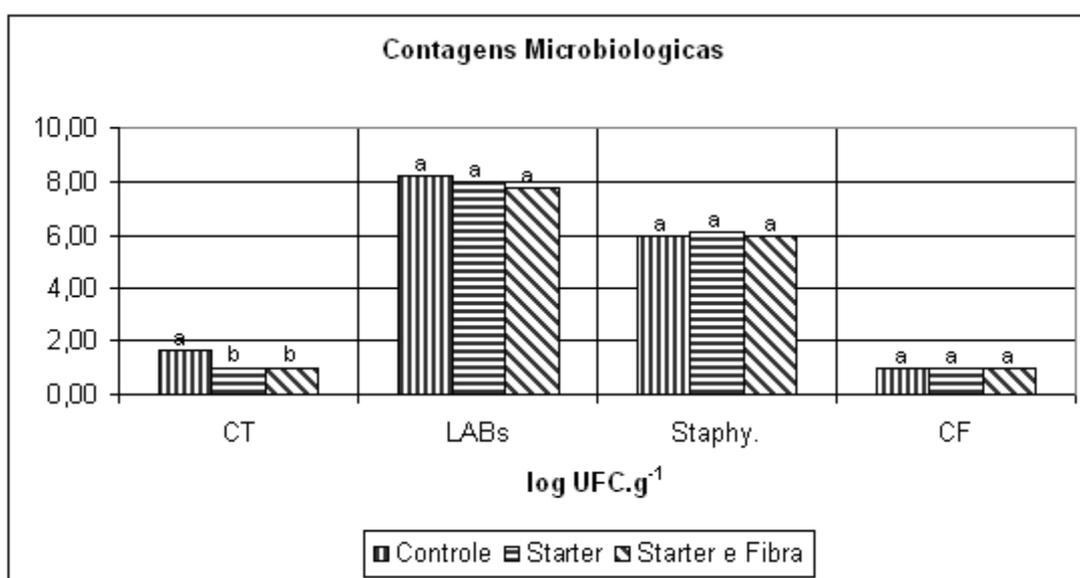
Valores médios (n=3; duas determinações) sem letra em comum diferem  $p < 0,05$

Figura 15 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), *Staphylococcus* coagulase negativa (*Staphy.*) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano para a segunda semana de fabricação

As bactérias ácidos lácticas permaneceram altas ( $10^8$  UFC- $g^{-1}$ ). Os *Staphylococcus* spp. apresentaram valores próximos a  $10^6$  UFC- $g^{-1}$  para todos os tratamentos pesquisados. Já as contagens de coliformes fecais alcançaram valores de  $10^1$  UFC- $g^{-1}$  nos três tratamentos. Novamente a pesquisa por *Staphylococcus* coagulase positivo resultou negativa. Deve-se considerar que os produtos alimentícios são sistemas complexos com um grande número de fatores influenciando o crescimento e a atividade microbiana (BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999c).

Os ensaios de GIARDINI (2002), usando *L. sake* e *L. xilosus* e suplementação de histamina mostraram influencia sobre a atividade enzimática. Leuschner; Hammes (1998) referem um rápido decréscimo de tiramina usando *M. varians* e *L. sake* e suplementação com tiramina. Desta forma, o conteúdo final depende do equilíbrio entre a produção e degradação de aminas (GARDINI, 2002).

Combinações de culturas *starter*, mostraram-se eficientes na redução de ABs durante fermentação e armazenamento de salame (BOVER-CID, 2001b). A análise estatística do produto acabado não constatou diferenças significativas com exceção dos coliformes totais (Figura 16).



Valores médios (n=3; duas determinações) sem letra em comum diferem p < 0,05

Figura 16 – Contagem de Microrganismos para coliformes totais (CT), bactérias lácticas (LABs), *Staphylococcus* coagulase negativa (*Staphy.*) e coliformes fecais (CF) para os tratamentos do salame tipo Italiano para o produto acabado

O produto acabado apresentou contagens microbiológicas semelhantes aos do décimo quarto dia. Os valores máximos para os coliformes totais foram apresentados pelo tratamento controle (próximo a  $10^2$  UFC·g<sup>-1</sup>) seguido pelos outros dois tratamentos adicionados de *starter* ( $10^1$  UFC·g<sup>-1</sup>).

