

Determinação de amins biogênicas em diferentes tipos de queijos por cromatografia líquida de alta eficiência

Determination of biogenic amines in different types of cheese by high-performance liquid chromatography

RIALA6/1435

Fernanda Lima CUNHA*, Carlos Adam CONTE JUNIOR, César Aquiles LÁZARO, Lucas Rabaça dos SANTOS, Eliane Teixeira MÁRSICO, Sérgio Borges MANO

* Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ, CEP 24.230-340. E-mail: nandavetuff@yahoo.com.br.

Recebido: 25.07.2011 - Aceito para publicação: 16.02.2012

RESUMO

As amins biogênicas (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) foram determinadas e quantificadas em quatro diferentes tipos de queijos utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para realizar o estudo, foram adquiridas 10 amostras de cada tipo de queijo – gouda, minas frescal, mozzarella e prato – no mercado varejista do Rio de Janeiro. As 40 amostras passaram pelas etapas de extração e derivatização das amins biogênicas, as quais foram detectadas e quantificadas por CLAE-UV. Para avaliar as diferenças entre os queijos, foram aplicados a análise de variância Anova e o teste de Tukey. Dentre os queijos estudados, o minas frescal apresentou os mais baixos teores de amins biogênicas (24,26 mg.kg⁻¹), e os teores mais elevados (489,15 mg.kg⁻¹) foram detectados no gouda. Das amins biogênicas analisadas, a tiramina foi a que demonstrou concentrações mais elevadas (623,60 mg.kg⁻¹), e a espermidina, as menores concentrações (0,80 mg.kg⁻¹). Considerando-se os quatro tipos de queijos estudados, o gouda parece ser o que requer maiores cuidados com relação ao monitoramento da presença de amins biogênicas. A metodologia mostrou-se eficaz para efetuar a detecção e a quantificação das amins biogênicas nos queijos estudados.

Palavras-chave. queijos, amins biogênicas, CLAE.

ABSTRACT

This study aimed at detecting and quantifying biogenic amines (cadaverine, spermidine, histamine, putrescine and tyramine) in four different types of cheese using high-performance liquid chromatography (HPLC). For this study, ten samples of gouda, minas, mozzarella and prato, four types of cheese, were purchased in retail markets of Rio de Janeiro. Biogenic amines were previously extracted and derivatized; then, these amines were detected and quantified by HPLC-UV. For assessing differences among the analyzed cheeses, data were submitted to Anova and Tukey's test. *Minas* cheese showed the lowest amount of amine (24.26 mg.kg⁻¹), and the highest contents (489.15 mg.kg⁻¹) were found in gouda. As for the investigated biogenic amines, tyramine showed the highest concentrations (623.60 mg.kg⁻¹), and spermidine was found at the lowest concentration (0.80 mg.kg⁻¹) in all four types of cheese. This study indicates that gouda seems to demand a much more careful monitoring of biogenic amines in the analyzed cheese samples. Also, the methodology was effective for detecting and quantifying biogenic amines in all studied cheese samples.

Keywords. cheese, biogenic amines, HPLC.

INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular, de importância biológica em vegetais, animais e células microbianas, formadas principalmente por descarboxilação microbiana de aminoácidos e transaminação de aldeídos e cetonas¹. A presença de amins biogênicas é uma condição inerente ao processamento tecnológico de vários alimentos que contenham proteínas ou aminoácidos livres e que estejam sujeitos a condições que permitam a atividade microbiana e/ou bioquímica².

As amins podem ser classificadas de acordo com o número de grupos amínicos em: monoaminas, diaminas e poliaminas. Quanto à estrutura química, são classificadas em aromáticas (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, serotonina, dopamina e octopamina), diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina), poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina) e heterocíclicas (histamina, triptamina, serotonina)³.

