

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial**

**Dissertação**

**MICROBIOTA E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS NA CARNE MATURADA DE BOVINOS DE CORTE, COM E SEM ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA CARÇAÇA**

**RENATA SCHMIDT FILGUERAS**

**Pelotas, 2007.**

RENATA SCHMIDT FILGUERAS

MICROBIOTA E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS NA CARNE MATURADA DE BOVINOS DE CORTE, COM E SEM ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA CARÇAÇA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal e Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Germano Jorge Dorneles Soares

Co-Orientadores: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Abreu Glória  
Prof. Dr. Celso Medina Fagundes

Pelotas, 2007.

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA FONTE:  
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

S729u Filgueras, Renata Schmidt

Microbiota e teores de aminos bioativas na carne maturada de bovinos de corte com e sem estimulação elétrica da carcaça / Renata Schmidt Filgueiras. - Pelotas, 2007.  
60f. : il.

Dissertação ( Mestrado ) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2007, Germano Jorge Dorneles Soares, Orientador; co-orientador Maria Beatriz Abreu Glória e Celso Medina fagundes.

1. Carne bovina maturada 2. Aminos biogênica 3. Bactérias lácticas 4. Baixa voltagem 5. Estimulação elétrica I Soares, Germano Jorge Dorneles (orientador) II .Título.

CDD 664.9

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Celso Medina Fagundes - FAEM - UFPEL

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Osório - FAEM – UFPEL

Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Krolow - EMBRAPA

Prof. Dr. Cláudio Rafael Kuhn - CEFET - BG

*Dedico este trabalho à  
Universidade Federal e cidade  
de Pelotas, espaços ímpares,  
congregadores de seres e  
saberes.*

## RESUMO

FILGUERAS, Renata S. Microbiota e teores de aminos bioativas na carne maturada de bovinos de corte, com e sem estimulação elétrica da carcaça. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Aminas bioativas são bases orgânicas de baixo peso molecular encontradas em uma gama de alimentos de origem animal e vegetal e estão frequentemente envolvidas no desenvolvimento e potencialização de patologias humanas importantes, como desordens neurológicas, doenças gastrointestinais, hipo e hipertensão, respostas imunes anormais e câncer. O processo de maturação da carne bovina favorece o crescimento de bactérias anaeróbias facultativas, sobretudo bactérias lácticas, as quais contribuem para a produção e aumento da concentração de aminos em alimentos. Amostras de contra-filé (músculo *Longissimus Dorsi*) de 12 carcaças de bovinos Red Angus e mestiços zebuínos, abatidos com aproximadamente 350kg e 3 anos de idade, com e sem estimulação elétrica da carcaça (estimulação de baixa voltagem), foram acondicionadas a vácuo e maturadas sob refrigeração por até 56 dias ( $-1,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Aos 0, 7, 14, 35 e 56 dias de maturação foram efetuadas as determinações de aminos bioativas (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, triptamina, feniletilamina, espermina e espermidina), contagem total de bactérias lácticas e contagem padrão em placa de microrganismos aeróbios. As contagens de bactérias lácticas e microrganismos aeróbios correlacionaram-se positivamente com o tempo de maturação, atingindo ao final do período 6,67 e 7,6 LogUFC.g<sup>-1</sup> para microrganismos aeróbios viáveis e bactérias lácticas, respectivamente. Entre os diferentes tratamentos estudados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos teores de aminos bioativas e contagens de microrganismos (aeróbios e bactérias lácticas), exceto aos 14 dias, quando os teores de espermina em amostras de carne de animais mestiços foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que em carnes de Red Angus, com e sem estimulação elétrica. Em tratamentos iguais e ao longo do período de armazenamento houve aumento significativo tanto nas contagens de microrganismos aeróbios e bactérias lácticas quanto nos teores totais de aminos bioativas. Esse aumento é particularmente significativo a partir do 35º dia de maturação. Correlações positivas significativas ( $p < 0,001$ ) foram observadas entre contagem de bactérias lácticas, total de aminos bioativas e tempo de maturação em amostras de carne de carcaças estimuladas eletricamente, tanto de animais Red Angus quanto mestiços zebuínos, o que não ocorreu nas carnes de carcaças que não sofreram estimulação elétrica *post-mortem*.

Palavras-chave: Carne bovina maturada. Aminos biogênicas. Poliaminas. Bactérias lácticas. Estimulação de baixa voltagem.