As contagens para bactérias ácido lácticas apresentaram valores próximos a  $10^8$  UFC·g<sup>-1</sup> para os três tratamentos, bem como, os *Staphylococcus* spp. com valores próximos a  $10^6$  UFC·g<sup>-1</sup>, sendo que os coliformes fecais obtiveram contagens de  $10^1$  UFC·g<sup>-1</sup>. O teste usando plasma de coelho sempre foi negativo. Os resultados apresentaram conformidade com a legislação em vigor (BRASIL, 2001).

#### 5.4 Características sensoriais

As análises sensoriais para os dois experimentos foram realizadas por um painel de degustação não treinado, composto por professores, funcionários e alunos do departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, tanto o salame cozido como o salame tradicional foram submetidos à prova junto a um salame tipo Italiano adquirido no comércio local. A avaliação realizada para ambos os produtos incluiu características de aroma, cor, sabor e textura, seguindo o modelo de ficha de avaliação (Anexo A).

As notas atribuídas, próximas a zero indicaram a reprovação de produto (desgostei muitíssimo), notas próximas a cinco apontaram a aceitação do produto (gostei) e as notas próximas a dez indicaram a satisfação do avaliador quanto ao produto. A tabela 5 contém os escores alcançados para os salames cozidos avaliados.

Tabela 5 – Características sensórias dos salames cozidos

	Aroma	Cor	Sabor	Textura
Salame comercial	4,9	6,2	6,7	6,8
Ac. Láctico	4,3	4,5	5,9	4,9
Ac. Cítrico	4,3	4,2	5,5	4,6

Valores médios (n=3) das amostras analisadas

A aparência geral proporciona uma idéia do produto avaliado, unindo as características sensoriais: (aroma, cor, sabor e textura). As amostras submetidas ao painel de degustação produziram notas próximas a cinco, mostrando uma preferência pelo salame tradicional quando comparado com o salame cozido. As aminas encontradas não parecem ter influenciado estes resultados. Lovenberg (1974) aponta que aminas de cadeia curta podem contribuir com o odor e o *flavor* dos alimentos. A tabela 6 contém os escores alcançados para os salames fermentados avaliados.

Tabela 6 – Características sensórias dos salames fermentados

	Aroma	Cor	Sabor	Textura
<b>Salame comercial</b>	5,6	5,1	5,4	5,7
<i>Starter</i>	6,5	7,1	6,8	6,6
<b>Starter e Fibra</b>	5,6	6,3	5,2	6,4

Valores médios (n=3) das amostras analisadas

Os atributos sensoriais permaneceram na faixa superior a cinco, indicando a aceitação dos tratamentos do salame tipo Italiano (*starter* e *starter* e fibra) atribuído à cultura *starter* empregada (REIS; SOARES, 1998). A escolha da cultura adequada irá depender das características organolépticas desejadas no produto final (NASSU, 1999).

O salame cozido apresentou valores próximos a cinco indicando a aceitação do produto embora a preferência seja pelo salame tradicional. O consumidor provavelmente rejeite produtos com sabor mais azedo que o esperado nos produtos tradicionalmente maturados (BOVER-CID, 2001a).

Provavelmente, qualquer alimento sujeito a ação bacteriana poderá conter aminas sob condições normais. A informação referente à probabilidade de presença de aminas no alimento deveria ser comunicada aos consumidores, em especial quando se tratando de pacientes sob tratamento usando fármacos que inibem a ação das monoaminoxidase (VECIANA-NOGUÉS, 1997b). Este alerta poderia ser comunicado através do rotulo do produto, já que as características sensoriais parecem não ser afetadas de forma mais acentuada.

## 6 SUGESTÕES

O salame cozido, caracterizado sob as condições experimentais (físico-químicas, microbiológicas, sensoriais, teores de aminas) aparece como uma alternativa viável quando comparado ao tempo dispensado na fabricação tradicional do salame, podendo auxiliar no aumento da capacidade de produção da indústria e contribuir com a diversificação na oferta de embutidos, representando mais uma opção de escolha para o consumidor. Neste sentido sugere-se a adoção do termo Salame Sucedâneo como denominação para comercialização deste produto cárneo.