O estudo de amins biogênicas em alimentos apresenta correlação direta com a qualidade da matriz alimentar e a saúde do consumidor. Questões relacionadas à saúde envolvem, em particular, a intoxicação histamínica, com sintomatologia variada de acordo com a quantidade ingerida e a sensibilidade do indivíduo. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, edema cutâneo, urticária, hipotensão, cefaleia, vertigens, rubor e ardência na boca⁴. Em casos graves, em curto espaço de tempo, podem ocorrer dores torácicas e distúrbios respiratórios⁵. Na presença de nitritos, as amins podem formar N-nitrosaminas, as quais têm ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica⁶.

Entre as amins biogênicas, a ação da tiramina é particularmente importante, uma vez que a intoxicação por ela desencadeia crises hipertensivas e enxaquecoides, náuseas, vômito, angústia respiratória e palpitação⁷. Os riscos da ingestão de alimentos com amins biogênicas podem ser maiores se os sistemas enzimáticos estiverem bloqueados por inibidores da mono ou diamino oxidase, ou se o indivíduo for portador de doenças gastrointestinais, deficiências genéticas, ou houver fatores de potencialização, como o consumo de álcool⁸.

No Brasil, o setor de laticínios tem grande importância socioeconômica, em especial na fabricação de queijos. Este mercado ocupa atualmente o sexto lugar na produção mundial⁹, oferecendo ainda uma infinidade

de produtos lácteos atendendo aos interesses específicos de certos grupos de consumidores que buscam produtos saudáveis e que não causem risco à saúde dos mesmos¹⁰.

O processo de maturação decorrente do processamento tecnológico produz alterações de textura e sabor, associadas principalmente à proteólise da caseína, resultando em aumento no teor de aminoácidos livres¹¹, que, por ação de descarboxilases bacterianas, produzem amins biogênicas^{12,13}. Micro-organismos com atividade descarboxilase podem estar relacionados à utilização de culturas "starter"¹⁴, ou micro-organismos contaminantes provenientes do leite ou do processo de obtenção tecnológica do queijo¹⁵. É possível também utilizar a determinação de amins biogênicas como parâmetro de qualidade no processo de fabricação¹⁶, ou como indicador do grau de proteólise, característico de alguns tipos de queijos especiais¹⁷.

Várias técnicas analíticas, como eletroforese capilar (EC), cromatografia em camada delgada (CCD)¹⁸, cromatografia gasosa (CG)¹⁹, cromatografia de troca iônica²⁰ e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)¹⁶, têm sido propostas para a determinação de amins biogênicas em matrizes alimentares. Dentre as técnicas citadas, a CLAE em fase reversa é considerada a mais adequada²¹.

Este trabalho justifica-se devido à importância da determinação e da quantificação das amins biogênicas em queijos para a saúde pública e pela carência de literatura abordando esse tema no Brasil. Com isso, os resultados obtidos neste estudo irão fornecer à comunidade técnico-científica informações sobre qual dos queijos estudados possui maior risco ao consumidor, assim como qual das amins biogênicas está presente em maior quantidade em cada tipo de queijo estudado.

O presente estudo teve como objetivo detectar e quantificar as amins biogênicas (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) em quatro diferentes tipos de queijos, utilizando a técnica de CLAE, além de verificar se o método utilizado é eficaz para a detecção e a quantificação das amins biogênicas nos queijos analisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e Reagentes

Os padrões utilizados de cadaverina, putrescina, tiramina, espermidina e histamina foram obtidos do Sigma Aldrich; acetonitrila, ácido perclórico, hidróxido

de sódio, éter dietílico da Tedia e água ultrapura, pelo Sistema Simplicity UV Milli-Q (Millipore).

Equipamentos

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu[®] modelo LC/10 AS acoplado ao detector UV SPD/10 AV, com integrador C-R6A Chromatopack. Empregou-se uma coluna Teknokroma, TR-016057 N26243 Tracer Extrasil ODS2 (15 × 0,46 cm, id. 5 µm) e pré-coluna Supelco, Ascentis C18 (2 × 0,40 cm, id. 5 µm). Foram usados ainda homogenizador Certomat[®] MV, B. Braun Biotech International, centrífuga Hermle Z 360 K, banho ultrassônico Cleaner USC 2800 A, filtro Whatman n° 1 de 150 mm, potenciômetro digital de bancada marca Digimed[®] modelo DM 22 e seringa Hamilton microliter modelo TM 705 de 50 µL.