## ABSTRACT

FILGUERAS, Renata S. Tenor of microorganisms and bioactive aminas in matured bovine meat of *Red Angus* animals and mixed breeds, with and without electric stimulation of the carcass. 2007. Dissertation (Master's Degree in Science and Agroindustrial Technology) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Samples of contra-filet (muscle *Longissimus Dorsi*) of 12 carcasses of *Red Angus* bovines and zebuines mixed breeds, knocked down with approximately 350 kg and 3 years of age, treated with or without electric stimulation of low voltage in the period *post-mortem* were vacuum-packed and stored under refrigeration ( $-1,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) for until 56 days. After 0, 7, 14, 35 and 56 days of maturation were made the determination of bioactive amines (putrescine, cadaverine, histamine, tiramine, serotonin, agmatine, tryptamine, feniletilamine, espermine and espermidine), standard count in plaque of aerobes microorganisms and total count of lactic bacteria. The count of microorganisms of the samples has correlated positively during the storage time ( $r>0,91$  e  $p<0,001$ ), achieving maximum scores of 6,67 and 7,6 LogUFC.g<sup>-1</sup> for viable microorganisms aerobes and lactic bacteria, respectively, after 56 days. The breed variation of the animals and the electric stimulation of the carcass have not demonstrated to cause significant effects in the microbionics and tenor of bioactive amines during the period observed, except as for the tenors of espermine, after 14 days, when a bigger concentration of such polyamine was detected in the mixed breed meat. Significant positive correlations ( $p<0,001$ ), were also observed between the lactic bacteria count and the total of bioactive amines in the meat of carcass electrically stimulated, in both *Red Angus* and zebuines mixed breeds, which it did not occur in the meat of carcass without post-mortem electric stimulation.

**Key Words:** Matured bovine meat. Biogenic amines. Polyamines. Lactic Bacteria. Low-voltage stimulation.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor *Germano Jorge Dorneles Soares*, pela contribuição dada à minha iniciação científica, orientação, convivência e amizade.

À professora *Maria Beatriz Abreu Glória*, pela co-orientação, auxílio na realização das análises de amins e interpretação dos resultados.

Aos professores e colegas do *DCTA*, pelo convívio e ensinamentos, em especial aos professores *Celso Medina Fagundes* e *Wladimir Padilha da Silva*, pelo apoio durante o período.

Aos colegas do *MICROBIAL*, pela gentileza em disponibilizar seu espaço e pelas contribuições dadas durante a realização das análises microbiológicas.

Ao grupo de pesquisa do *Centro de Genômica e Fitomelhoramento (FAEM/UFPEL)* que abriu as portas para que eu pudesse executar parte das atividades experimentais.

Aos profissionais do *Frigorífico Mercosul*, em especial ao *Dr. Armando Brasil Salles* e *Fabiana Gonçalves da Rosa*, pela receptividade, generosidade e disponibilidade. Sua parceria foi fundamental para o sucesso desse estudo.

Ao amigo *Cláudio Rafael Kuhn*, por quem eu alargo grande carinho e consideração, pelo conhecimento científico oportunizado através da sua pesquisa de doutorado e pela confiança depositada em mim durante o tempo em que trabalhamos juntos.

Às amigas *Lisiane Torres*, *Heloísa Antunes*, *Priscila Vasconcellos*, *Cristina*

*Costa e Paula Vergara*. Grandes mulheres que fazem do *Laboratório de Análises Bioquímicas e Bromatológicas (LABB)* não apenas um bom ambiente de trabalho, mas um espaço de respeito, bem-estar e cumplicidade.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pelo financiamento da bolsa de estudos.

À minha grande família, *pais e irmãos*, pelos valores transmitidos, pela integridade de caráter e demonstrações de respeito e confiança. Personalidades ricas, lindas e fortes que acompanharam e me apoiaram em mais essa importante etapa. Preenchem minha vida com afeto, companheirismo, cumplicidade, alegria e suaves melodias.

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Interação entre as variáveis independentes: subespécie bovina, estímulo elétrico da carcaça e tempo de armazenamento .....	35
Tabela 2 -	Médias e erros-padrão das contagens de microrganismos em carne bovina maturada durante a maturação (acondicionamento a vácuo e temperatura de $-1,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) .....	41
Tabela 3 -	Médias e erros-padrão dos conteúdos de aminas bioativas em carne bovina armazenada sob refrigeração ( $-1,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) durante 56 dias de maturação .....	46
Tabela 4 -	Coefficientes de correlação de Pearson entre contagens de microrganismos e teores totais de aminas (biogênicas e bioativas) ..	50
Tabela 5 -	Índices de qualidade obtidos para carne bovina maturada .....	52

## SUMÁRIO

Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Agradecimentos .....	vii
Lista de tabelas .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1. Organização e estrutura do tecido muscular.....	14
2.2. Maturação da carne .....	16
2.1.1. Bioquímica da carne .....	18
2.1.2. Maturação, genótipo bovino e aminas biogênicas .....	19
2.1.3. Maturação, estimulação elétrica da carcaça e aminas biogênicas .....	22
2.3. Aminas bioativas: poliaminas e aminas biogênicas .....	23
2.3.1. Definição e processo de formação .....	23
2.3.2. Aminas em carnes e produtos cárneos .....	27
2.3.2. Aspectos clínicos e toxicologia .....	28
2.3.3. Aminas como indicadoras de qualidade de carnes .....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1. Material .....	34
3.2. Métodos .....	34
3.2.1. Delineamento experimental .....	34
3.2.2. Processamento de amostras .....	35
3.2.3. Determinações microbiológicas .....	36
3.2.4. Determinação de aminas bioativas .....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1. Contagens de microrganismos aeróbios e bactérias lácticas .....	39
4.2. Teores de aminas bioativas na carne fresca (tempo 0) .....	44
4.3. Teores de aminas bioativas na carne maturada .....	47
4.4. Correlações e indicadores de qualidade da carne bovina .....	49
5. CONCLUSÕES .....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