Sistemas de segurança alimentar são programas destinados com o controle sanitário, ajudando a produzir alimentos que não ponham em risco a saúde dos consumidores. Onde a determinação das aminas biogênicas poderá ser usada como subsídio durante a o processo de elaboração de planos APPCC nas indústrias de carnes.

A colonização da carne por microrganismos contaminantes realiza-se principalmente na superfície (JAY, 1994). Assim, um procedimento prático para diminuir o teor de aminas biogênicas é lavar o produto apenas retirado da embalagem. A lavagem remove quantias substanciais de aminas, por estas se localizarem principalmente na superfície (KANIOU, 2001).

## 7 CONCLUSÕES

O desenvolvimento dos microrganismos contaminantes pode ter originado os níveis iniciais de aminas encontrados já na massa dos produtos

A cultura *starter* usada não inibiu a formação de aminas nos salames fermentados nas condições estudadas

O uso de açúcares (glicose; sacarose) contribuiu para o processo fermentativo dos salames evitando maiores acúmulos dos níveis de aminas

A adição da fibra de trigo não interferiu no metabolismo dos microrganismos

A temperatura de cocção e os ácidos orgânicos não influenciaram nos níveis finais de aminas nos salames cozidos

A presença de aminas não interferiu nas características sensoriais dos embutidos cárneos

## 8 REFERÊNCIAS

ANZALDÚA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza. Acribia. 1994. 198p.

ANSORENA, D.; MONTEL, M. C.; ROKKA, M. Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. **Meat Science**. v. 61, p. 141-147, 2002.

ARAI, Y.; SATOH, N.; UCHIDA, N. Inhibition of rat brain monoamine oxidase-B by some monoamines reuptake inhibitors as antidepressants. **Biogenic Amines**. v. 17, n. 1, p. 25-30, 2002.

ARENA, M. E.; MANCA, M. C. de N. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. **J. Applied Microbiology**. v. 90, p. 158-162, 2001.

AYHAN, K.; KOLSARICI, N.; OZKAN, G. A. The effects of starter cultura on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. **Meat Science**. v. 53, p. 183-188, 1999.

BAILEY, S.; MARR, C.; ELLIOTT, J. Identification and quantification of amines in the equine caecum. **Research Veterinary Science**. v. 74, p. 113-118, 2003.

BALCHEM. **Product specifications**. New York, 2002. 2 p.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science Technol**. v. 6, p. 341-46, 1995.

BARDÓCZ, S.; *et alli*. Uptake, inter-organ distribution and metabolism of dietary putrescine in the rat. **J. Nutr. Biochem**. v. 9, p. 332-338, 1998.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. Zaragoza. Acribia. 1997. 1087p.

BENEDETTI M. S. Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. **B. S. Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 15, p. 75-84, 2001.

BILLS, D.; *et alli*. Potencial Precursors of *N*-Nitrosopyrrolidine in Bacon and Other Fried Foods. **J. Agric. Food Chem**. v. 21, n. 5, p. 876-877, 1973.

BOVER-CID, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. **Meat Science**. v. 57, p. 215-221, 2001a.

\_\_\_\_\_. Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. **Int. J. Food Microbiology**. v. 65, p. 113-123, 2001b.

\_\_\_\_\_. Effectiveness of *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. **J. Food Prot.** v. 64, n. 3, p. 367-373, 2001c.

\_\_\_\_\_. Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. **J. Food Prot.** v. 63, n. 11, p. 1544-1550, 2000a.

\_\_\_\_\_. Mixed starter cultures to control biogenic amine control production in dry fermented sausages. **J. Food Prot.** v. 63, n. 11, p. 1556-1562, 2000b.

\_\_\_\_\_. Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. On biogenic amine formation during ripening of dry fermented sausages. **Int. J. Food Microbiology**. v. 46, p. 95-104, 1999a.

BOVER-CID, S.; *et alli*. Amino acid-descarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. **Int. J. Food Microbiology**. v. 66, p. 185-189, 2001d.

\_\_\_\_\_. Reduction of biogenic amine formation using a negative acid-descarboxilase starter cultura for fermentation of fuet sausages. **J. Food Prot.** v. 63, n. 2, p. 237-243, 2000c.

\_\_\_\_\_. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. **Meat Science**. v. 51, p. 305 - 311, 1999b.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiology**. v. 53, p. 33-41. 1999c.