Condições cromatográficas

Foi utilizado um fluxo de 1 mL.min⁻¹, com fase móvel isocrática de acetonitrila:água 42:58 (v:v). O volume de injeção foi de 20 µL. O detector UV foi programado a 198 nm. O tempo de corrida para cada amostra foi de 15 minutos.

Validação do método

O limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ) e a recuperação foram realizados de acordo com as Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos, do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia²².

Obtenção das amostras

Foram analisadas dez amostras de quatro diferentes tipos de queijo – gouda, minas frescal, mozzarella e prato –, totalizando 40 amostras, no período de janeiro a março de 2011, as quais foram adquiridas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro e transportadas em caixa isotérmica com gelo até o laboratório, onde permaneceram sob refrigeração até o início das análises.

Extração e derivatização das aminas biogênicas

Para o processo de extração das aminas, foram pesados 5 gramas da amostra, adicionados de solução a 5% de HClO₄ 1:1 (v:p), e vigorosamente homogeneizados por 2 minutos. A mistura foi mantida por 1 hora sob refrigeração (4 ± 2 °C), com agitação periódica e, em seguida, centrifugada por 503 g por dez minutos a 4 ± 1 °C. O sobrenadante foi submetido a uma primeira

filtração (Whatman n° 1), seguida da adição de hidróxido de sódio 2 N até atingir pH > 6. Logo após, a mistura permaneceu em banho de gelo por 20 minutos e realizou-se uma segunda filtragem em condições similares. As amostras foram adicionadas de hidróxido de sódio 2 N até pH > 12, e, em seguida, realizou-se a derivatização com adição de 40 µL de cloreto de benzoíla. A mistura foi homogeneizada por 15 segundos e mantida em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 mL de éter dietílico, por duas vezes consecutivas, aproveitando-se a fase etérea (sobrenadante). Evaporou-se o éter em corrente de nitrogênio e ressuspendeu-se em 500 µL da fase móvel.

Quantificação das aminas biogênicas

Foi realizado o método de padrão externo, para o qual as soluções-estoque dos padrões de cada amina biogênica (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) foram preparadas em HCl 0,1 N, e em seguida realizaram-se a derivatização e a análise dos padrões conforme se fez com as amostras.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (Anova) e posterior diferença de média pelo teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No método utilizado, foram obtidos os seguintes tempos de retenção em minutos para cada amina: tiramina (3,3), putrescina (4,3), cadaverina (5,3), espermidina (6,5) e histamina (11,4). O LOD e o LOQ para as aminas estudadas variaram de 0,03 a 1,30 mg.L⁻¹ e de 0,20 a 5,00 mg.L⁻¹, respectivamente. A recuperação para estas aminas variou de 91% a 107%.

A Figura 1 apresenta teor médio de aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina e espermidina em mg.kg⁻¹) em queijos gouda, mozzarella, prato e minas. O queijo minas frescal apresentou baixos teores de aminas. Esta ocorrência parece estar relacionada principalmente com o fato de não ser um produto maturado, fator que não favorece a formação de aminas, sendo a produção limitada às etapas de transporte e estocagem²³.