A textura da carne é uma característica importante para a decisão de compra do produto e satisfação dos consumidores e está diretamente relacionada à uma complexa variedade de fatores que envolvem espécie, sexo, idade, tipo de alimentação, função do músculo e sua composição química, bem como com fenômenos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem momentos antes do sacrifício do animal, durante e após a instalação do *rigor mortis* (HEINEMANN e PINTO, 2003).

A heterogeneidade em relação à textura das carnes produzidas no Brasil representa um problema para a indústria, pois a falta de critério quanto à idade dos animais abatidos, estado nutricional dos bovinos, manejo pré e pós-abate e o fato dos rebanhos serem constituídos predominantemente por raças zebuínas ou cruzas impedem a padronização dos cortes e causam descontentamento aos consumidores.

Uma das alternativas tecnológicas mais difundidas e utilizadas pela indústria nacional para melhorar e uniformizar a qualidade das carnes é a maturação de cortes acondicionados a vácuo e mantidos sob refrigeração (ALVES, GOES e MANCIO, 2005). Esse processo, empregado também em diversos outros países, possibilita a ação de proteases endógenas e retarda o crescimento de microrganismos potencialmente deteriorativos, como *Pseudomonas* spp., por exemplo, amaciando e aumentando a vida-de-prateleira do produto, além de facilitar a comercialização e distribuição de carnes refrigeradas entre regiões distantes.

Contudo, o processo de maturação industrial da carne bovina favorece o crescimento de bactérias lácticas, microrganismos que através de seu aparato enzimático específico, agem sobre os aminoácidos livres e formam as chamadas aminas biogênicas (HOLLEY e GILL, 2006). Além das aminas biogênicas, formadas pela ação de microrganismos, as carnes são também fontes de outras aminas importantes, as

poliaminas, substâncias inerentes aos tecidos vivos, com importante papel no crescimento e diferenciação celular que, quando ingeridas e absorvidas em grandes quantidades pelo organismo de homens e animais, podem contribuir para o processo de desenvolvimento e multiplicação de células tumorais (KALAC *et al.*, 2005). O conjunto de amins biogênicas e poliaminas naturais é também denominado amins bioativas. São consideradas substâncias potencialmente tóxicas, freqüentemente envolvidas em várias patologias humanas, como desordens neurológicas, doenças gastrintestinais, hipo e hipertensão, respostas imunes anormais, câncer e etc (SHALABY, 1996; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004; ÖNAL, 2007).

No Brasil, são poucos os estudos sobre o perfil de amins biologicamente ativas em alimentos de origem animal. Investigações em carne de pescado, ovos, carne de frango e alimentos fermentados, como leite acidificados de culturas lácteas e salames, já foram documentados (SILVA e GLÓRIA, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; LAPA-GUIMARÃES, 2005; CACCIOPPOLI *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2006). Porém, estudos sobre a formação de amins em alimentos *in natura*, como carne bovina, avaliando o efeito do processamento tecnológico e as peculiaridades inerentes à espécie animal sobre as características de formação desses compostos, ainda não foram documentados.

Não é apenas no Brasil que existe escassez de dados nesse sentido. Também na literatura internacional as produções científicas sobre a avaliação de amins bioativas em carnes bovinas, são raras. A maioria dos estudos refere-se às carnes frescas acondicionadas em ambiente aeróbico, enfatizando algumas amins específicas ou somente as poliaminas, por exemplo, ou mesmo às carnes maturadas, mas aquelas adquiridas em estabelecimentos comerciais, como açougues e casas de carnes, onde não há conhecimento e domínio das condições de abate e processamento.

As características genéticas dos animais, o emprego de estimulação elétrica da carcaça, bem como o nível de contaminação da matéria-prima, influenciam a velocidade de maturação, pois interferem na velocidade de proteólise, determinando, assim, a qualidade e quantidade de aminoácidos livres disponíveis que serão utilizados como substrato para o crescimento microbiano. Conseqüentemente, esses fatores influenciam também a velocidade de formação de produtos da decomposição da carne, como as amins, dentre outras substâncias. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da variação racial dos animais e da estimulação elétrica da carcaça na contagem

de microrganismos aeróbios e bactérias lácticas e nos teores de aminos bioativas da carne bovina embalada a vácuo ao longo de 56 dias de maturação ( $-1,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Organização e estrutura do tecido muscular**