BOURGEIOS, C.; LARPENT, J. P. **Microbiología Alimentar**. vol. II. Zaragoza. Acribia. 1994. 366p.

BRASIL. Instrução Normativa n. 22 de 31 de julho de 2000. **Aprova Regulamento Técnico de identidade e Qualidade do Salame tipo Italiano**.

BRASIL. Resolução – RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**.

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 12, p. 253-272, 1993.

BUNCIC, S.; *et alli*. Effect of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. **Int. J. Food Microbiology**. v. 17, p. 303-309, 1993.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiology**. v. 50, p. 131-149, 1999.

CIRILO, M. P. G.; *et alli*. Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. **Food Chemistry**. v. 82, p. 397-402, 2003.

CLARIANT. Fibras insolúveis em produtos cárneos. São Paulo, 2001. 20p.

COOPER, R. On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. **FEMS Microbiolo. Letters**. v. 146, p. 85-89, 1997.

DEMEYER, D. I.; VERPLAETSE, A.; GISTELINCK, M. Fermentation of Meat: An Integrated Process. **Belgan Journal of Food Chem. Biotech**. v. 4, n. 5, p131-139, 1986.

DEMEYER, D. I. Quality and safety of fermented meat products. **Flair Flow Reports**. 1995. 1p.

den BRINKER, C.; KERR, M.; RAYNER, C. **Investigation of Biogenic Amines in Fish and Fish Products**. Australia. Public Health Division. Press. 1998. 17p.

DURLU-OZKAYA, F.; AYHAN, K.; VURAL, N. Biogenic amines by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products. **Meat Science**. v. 58, p. 163-166, 2001.

EEROLA, S.; *et alli*. Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines. **J. AOAC Inter**. v. 76, n. 3, p. 575-777, 1993.

EI-SAYED, M. M. Biogenic Amines in Processed Cheese Available in Egypt. **Int. Dairy Journal**. v. 6, p. 1079 -1086, 1996.

ERKKILÄ, S. **Bioprotective and probiotic meat starter cultures for the fermentation of dry sausages**. 2001. 64 f. Tese (PhD. Dissertation of food Technology). University of Helsinki. Department of Food Technology, Helsinki, 2001.

FACULTAD DE MEDICINA – FMEDIC. **Alergias alimentares**. Disponível em: <<http://www.unr.edu.ar/>>. Acesso em: 21 jan. 2003.

FADDA, S.; VIGNOLO, G.; OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* starins. **Biotechno. Letters**. v. 23, p. 2015-2019, 2001.

FDA. Decomposition and Histamine-Raw, Frozen tuna and Mahi-Mahi; Canned Tuna; and Related Species. Revised CPG; Availability. **Fed. Regist.** v. 149, p. 39754-39756, 1995.

FEHLHABER, K; JANETSHKE, P. **Higiene veterinaria de los alimentos**. Zaragoza. Acribia. 1995. 669p.

FORREST, J. C.; *et alli*. **Fundamentos de ciencia de la carne**. Zaragoza. Acribia. 1979. 364p.

FANKHAUSER, C.; *et alli*. Interaction of MAO inhibitors and dietary tyramine: A new experiment model in the Conscious rat. **J. Pharma. Toxicol. Methods**. v. 32, n. 4, p. 219-224, 1994.

FRAZIER, W. G.; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza. Acribia. 1993. 681p.

GARDINI, F.; *et alli*. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. **Meat Science**. v. 61, p. 257-283, 2002.

GENNARO, M. C.; *et alli*. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in semi-hard Italian cheese (Toma). **Food Chemistry**. v. 82, p. 545-551, 2003.

GLÓRIA, M. B. A.; IZQUIERDO-PULIDO, M. Levels and Significance of Biogenic Amines in Brazilian Beers. **J. Food Composition and Analysis**. v. 12, p. 129-136, 1999.

GLÓRIA, M. B. A. Aminas Bioativas como Critério de Qualidade na Indústria Alimentícia. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, Campinas. **Anais...** Campinas, 2001 p. 15.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SANTOS, E.; M. ROVIRA, I. J. J. Influence of starter cultures and sugar concentration on biogenic amine contents in *chorizo* dry sausage. **Food Microbiology**. v. 20, p. 275-284, 2003.