Comparando-se a concentração das aminas em cada tipo de queijo analisado, observou-se que a concentração de putrescina no gouda foi estatisticamente (p < 0,01) superior à dos queijos minas, mozzarella e

prato. Outro resultado expressivo foi observado na concentração de tiramina ($361,99 \text{ mg.kg}^{-1}$) e histamina ($79,13 \text{ mg.kg}^{-1}$) no gouda. A tiramina presente neste queijo foi estatisticamente ($p < 0,01$) superior, com relação tanto à concentração das demais aminas presentes (73,84%) como à concentração de tiramina dos queijos minas frescal e mozzarella. É importante salientar que concentrações de aminas biogênicas de $100\text{-}1.000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ou superiores podem ter consequências para a saúde dos consumidores, principalmente em pacientes submetidos a tratamento com medicamentos inibidores da mono ou diamino oxidase²³. Outros autores encontraram resultados semelhantes de histamina analisando queijo gouda ($76,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), no entanto, encontraram resultados inferiores de tiramina ($95,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) analisando o mesmo tipo de queijo²⁴. Essa diferença pode ser explicada primeiramente pelas condições higiênicas do leite, uma vez que estes micro-organismos, com atividade descarboxilase, podem contaminar o leite em sua obtenção assim como no processamento tecnológico do queijo¹⁵. Outra possível causa seria a utilização de culturas “*starter*” diferentes¹⁴. Outra justificativa para os diferentes resultados seria a variação da composição proteica do leite, que pode ocorrer devido a estação do ano, nutrição, sanidade animal e estágio de lactação^{25,26}.

Assim como outros queijos maturados, o gouda contém altos níveis de aminas biogênicas e está entre os queijos mais frequentemente envolvidos em episódios de intoxicação histamínica. Queijos contendo 10 mg de histamina em 100 g de amostra podem causar intoxicação por histamina; $10\text{-}80 \text{ mg}$ de tiramina podem causar “a reação do queijo” (6 mg , se o paciente estiver sendo tratado com inibidores da MAO)^{12,27}, que pode ser definida como uma crise hipertensiva, acompanhada de severa dor de cabeça, observada após a ingestão de alimentos ricos em tiramina²⁸.

A Figura 2 apresenta a porcentagem de aminas biogênicas (tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e histamina) por queijo estudado. No mozzarella, entre as aminas determinadas, $56,70\%$ foi tiramina ($96,28 \text{ mg.kg}^{-1}$) e $42,23\%$ foi histamina ($71,70 \text{ mg.kg}^{-1}$). No queijo prato, foi observado $81,62\%$ de tiramina ($152,91 \text{ mg.kg}^{-1}$). Esses resultados permitem estabelecer uma correlação com dados da literatura referentes a surtos de intoxicação por histamina relatados após o consumo de queijo e peixe². A histamina é considerada a amina mais tóxica detectada nos alimentos²⁹, exercendo esse efeito ao interagir com dois

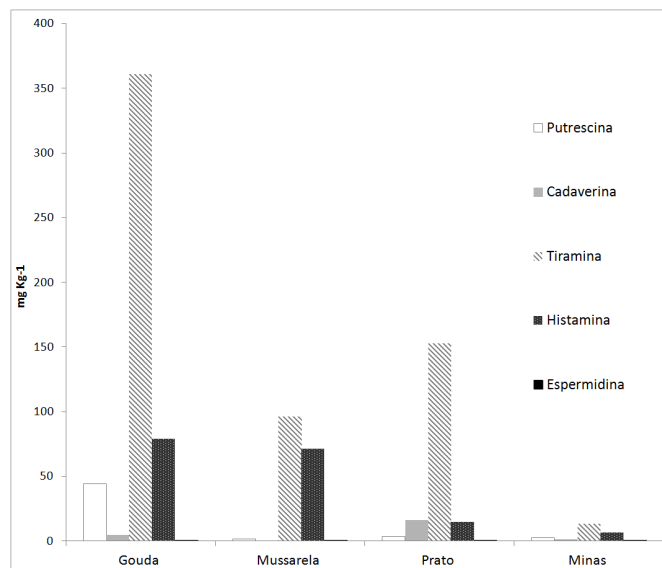


Figura 1. Representação gráfica do teor médio de aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina e espermidina em mg.kg^{-1}) em queijos gouda, mozzarella, prato e minas