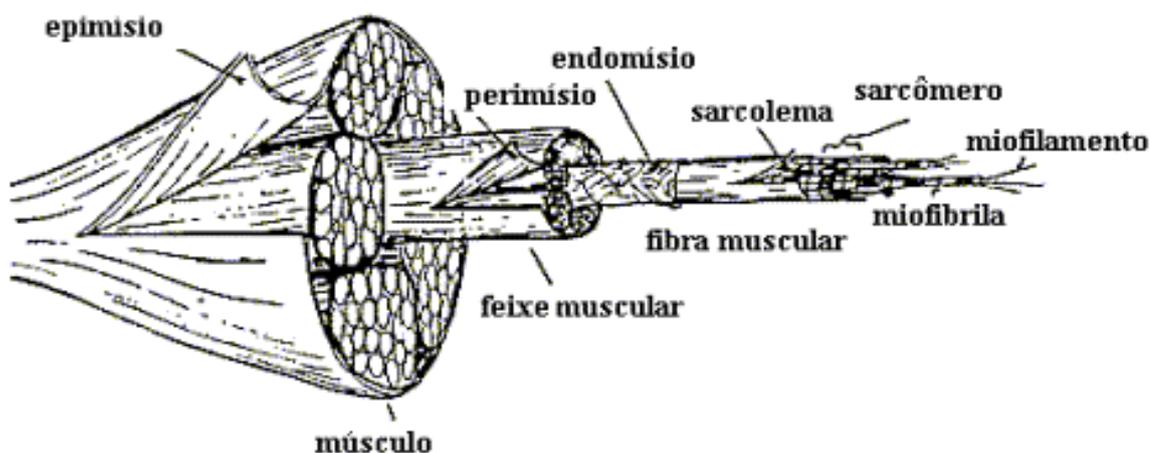
O músculo esquelético é uma unidade altamente organizada que governa os movimentos do corpo por intermédio de ligamentos (tendões) aderidos às estruturas ósseas. Mais de 600 músculos esqueléticos distintos (de tamanho e tipo diferentes) constituem cerca de 30 a 40 % do peso da carcaça de um mamífero (LAWRIE, 2005). Por serem funcionais, os músculos esqueléticos necessitam de uma estrutura de sustentação (tecido conectivo e esqueleto), um sistema de coordenação (sistema nervoso) e de reservas energéticas (contidas no tecido adiposo e no músculo).

Como mostra a figura 1, os músculos esqueléticos são essencialmente constituídos de fibras contráteis divididas em feixes. O conjunto do sistema fibrilar é sustentado por uma trama conjuntiva, composta principalmente de colágeno (70 a 80 %), elastina e queratina, que representam os três níveis de estrutura. O músculo é revestido, na sua totalidade, de uma membrana conjuntiva chamada epimísio. Depois, a partir da face interna do epimísio, o perimísio divide as fibras musculares em feixes. O epimísio e o perimísio se reagrupam na extremidade do músculo para formar o tendão. Cada fibra muscular é também recoberta por um estojo flexível: o endomísio. O endomísio comporta três membranas: o sarcolema, cercado diretamente a fibra muscular e a membrana basal seguida pelo endomísio propriamente dito (ROÇA, 2001; ALVES, GOES e MANCIO, 2005).

A fibra muscular é uma célula gigante de 10 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro e seu comprimento pode variar de alguns milímetros até várias dezenas de centímetros. Consiste-se de um sincício plurinucleado, resultado da associação de 1000 a 2000

corpos filamentosos: as miofibrilas. As miofibrilas, cujos diâmetros estão entre 1 e 2  $\mu\text{m}$ , são orientadas paralelamente ao eixo da fibra e apresenta uma estriação transversal nas quais se alternam zonas escuras e zonas claras. As miofibrilas são formadas principalmente pela alternância de miofilamentos finos e espessos que ocupam de 80 a 87 % do volume da célula muscular (EISENBERG, 1983). A organização dos miofilamentos define a unidade contrátil fundamental das miofibrilas chamada de sarcômero. O sarcômero é delimitado, transversalmente ao eixo da miofibrila, por estrias, chamadas de bandas Z.

Figura 1. Desenho esquemático mostrando a estrutura do músculo estriado esquelético. Fonte: adaptado de EMBRAPA (2005).



O miofilamento espesso, composto principalmente por miosina, está localizado na zona central do sarcômero, a banda A. Ele mede cerca de 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e apresenta um diâmetro compreendido entre 12 e 16 nm. Ele contém de 200 a 400 moléculas de miosina. O miofilamento fino, principalmente composto de actina sob forma polimerizada, se estende sobre a totalidade da banda I do sarcômero e penetra entre os filamentos espessos na banda A. O miofilamento fino contém cerca de 400 moléculas de actina. Seu comprimento e seu diâmetro são respectivamente de 1  $\mu\text{m}$  e 8nm (ROÇA, 2001; ALVES, GOES e MANCIO, 2005; LAWRIE).

## 2.2. Maturação da carne

A maturação é um processo tecnológico industrial conhecido e utilizado há séculos cuja finalidade é melhorar a maciez da carne e garantir sua uniformidade (ALVES, GOES e MANCIO, 2005). Sabe-se que o armazenamento de carnes entre temperaturas de  $-1,5$  e  $2^{\circ}\text{C}$ , por períodos que variam entre 7 e 21 dias, contribui para o aumento de sua maciez. Entretanto, apenas recentemente estão sendo cientificamente esclarecidas as transformações que ocorrem no tecido muscular durante este processo (LAWRENCE *et al.*, 2006).