GOÑI, D. T.; Cerdán, T. G.; AZPILICUETA, C. A. Influencia de la cepa de levadura en el contenido de aminas biógenas en los vinos. In: JORNADAS

CIENTÍFICAS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN ENOLÓGICA, VI., Valencia, **Anais...** Valencia, 2001. p. 63.

GRAVES, R. Sausages fermentation: new ways to control acidulation of meat. **The National Provisioner**. Chicago. 1998. p. 2.

GRIS, E. F.; *et alli*. Produtos fermentados. **Rev. Nacional da Carne**. n. 308, 2002.

HAIMART, M.; *et alli*. Whole blood in plasma histamine in common migraine. **Cephalalgia**. v. 7, p. 39-42. 1987.

HALÁSZ, A.; *et alli*. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science Technology**. v. 5, p. 42-49. 1994.

HAYES, P. R. **Microbiología Moderna de los Alimentos**. Zaragoza. Acribia. 1993. 369p.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. New Developments in Meat Starter Cultures. **Meat Science**. v. 49, p. 125-138, 1998.

HAMMES, W. P.; KNAUF, H. J. Starters in the Processing of Meat Products. **Meat Science**. v. 36, p. 155-168, 1994.

HAMMES, W. P.; BANTLEON, A.; MIN, S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 87, p. 165-174, 1990.

HIERRO, E.; de la HOZ, L.; ORDÓÑEZ, J. A. Contribution of the Microbial and Meat Endogenous Enzymes to the Free Amino Acid and Amine Contents of Dry Fermented Sausages. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, n. 3, p. 1156-1161, 1999.

HERNÁNDEZ-HIERRO, M. M.; *et alli*. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salet anchovies (*Egraulis encrasicolus*). **J. Food Protec.** v. 62, p. 509-514, 1999.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; *et alli*. Biogenic Amine and Polyamine Contents in Meat and Meat Products. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, n. 6, p. 2098-2112, 1997.

\_\_\_\_\_. Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Meat and Meat Products. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, n. 9, p. 2710-2715, 1996a.

\_\_\_\_\_. Biogenic Amine Sources in Cooked Cured Shoulder Pork. **J. Aric. Food Chem.** v. 44, n. 10, p. 3097-3101, 1996b.

HOTCHKISS, J.; SCALAN, R. A.; LIBBEY, L. M. Formation of Bis (hydroxyalkyl) –N-nitrosamines as Products of the Nitrosation of Spermidine. **J. Agric. Food Chem.** v. 25, p. 1183-1189, 1977.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. **Meat Science.** v. 49, p. 139-150, 1998.

HUGAS, M.; MANFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry.** v. 59, p. 547-554, 1997.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; *et alli.* Biogenic Amines in European Beers. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, n. 10, p. 3159-3163, 1996.

IZQUIERDO-PULIDO, M.; FONT-FÁBREGAS, J.; VIDAL-CARAU, C. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation. **Food Chemistry.** v. 54, p. 51-54, 1995.

JANSEN, S.; *et alli.* Intolerance to dietary biogenic amines: a review. **Ann. Allergy. Asthma. & Immunology.** v. 91, p. 233-241. 2003.

JAY, J. M. Microorganisms in Fresh Ground Meats: the Relative Safety of Products with Low Versus High Numbers. **Meat Science.** v. 43, p. S59-S66, 1996.

\_\_\_\_\_. **Microbiología Moderna de los Alimentos.** Zaragoza. Acribia. 1994. 804p.

JOHANSSON, S. G.; *et alli.* A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy.** v. 56, p. 813-824, 2001.

KANIOU, I.; *et alli.* Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4°C. **Food Chemistry.** v. 74, p. 515-519, 2001.

KALAC, P.; *et alli.* Concentration of seven biogenic amines in sauerkraut. **Food Chemistry.** v. 67, p. 275-280, 1999.

KARAÇAM, H.; KUTLU, S.; KÖSE, S. Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. **Int. J. Food Science and Technology.** v. 37, p.19-28, 2002.

KERR, M.; *et alli.* **Effect of Storage Conditions on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna.** Australia. Public Health Division. Press. 2002. 20p.

LACAZ, R. R. **Microbiología Zootécnica.** São Paulo. ROCA. 1992. 314p.