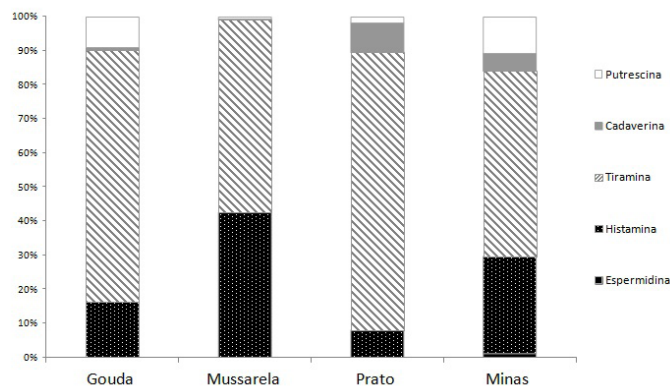


Figura 2. Representação gráfica (%) de aminas biogênicas (tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e histamina) por queijo estudado

tipos de receptores (H e Hz) nas membranas celulares dos seres humanos e outras espécies. A histamina causa dilatação dos vasos sanguíneos periféricos, vasos capilares e artérias, resultando em hipotensão, rubor e cefaleia³⁰, e induz a contração da musculatura lisa intestinal mediada por receptores H, responsáveis por cólicas abdominais, diarreia e vômito³¹. Os efeitos toxicológicos dependem da concentração de histamina ingerida, da presença de outras aminas, da atividade amino-oxidase e da fisiologia intestinal do indivíduo³².

Outro achado importante foi a alta concentração de tiramina encontrada nos queijos de maior maturação,

Tabela 1. Teor médio e porcentagem aproximada de aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina e espermidina) em amostras de queijos Gouda, Mussarela, Prato e Minas

Aminas biogênicas	Gouda		Mussarela		Prato		Minas		Total (mg.kg ⁻¹)
	Média (mg.kg ⁻¹)	%	Média (mg.kg ⁻¹)	%	Média (mg.kg ⁻¹)	%	Média (mg.kg ⁻¹)	%	
Putrescina	44,10 ^a	9,02	1,34 ^b	0,79	3,29 ^b	1,76	2,60 ^b	10,74	51,34
Cadaverina	4,48 ^a	0,92	0,30 ^b	0,18	16,18 ^c	8,64	1,30 ^a	5,35	22,26
Tiramina	361,19 ^a	73,84	96,28 ^b	56,70	152,91 ^b	81,62	13,21 ^c	54,44	623,60
Histamina	79,13 ^a	16,18	71,70 ^a	42,23	14,82 ^b	7,91	6,90 ^b	28,42	172,55
Espermidina	0,24 ^a	0,05	0,18 ^a	0,11	0,13 ^a	0,07	0,25 ^a	1,05	0,80
Total	489,15 ^a	100	169,80 ^{bc}	100	187,35 ^b	100	24,26 ^c	100	

Valores médios de dez determinações amostrais de cada tipo de queijo estudado. Valores na mesma linha com diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

como gouda, prato e mozzarella (361,19 mg.kg⁻¹, 152,91 mg.kg⁻¹ e 96,28 mg.kg⁻¹, respectivamente). A tiramina, do ponto de vista toxicológico, é uma importante amina biogênica, formada pela ação da tirosina descarboxilase, produzida por bactérias presentes em alimentos. Contudo, os mecanismos de desintoxicação no homem podem ser insuficientes nos casos de alta ingestão, por pessoas alérgicas e por pacientes que fazem uso de drogas como os medicamentos anti-parkinsonianos e antidepressivos².

Quando estudados os totais de aminas biogênicas presentes nos queijos analisados, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$). O gouda apresenta maiores quantidades de aminas ($p < 0,05$) do que os outros queijos estudados. Essa diferença pode ser explicada porque é o queijo que possui maior tempo de maturação entre os analisados (mínimo de 60 dias de maturação)³³. Não se verificou diferença significativa entre os queijos minas e mozzarella, assim como entre mozzarella e prato. Contudo, quando comparados os queijos minas e prato, encontraram-se quantidades totais de aminas diferentes ($p < 0,05$). Este fato pode também ser explicado devido à diferença do processamento tecnológico dos queijos. O queijo minas é um produto frescal e não sofre maturação³³, já o mozzarella tem período de maturação mínimo de 24 horas³⁴. Por outro lado, o queijo prato apresenta tempo de maturação mínimo de 25 dias³⁵.