Segundo Lawrie (2005), até a década de 70 o processo de maturação era realizado através da simples manutenção das carcaças, quartos ou cortes em um ambiente refrigerado e com umidade relativa do ar controlada. Neste tipo de processo, também denominado de *processo tradicional de maturação*, a carne não possuía qualquer tipo de proteção externa ou embalagem, estando sujeita a perdas por gotejamento, evaporação e putrefação das peças. Os problemas da perda por gotejamento e evaporação eram controlados com o uso de filmes permeáveis a gás na superfície das carcaças, mas o aumento da umidade superficial aumentava muito o risco de crescimento microbiano e deterioração precoce.

O desenvolvimento das embalagens a vácuo possibilitou um melhor aproveitamento da carne, pois após a desossa os cortes passaram a ser embalados e submetidos ao processo de vácuo industrial para então serem maturados. Embora as características sensoriais desenvolvidas neste processo sejam similares às aquelas desenvolvidas no processo tradicional de maturação, a embalagem a vácuo trouxe redução nos custos de transporte e armazenamento, diminuição dos riscos de contaminação, limitação no crescimento de microrganismos, ausência de controle de umidade relativa do ar no ambiente de maturação, redução nas quebras por perda de peso e aumento da vida-de-prateleira (PRATES, 2000).

A ausência de oxigênio no interior da embalagem facilita a proliferação de bactérias lácticas naturalmente presentes na carne bovina fresca, as quais produzem ácido láctico durante sua multiplicação e tornam inóspito o ambiente para o desenvolvimento de microrganismos potencialmente deteriorativos, contribuindo para o aumento da vida-de-prateleira da carne bovina, o que representa uma grande vantagem para a indústria e para o consumidor (JONES, 2004; HOLLEY e GILL, 2006). Apesar

disso, as bactérias láticas são umas das principais responsáveis pela formação de aminas biogênicas em alimentos, substâncias que muitas vezes não podem ser percebidas sensorialmente, pois não causam alterações perceptíveis no sabor, odor, aroma e aparência visual, mas que são indesejáveis do ponto de vista nutricional, devido ao seu potencial tóxico e sua capacidade de interferir no metabolismo humano e animal causando efeitos deletérios à saúde (SHALABY, 1996; JONES, 2004; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004).

Embora ainda sejam ínfimos os estudos documentados na literatura sobre a magnitude da formação de aminas bioativas em carne bovina *in natura* no decorrer do processo de maturação industrial, existe uma vasta referência sobre a microbiota desenvolvida nesse tipo de alimento durante longos períodos de armazenamento refrigerado (VELD, 1996; MONTEL, MASSON e TALON, 1998; GILL e BADONI, 2002; JONES, 2004; HOLLEY e GILL, 2006), todos unânimes em afirmar a predominância de espécies de bactérias láticas sobre outras.

O grupo das bactérias láticas inclui seis gêneros de bactérias produtoras de ácido lático, gram-positivas, catalase-negativas e microaerofílicas, são eles: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (SAMELIS, KAKOURI e REMENTZIS, 2000; JONES, 2004; VERMEIREN, DEVLIEGHERE E DEBEVERE, 2004). Sabe-se que todas as espécies de bactérias láticas produzem ácidos orgânicos durante o processo de multiplicação (GILL, 1996; VELD, 1996; JONES, 2004), o que provoca a queda do pH e dificulta o crescimento de outros grupos de microrganismos, mas estudos mais recentes têm demonstrado que além de ácidos orgânicos algumas espécies láticas podem produzir também bacteriocinas, metabólicos ativos que agem sobre microrganismos específicos, aumentando ainda mais a capacidade de essas bactérias inibirem o crescimento de microrganismos deteriorativos e indesejáveis (GILL e BADONI, 2002; JONES, 2004). Embora não haja nenhuma evidência científica de que as bacteriocinas estejam diretamente envolvidas no processo de formação de aminas, sua produção e presença em alimentos indicam qual (is) espécies de bactérias estão predominando no meio, o que, por conseguinte, pode sugerir quais tipos de aminas bioativas podem ser encontradas em maiores quantidades, uma vez que estudos têm demonstrado que conhecendo-se o tipo de microrganismo predominante é possível fazer uma previsão dos tipos de aminas produzidas (SILLA-SANTOS, 1996; SHALABY, 1996).

### 2.2.1. Bioquímica da maturação

A maturação é um processo onde ocorrem alterações significativas na microestrutura do músculo e nas suas características de qualidade, especialmente na textura e capacidade de retenção de água (PALKA, 2003).