LANDETE, J. M.; FERRER S.; PARDO, I. Producción de aminas biogénicas por bacterias lácticas de origen enológico. In: VI JORNADAS CIENTÍFICAS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN ENOLÓGICA. Valencia, **Anais**... Valencia, 2001. p. 64.

LANGELLA, P.; *et alli*. Intergeneric and intrageneric conjugal transfer of plasmids pAM $\beta$ 1, pIL205 and pIP501 in *Lactobacillus sake*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 139, p. 51-56, 1996.

LAUZURICA, L. Z.; FAYOS, J. G. Presencia de sulfitos en carne picada y preparados de carne elaborados en industrias de la comunidad Valenciana. **Rev. Esp. Salud Pública**. v. 71, n. 4, p. 401-407, 1997.

LEITÃO, M. F. F.; SILVEIRA N. F. A.; BALDINI, V. L. S. Histamina em queijos tipo Minas Padrão e Prato. **Colet. ITAL**. v. 25, n. 2, p. 173-179, 1995.

LESSOF, M. H. **Alergia e Intolerancia a los Alimentos**. Zaragoza. Acribia. 1995. 218p.

\_\_\_\_\_. **Food Allergy and other adverse reactions to food**. Bélgica. ILSI Press. 1998. 29p.

LEUSCHNER, R. G. K.; HAMMES W. P. Tyramine Degradation by Micrococci During Ripening of Fermented Sausage. **Meat Science**. v. 49, p. 289-298, 1998.

LEUSCHNER, R. G. K.; HEIDEL, M.; HAMMES W. P. Histamine and Tyramine degradation by food fermenting microorganisms. **Int. J. Food Microbiology**. v. 39, p. 1-10, 1998a.

LEUSCHNER, R. G. K.; KURIHARA, R.; HAMMES W. P. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. **Int. J. Food Microbiology**. v. 44, p. 15-20, 1998b.

LIMA, A.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas Bioativas em Alimentos. **SBCTA**. v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

LINDNER, E. **Toxicología de los Alimentos**. Zaragoza. Acribia. 1995. 262p.

LOVENBERG, W. Psycho- and Vasoactive Compounds in Food Substance. **J. Agric. Food Chem**. v. 22, n. 1, p. 23-26, 1974.

MAIJALA, R.; *et alli*. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. **J. Food Science**. v. 60, n. 6, p. 1187-1190, 1995a.

MAIJALA, R.; NURMI, E.; FISCHER, A. Influence of Processing Temperature on the Formation of Biogenic Amines in Dry Sausages. **Meat Science**. v. 39, p. 9-12, 1995b.

MAIJALA, R.; EEROLA, S., Contaminant Lactic Acid Bacteria of Dry Sausages Produce Histamina and Tyramina. **Meat Science**. v. 35, p. 387-395, 1993.

MARTUSCELLI, M.; *et alli*. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausage. **Letters in Applied Microbiology**. v. 31, p. 228-232, 2000.

MASSON, F.; TALON, R.; MONTEL M. C. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. **Int. J. Food Microbiology**. v. 32, p. 199-207, 1996.

MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical Quality index of Cannes Tuna as Determined by High-Pressure Liquid Chromatography. **J. Food Science**. v. 42, p. 155-158, 1977.

MOLLY, K.; GREENEN, I. Compararison of amine production between *Carnobacterium divergens* and *Lactobacillus sake* in dry sausages. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 42., 1996, Lillhammer. **Proceeding...** Lillhammer, 1996 p. 29.

MOLLY, K.; *et alli*. Effect of *Carnobacterium divergens* on amine production in dry sausages and in a sterile meat model system. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 42., 1996, Lillhammer. **Proceeding...** Lillhammer, 1996 p. 24.

MONTEL, M. C.; *et alli*. Amine Production in Meat Fermentation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 42., 1996, Lillhammer. **Proceeding...** Lillhammer, 1996 p. 18.

\_\_\_\_\_. Effects of Starter Cultures on the Biochemical Characteristics of French Dry Sausages. **Meat Science**. v. 35, p. 229-240, 1993.

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; *et alli*. Influence of Starter and Nonstarter on the formation of Biogenic Amines in Goat Cheese During Ripening. **J. Dairy Sci**. v. 85, p. 2471-2478, 2002.