A tiramina está incluída no grupo das aminas vasoativas, atuando indiretamente na liberação de noradrenalina do sistema nervoso simpático, provocando aumento da pressão arterial periférica, vasoconstrição e aumento do débito cardíaco¹¹. Esta amina também

provoca dilatação das pupilas, do tecido palpebral, lacrimejamento, salivação, aumento da respiração e dos níveis de glicose sanguínea. A enzima monoamino oxidase desempenha papel importante na degradação das aminas biogênicas³⁶. No homem, o uso de medicamentos para o tratamento de transtornos mentais e depressão elimina esse processo de desintoxicação. Assim, altas concentrações de aminas, como a tiramina proveniente de alimentos, acumuladas no sangue podem levar a uma crise hipertensiva desses pacientes³⁷.

A espermidina foi encontrada em baixas concentrações em todos os queijos, e não houve diferença estatística entre os mesmos. As poliaminas, como putrescina, espermidina, espermina e cadaverina, são componentes indispensáveis às células vivas, importantes na regulação da função dos ácidos nucleicos, na síntese de proteínas e na estabilização de membranas¹². Poliaminas, como a putrescina, a espermidina e a cadaverina, não são comumente relacionadas com efeitos adversos sobre a saúde. No entanto, podem reagir com nitrito, dando origem a nitrosaminas (substâncias com atividade carcinogênica), e estão relacionadas com a perda de qualidade, pela degradação dos aminoácidos precursores, sendo indicadores de deterioração ou maturação³⁸. Também favorecem a absorção intestinal e diminuem o catabolismo da histamina, potencializando sua toxicidade³⁹.

CONCLUSÃO

O método utilizado mostrou-se eficaz para a detecção e a quantificação das aminas biogênicas nos

queijos analisados, podendo ser usado no controle de qualidade e/ou fiscalização, para que sejam produzidos e comercializados alimentos dentro dos limites seguros.

Dentre os queijos estudados, o gouda parece ser o que requer maiores cuidados com relação à monitorização da presença de amins biogênicas, sendo a tiramina a amina que apresentou os maiores teores neste tipo de queijo. Além disso, este estudo demonstrou que a tiramina também apresentou elevadas concentrações quando comparadas às outras amins biogênicas nos outros queijos analisados.

A identificação e a quantificação de amins biogênicas em queijos são de fundamental importância, para se evitarem possíveis casos de intoxicação de indivíduos que venham a consumir estes produtos. Aliado a isso, é necessário a divulgação das consequências da ingestão de queijos contendo amins biogênicas para prevenir doenças crônicas, como o câncer, ou agudas, como crises enxaquecoides, principalmente em indivíduos mais sensíveis, alérgicos ou que estejam fazendo uso de medicamentos inibidores da MAO.