Tanto as proteínas do tecido conjuntivo quanto as proteínas miofibrilares são importantes constituintes do músculo e suas características determinam o grau de maciez do corte cárneo (ALVES, GOES e MANCIO, 2005; LAWRIE, 2005). Como já foi dito anteriormente, a fibra do músculo esquelético é composta por miofibrilas, cuja unidade estrutural é o sarcômero. Distribuídos dentro do sarcômero, ou seja, distância entre duas linhas transversais e escuras, denominadas linhas Z, estão os filamentos grossos, constituídos principalmente de miosina e proteínas C, M, I e F, e os filamentos finos, compostos por actina, tropomiosina, troponina e  $\beta$ -actinina. Nas linhas Z estão localizadas outras proteínas, como a  $\alpha$ -actinina, desmina, filamina, vimetina e sinemina. A nebulina é encontrada na região da banda I e a titina está distribuída ao longo dos filamentos grossos e finos (ALVES, GOES e MANCIO, 2005).

Apesar dos processos bioquímicos da maturação não serem ainda compreendidos em sua totalidade, sabe-se que a atividade de enzimas proteolíticas endógenas está diretamente envolvida no processo de amaciamento (TSITSILONIS *et al.*, 2002). A resolução do *rigor-mortis* representa a primeira etapa do amaciamento da carne. O processo é iniciado através da atividade das enzimas pertencentes ao sistema das *calpaínas*, originalmente conhecido por sistema CAF, ou seja, sistema de enzimas fatoradas pelos íons cálcio. Desde a purificação da primeira calpaína, em 1976, acumulam-se evidências experimentais de que o sistema proteolítico das calpaínas desempenha papel fundamental na degradação de algumas proteínas miofibrilares (ILIAN, BEKHIT e BICKERSTAFFE, 2004), embora essa ação não ocorra exatamente sobre a actina e a miosina. Em síntese, o sistema das calpaínas é formado de duas enzimas proteolíticas, a  $\mu$ -calpaína e a m-calpaína, que também apresentam propriedade de autólise, atuando sobre si mesmas em um mecanismo ainda desconhecido, inibindo a degradação excessiva das proteínas miofibrilares (KUBOTA, OLIVO e SHIMOKOMAKI, 1993; ROÇA, 2001; ALVES, GOES e MANCIO, 2005).

A  $\mu$ -calpaína e a m-calpaína não atuam diretamente sobre a miosina e a actina, porém degradam outras proteínas localizadas na região do disco Z. É nesta região que

ocorrem as principais alterações estruturais durante o processo de maturação, como a hidrólises das proteínas desmina, titina, nebulina, tropomiosina, troponina e proteína C (KUBOTA, OLIVO e SHIMOKOMAKI, 1993). O complexo de enzimas do sistema das calpaínas é constituído também pelas *calpastatins*, que são outro grupo de enzimas com propriedade de inibir a atividade das calpaínas e, assim, impedem a proteólise das proteínas miofibrilares, citadas acima, prejudicando o desenvolvimento do processo de maturação.

Dentro de outra categoria de enzimas proteolíticas encontram-se as catepsinas, as quais estão implicadas na degradação da estrutura miofibrilar e do colágeno. As catepsinas B e D degradam a actina e a miosina nativa, enquanto que as catepsinas L degradam o colágeno. A atividade óptima das catepsinas ocorre em pH ácido, ao redor de 5,4, conferindo pouca influência no processo de maturação industrial de carnes, já que o potencial hidrogeniônico desses produtos dificilmente atinge valor tão baixo (ROÇA, 2001; ALVES, GOES e MANCIO, 2005).

Resumidamente, as principais alterações ocorridas no tecido muscular durante o processo de maturação, que resultam em uma perda da integridade estrutural e, conseqüentemente, uma melhora na maciez da carne são: 1. enfraquecimento ou degradação do disco Z; 2. degradação da desmina; 3. degradação da titina; 4. degradação da nebulina; 5. desaparecimento da troponina T e aparecimento simultâneo de polipeptídios com peso molecular entre 28 e 32 kDa e um polipeptídio de 95 kDa. A degradação das proteínas contráteis mais abundantes do tecido muscular, actina e miosina, bem como do colágeno, não é representativa durante o processo de maturação da carne, ao contrário do que se imaginava antigamente (KOOHARAIE, 1994; ROÇA, 2001; ALVES, GOES e MANCIO, 2005).

### **2.2.2. Maturação, genótipo bovino e aminas bioativas**

A fase de maturação conduz a um aumento progressivo da maciez da carne, devido às modificações que afetam principalmente o compartimento miofibrilar. O colágeno não sofre modificações importantes durante a fase de maturação, enquanto que a estrutura miofibrilar é profundamente modificada sob a ação de enzimas proteolíticas endógenas (VALIN, 1988; OUALI, 1991; LAWRIE, 2005). Como se trata de

um fenômeno enzimático, a velocidade de maturação depende da temperatura, mas também do pH do músculo.

Diversos estudos reportam que a velocidade de maturação aumenta com a atividade ATPásica miofibrilar e com o caráter glicolítico dos músculos (OUALI, 1991), em razão da taxa de calpaína mais elevada nos músculos de glicólise rápida que naqueles de oxidação lenta (OUALI e TALMANT, 1990), mas aumenta igualmente em função de um aumento da pressão osmótica, que favorece a dissociação do complexo actomiosina.