NASSU, R. T. **Utilização de carne de caprinos no processamento de embutido fermentado, tipo salame**. 1999. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1999.

ÖZOGUL, F.; *et alli*. Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. **Int. J. Food and Science and Technol**. v. 37, p. 515-532, 2002.

ORDOÑEZ, J.; *et alli*. Changes in the Components of Dry-Fermented Sausages during Ripening. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**. v. 39, n. 4, p. 329-367, 1999.

ORTOLANI, C.; *et alli*. Controversial aspects of adverse reactions to food. **Allergy**. v. 54, p. 27-45, 1999.

PARENTE, E.; *et alli*. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, p. 882-891, 2001.

PAULSEN, P.; BAUER, F.; VALI, S. Biogenic amines in fermented sausage. **Fleischwirtschaft International**. v. 4, p. 362-364, 1997.

PEARSON, A. M.; GILLET, T. A. **Processed meats**. New York. Chapman & Hall. 1999. 448p.

PRÄNDL, O.; *et alli*. **Tecnología e Higiene de la Carne**. Zaragoza. Acribia. 1994. 854p.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. Zaragoza. Acribia. 1994. 581p.

REIS, A. G. B.; SOARES, G. J. D. Salame colonial processado com carne suína e ovina. **Rer. Brás. de Agrociência**. v. 2, n. 2, p. 115-120, 1998.

ROIG-SAGÉS, A. X.; *et alli*. Evaluation of three descarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. **Lett. Applied Microbiology**. v.25, p.309-312, 1997.

RYSZARD, R. The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized ham. **Meat Science**. v. 60, p.335-339, 2002.

SALAZAR, M. T.; SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R. ¿Son las aminas biogénicas responsables de reducir el rendimiento del camarón azul? **Ciencia UANL**. v. 5, n. 2, p. 165-172, 2002.

SIEG, J.; GLATTHAR, J. Minimise weight loss during drying. The use of Vitacel® wheat fibre in raw fermented sausage. **Fleischwirtschaft. International**. v. 2, p. 43-45, 2005.

SILLA, M. H. Amino acid descarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. **Int. J. Food Microbiology**. v. 39, p. 227-230, 1998.

\_\_\_\_\_. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. J. Food Microbiology**. v. 29, p. 213 - 231, 1996.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília. Embrapa. 1995. 159p.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS – SINITOX. **Casos Registrados de Intoxicação Humana por agente Tóxico e Sexo**. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/sinitox/2003/sul2003.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2005.

SLEMR, J.; BEYERMANN, K. Concentration Profiles of Diamines in Fresh and Aerobically Stored Pork and Beef. **J. Agric. Food Chem.** v. 33, n. 3, p. 336-339, 1985.

SMART, D. R. Scombroid poisoning. A report of seven cases involving the Western Australian salmon, *Arripis truttaceus*. **Med. J. Aust.** v. 157, p. 748-751, 1992.

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

SMITH, T. K.; *et alli*. Feed-borne biogenic amines: Natural toxicants or growth promoters? In: MEMORIAS DEL SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, V., 2000, Mérida. **Proceeding**... Mérida, 2000 p. 1-9.

SOARES, V. F. M.; *et alli*. Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 18, n. 4. p. 462-470, 1998.

SPINELLI, A. M; LAKRITZ, L.; WASSERMAN, E. Effects of Processing on the Amine Content of Pork Bellies. **J. Agric. Food Chem.** v. 22, n. 6, p. 1026-1029, 1974.

SU, S. C.; *et alli*. Determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatography B**. v. 749. p. 163-169, 2000.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **Int. J. Food Microbiology**. v. 88, p. 41-54, 2003.

ten BRINK, B.; *et alli*. Occurrence and formation of biologically activities amines in foods. **Int. J. Food Microbiology**. v. 11, p. 73-84, 1990.

TERRA, N. N.; *et alli*. A carne e os benefícios da fibra alimentar. **Rev. Nacional da Carne**. n. 314, p. 52-56, 2003a.

\_\_\_\_\_. Fibra, uma atitude inteligente. **Rev. Nacional da Carne**. n. 314, p. 77-79, 2003b.