REFERÊNCIAS

1. Pintado AIE, Pinho O, Ferreira IMPLVO, Pintado MME, Gomes AMP, Malcata FX. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *Int Dairy J*. 2008;18:631-40.
2. Silla-Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*. 1996;29:213-31.
3. Mariné-Font A. Les amines biogènes en els aliments: història i recerca en el marc de les ciències de l'alimentació. Barcelona: Institut d'estudis Catalans; 2005.
4. Carmo FBT, Mársico ET, São Clemente SC, Carmo RP, Freitas MQ. Histamina em conservas de sardinha. *Cien Anim Bras*. 2010;11(1):174-80.
5. Russel FE, Maretic Z. Scombroid Poisoning: mini review case histories. *Toxicol*. 1986;24(10):967-73.
6. Komprda T, Smělá D, Pechová P, Kalhotka L, Štencl J, Klejduš B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci*. 2004;67(4):607-16.
7. Chiacchierini ED, Restuccia D, Vinci G. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*. 2005;69(3):548-55.
8. Onal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem*. 2007;103:1475-86.
9. Santos VAQ, Hoffmann FL. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos minas frescal e ricota. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):38-46.
10. Dias SS, Lobato V, Verruma-Bernardi MR. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(3):327-33.
11. Joosten HMLG, Olieman C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection. *J Chromatogr*. 1986;356:311-19.
12. Halász A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol*. 1994;5(2):42-9.
13. El-Sayed MM. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *Int Dairy J*. 1996;6(11-12):1079-86.
14. Fernandez-Garcia EJT, Nunez M. Formation of biogenic amines in raw milk hispanico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J Food Prot*. 2000;63:1551-5.
15. Roig-Sagues AX, Molina AP, Hernandez-Herrero MM. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur Food Res Technol*. 2002;215:96-100.
16. Mah JH, Han HK, Oh YJ, Kim MG, Hwang HJSD. Biogenic amines in jetkoals Korean salted and fermented fish products. *Food Chem*. 2002;79:239-43.
17. Innocente N, D'Agostin P. Formation of biogenic amines in typical semi hard Italian cheese. *J Food Prot*. 2002;65:1498-01.
18. Shalaby AR. Multidetecion semi quantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem*. 1995;52:367-72.
19. Perez-Martin RI, Franco JM, Molist P, Gallardo JM. Gas chromatographic method for the determination of volatile amines in sea foods. *Int J Food Sci Tech*. 1987;5:509-14.
20. Standara S, Vesela ME, Drdak M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*. 2000;44:28-31.
21. Moret SE, Conte L. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. Analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J Chromatogr*. 1996;729:363-9.
22. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro. Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 03, 2010.
23. Custódio FB. Eficiência e seletividade de diferentes métodos de extração, purificação e detecção de histamina e tiramina em queijo ralado. [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
24. Ibrahim EMA, Amer AMA. Comparison of biogenic amines levels in different processed cheese varieties with regulatory specifications. *WJ Dairy Food Sci*. 2010;5(2):127-33.
25. Heck JML, Schennink A, Van Valenberg HJF, Bovenhuis H, Visker MHPW, van Arendonk JAM, van Hooijdonk ACM. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J Dairy Sci*. 2009;92:1192-1202.
26. Golinelli LP, Conte-Junior CA, Paschoalin VMF, Silva JT. Proteomic analysis of whey from bovine colostrum and mature milk. *Braz Arch Biol Technol*. 2011;54(4):761-68.
27. Chang SF, Ayres JW, Sandine WE. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophan. *J Dairy Sci*. 1985;68:2840-6.

28. Dadáková E, Krížek M, Pelikánová T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem*. 2009;116:365-70.
29. Brink B, Ten D, Joosten HMLJ, Huis IV. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol*. 1990;11:73-84.
30. Stratton JE, Hutkins RW, Taylor SL. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A review. *J Food Prot*. 1991;54:460-70.
31. Taylor SL. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit Rev Toxicol*. 1986;17:91-128.
32. Clifford MN, Walker R, Wright J, Hardy R, Murray CK. Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis. *J Sci Food Agric*. 1989;47:365-75.
33. Perry KSP. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim Nova*. 2004;27(2):293-300.
34. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 364, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). 1997.
35. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 358, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Prato. 1997.
36. Joosten HMLG. The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Neth Milk Dairy J*. 1988;42(1):25-42.
37. Til HP, Falke HE, Prinsen MK, Willems M.I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem Toxicol*. 1997;35:337-48.
38. Hernandez-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogues MT, Marine-Font AE, Vidal-Carou MC. Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products. *J Agric Food Chem*. 1997;45:2098-102.
39. Bardócz S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci Technol*. 1995;6(10):341-6.