O processo de maturação pode ser influenciado por algumas variáveis, tais como espécie e raça do animal, velocidade de glicólise *ante-mortem* e *post-mortem*, quantidade e grau de solubilidade do colágeno, comprimento das miofibrilas, força iônica e grau de degradação das proteínas miofibrilares (FELÍCIO, 1996).

Sabe-se que a relação entre as enzimas endógenas musculares calpastatina/calpaína é um fator importante para se avaliar a maciez da carne (ROÇA, 2001). Para exemplificar, os zebuínos possuem uma relação calpastatina/calpaína maior do que os taurinos, o que explica a maior dureza da carne zebuína em relação à carne de bovinos europeus (HEINEMANN e PINTO, 2003; JATURASITHA *et al.*, 2004), mesmo carnes maturadas.

Shakelford, Wheeler e Koohmaraie (1997 apud MONSÓN, SAÑUDO e SIERRA, 2004), também observaram que o desenvolvimento do processo de maturação depende do potencial de maciez da carne de cada raça. Na literatura encontram-se trabalhos mostrando que estando todas as outras variáveis sob controle, as variações genéticas, principalmente entre raças, são suficientes para provocar diferenças significativas quanto à textura da carne fresca (JATURASITHA *et al.*, 2004; SAÑUDO *et al.*, 2004).

A pior textura da carne de *Bos indicus* (bovinos de raças zebuínas) em relação à carne de *Bos taurus* (bovinos de raças européias), tem sido bem documentada. No ano de 1992, Cundiff, citado por Felício (1994), apresentou resultados do "Germoplasm Evaluation Program" demonstrando que a carne da progênie de touros *Bos indicus* (das raças Brahman, Sahiwal e Nelore) é menos macia do que a da progênie de touros *Bos taurus* (Hereford e Angus). A média dos mestiços Nelore, por exemplo, foi até 25% mais dura (força de cisalhamento no aparelho Warner-Bratzler) do que a média dos mestiços Hereford-Angus, sendo que todos foram abatidos com idade média de 417 dias.

Segundo Sañudo *et al.* (2004), a carne de *Bos taurus* já estaria passando por um processo natural de tenderização nas 24 primeiras horas *post-mortem*, enquanto que a de animais mestiços zebuínos passaria por um processo mais ou menos intenso de tenderização somente nas semanas seguintes.

Embora se saiba que no decorrer do processo de maturação ocorra o amaciamento natural dos cortes de carne, tornando o produto mais homogêneo quanto à maciez e diminuindo as diferenças qualitativas impressas pelo genótipo *Bos taurus* ou *Bos indicus*, a velocidade de proteólise e o grau de maciez desenvolvido durante o processo de maturação não ocorre da mesma forma em carnes de bovinos de genótipos distintos, principalmente no início do processo. Em um estudo realizado por Rubensam, Felício e Termignoni (1998), na Região Sul do Brasil, que determinou a atividade da calpastatina e a textura de amostras de carne (músculo *L. dorsi*) de bovinos da raça Hereford (HH) e cruzamentos Hereford x Nelore (3/4H1/4N e 5/8H3/8N) no decorrer do processo de maturação, foi observado que a carne dos novilhos mestiços 5/8H3/4N apresentou, no 1º dia *post-mortem*, maior atividade de calpastatina e força de cisalhamento do que a carne de novilhos europeus puros HH e mestiços 3/4H1/4N. Após 10 dias, porém, houve diferença não significativa ( $p > 0,05$ ) entre a atividade da calpastatina do grupo 5/8H3/8N e os demais, e diferença significativa entre HH e 5/8H3/8N para força de cisalhamento.

Resumindo, animais de diferentes genótipos bovinos apresentam, endogenamente, diferentes relações entre as enzimas musculares calpastatina e calpaína, o que causa diferença na velocidade de maturação desses cortes de carne. Se entre dois tipos de carne um matura mais rapidamente que o outro, pois possui menor relação calpastatina/calpaínas, esses cortes que maturam mais rapidamente terão suas proteínas degradadas mais rapidamente. Nesse sentido, presume-se que a velocidade de formação de produtos secundários de menor peso molecular, como peptídeos e aminoácidos livres, decorrentes do processo de proteólise, também será maior nessas carnes. Se os peptídeos e aminoácidos são frequentemente utilizados como substrato pela maioria das espécies de microrganismos presentes na carne e, ao mesmo tempo, muitas dessas espécies podem formar aminas bioativas a partir desses elementos, é provável que a velocidade de maturação influencie a velocidade de aparecimento de aminas biogênicas, porém não existe qualquer estudo nesse sentido, abrindo oportunidade para investigações apuradas e inéditas.