TERRA, A. B. M. **Inovações na fabricação de embutidos curados**. Santa Maria. 2003. 168 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

TERRA, N. N., Fermentação cárnea: princípios e inovações. **Rev. Nacional da Carne**. n. 294, p. 30-38, 2001.

\_\_\_\_\_. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. Unisinos. São Leopoldo. 1998. 216p.

\_\_\_\_\_. Fermentação como Fator de Segurança e Qualidade para o Consumidor. **Rev. Nacional da Carne**. n. 239, p. 26-32, 1997.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados. Técnicas de Controle de Qualidade**. São Paulo. Nobel. 1998. 119p.

TKACHENKO, A.; PSHENICHOV, M.; NESTEROVA, L. Putrescine as a Factor Protecting *Escherichia coli* against Oxidative Stress. **Microbiology**. v. 70, n. 4, p. 423-428, 2001.

TREPTOW, H; ASKAR, A. Biogene amine erkennen und in grenzen halten. In TREVIÑO, E., BEIL, D., STEINHART, H. **Food Chemistry**. v. 58, p. 385-390, 1997.

TREVIÑO, E.; BEIL, D.; STEINHART, H. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. **Food Chemistry**. v. 60, p. 521-526, 1997.

TRICKER, A. R.; *et alli*. Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. **Food Chem. Toxicol**. v. 29, p. 729-732, 1991.

van GELDEREN, C. E.; *et alli*. **J. Toxicol. Clin. Toxicol**. v. 30, p. 585-596, 1992.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos carnicos: tecnologia, química y microbiologia**. Zaragoza. Acribia. 1995. 423p.

VAUGHAN, T. R. The role of food in the pathogenesis of migraine headache. **Clin. Rev. Allergy**. v. 12, p. 167-180, 1994.

VECIANA-NOGUÉS, M. T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic Amines as Hygienic Quality Indicators of Tuna. Relationship with Microbial Counts, ATP-Related Compounds, Volatile Amines, and Organoçeptic Changes. **J. Agric. Food Chem**. v. 45, n. 6, p. 2036-2041, 1997a.

\_\_\_\_\_. Biogenic Amines in French and Canned Tuna. Effects of Canning on Biogenic Amines Contents. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, n. 11, p. 4324-4328, 1997b.

VIDAL-CARAU, M. L.; CONDONY-SALCEDO, R.; MARINÉ-FONT, A. Histamine and Tyramine in Spanish Wines: Relations with Total Sulfur Dioxide Level, Volatile Acidity and Malo-lactic Fermentation Intensity. **Food Chemistry.** v. 35, p. 217-227, 1990a.

VIDAL-CAROU, M. L.; *et alli.* Histamine and Tyramine in Meat Products: Relationship with Meat Spoilage. **Food Chemistry.** v. 37, p. 239-249, 1990b.

VINCI, G.; ANTONELLI, M. L., Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. **Food Control.** v. 13, p. 519-524, 2002.

WARTHESEN, J.; *et alli.* Formation of Heterocyclic N-Nitrosamines from Reaction of Nitrite and Selected Primary Diamines and Amino Acids. **J. Agric. Food Chem.** v. 23, n. 5, p. 898-902, 1975.

WONG, D. W. S. **Química de los Alimentos Mecanismo y Teoría.** Zaragoza. Acibia. 1995. 476p.

YANO, Y.; *et alli.* Changes in the concentration of biogenic amines and application of tyramine sensor during storage of beef. **Food Chemistry.** v. 54, p. 155-159, 1994.

## **9 ANEXOS**

ANEXO A – Ficha usada para a análise sensorial do salame tipo Italiano e do salame cozido

<b>ANÁLISE SENSORIAL</b>				
<b>PRODUTO:</b> _____			<b>DATA:</b> __/__/____	
<b>PROVADOR:</b> _____				
<b>Atribua notas de zero a dez a cada um dos atributos sensoriais abaixo:</b>				
<b>ZERO (0):</b>	<b>Desgostei muitíssimo</b>			
<b>CINCO (5):</b>	<b>Gostei</b>			
<b>DEZ (10):</b>	<b>Gostei muitíssimo</b>			
<b>Atributos</b>				
<b>Coloração</b>				
<b>Aroma</b>				
<b>Sabor</b>				
<b>Textura</b>				
<b>Observações:</b> _____				
_____				
_____				
_____				