### **2.2.3. Maturação, estimulação elétrica da carcaça e aminas bioativas**

Hwang, Deving e Hopkins (2003) afirmam que o processo de maturação da carne pode ser acelerado com o emprego de estimulação elétrica da carcaça. Os primeiros relatos do emprego da estimulação elétrica em carnes são decorrentes de Benjamin Franklin, por volta de 1749, visando o amaciamento de carne de perus. Sua utilização com o objetivo de acelerar o *rigor mortis*, todavia, se deve a Harshan e Deatherage, em 1951, nos Estados Unidos. Posteriormente, na Nova Zelândia, objetivando resolver o problema do endurecimento das carcaças de ovinos que eram exportadas para a Inglaterra, passou-se a utilizar a técnica da estimulação elétrica de carcaças.

Os riscos da utilização da alta voltagem dentro da sala de matança fizeram com que os matadouros-frigoríficos optassem por estímulo elétrico de baixa voltagem: 70 V, com frequência de pulso de 13 a 15 milésimos por segundo, durante dois minutos. Embora a baixa voltagem não contribua de forma tão eficiente na melhoria da maciez quanto a alta voltagem, as fases da glicólise e o *rigor mortis* se aceleram extraordinariamente, aumentando a velocidade de maturação, além de contribuir para a eliminação do sangue durante a sangria, a melhora da cor e o favorecimento da desossa a quente (LAWRIE, 2005). O resultado é a aceleração da hidrólise do ATP, causando a queda do pH enquanto a carcaça ainda se mantém a altas temperaturas, com a formação de ácido láctico, fosfato inorgânico e calor. O pH baixo em temperaturas altas provoca a ruptura das membranas lisossômicas e a liberação de enzimas proteolíticas que, em associação com a atividade proteolítica de microrganismos presentes, determina o surgimento de aminoácidos e substâncias menores que, por sua vez, podem atuar como substrato para bactérias e colaborar para o surgimento precoce de substâncias indesejáveis, como amônia, compostos voláteis e aminas biogênicas, por exemplo. Embora Lin *et al.* (1984 apud OLIVEIRA, 2003), ao estudarem o efeito da estimulação elétrica da carcaça (380V durante 2 minutos) sobre a microbiota da carne bovina desossada a quente não tenham encontrado diferenças significativas nas contagem totais de microrganismos, esses autores observaram que a aplicação de estímulo elétrico em microrganismos mantidos em meios de cultura afetava o seu crescimento e determinava a morte ou sobrevivência de espécies de microrganismos importantes em carnes. Dessa forma, assim como na variação genética dos animais, a

estimulação elétrica da carcaça também pode contribuir para o aumento na velocidade de formação de aminas em carne bovina.

## **2.3. Aminas bioativas: poliaminas e aminas biogênicas**

### **2.3.1. Definição e processos de formação**

O conjunto de *poliaminas* e *aminas biogênicas*, também denominado *aminas bioativas* (SILVA e GLÓRIA, 2002), são bases orgânicas de baixo peso molecular com estrutura alifática, aromática ou heterocíclica (Fig.2), as quais podem ser encontradas em uma gama de alimentos, tais como pescados, queijos, cervejas, carnes e outros produtos fermentados (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2003; ÖNAL, 2007).

Em alimentos, as aminas bioativas mais importantes são as monoaminas tiramina e feniletilamina, as diaminas cadaverina, putrescina, histamina e triptamina e as poliaminas agmatina, espermidina e espermina. Embora a espermidina e a espermina estejam frequentemente incluídas entre as aminas biogênicas, Bardócz (1995) faz uma distinção entre aminas biogênicas e poliaminas naturais, em função do processo de síntese. Segundo esse autor, são consideradas aminas biogênicas somente aquelas formadas por reações de descarboxilação não específicas (ou seja, por ação de microrganismos), enquanto que as poliaminas naturais são aquelas formadas naturalmente na maioria dos tecidos vivos, onde são responsáveis por atividades metabólicas específicas e indispensáveis aos processos de crescimento, regeneração e diferenciação celular dos tecidos.

De acordo com esta classificação a espermina e a espermidina não são consideradas aminas biogênicas (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997; KALAC e KRAUSOVÁ, 2005) e, como são duas aminas formadas a partir da putrescina, pela adição de um ou dois grupos aminopropil, respectivamente, a putrescina também pode estar incluída no grupo das poliaminas. A cadaverina e a agmatina, exclusivamente em se tratando de plantas e microrganismos, segundo a classificação de Bardócz (1995), podem também ser consideradas poliaminas.

As poliaminas, bem como muitas das aminas biogênicas, não são capazes de causar intoxicações quando ingeridas isoladamente ou em pequenas quantidades. Porém, quando ingeridas em grandes concentrações, ou quando associadas umas às outras, essas aminas podem potencializar efeitos tóxicos individuais ou mesmo exaurir o sistema orgânico natural depurador de aminas, fazendo com que sintomas de intoxicação sejam percebidos. O sistema depurador de aminas está naturalmente presente no organismo humano e animal e impede o acúmulo de aminas no organismo, bem como a manifestações de seus efeitos tóxicos (RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004).

Dentre os papéis fisiológicos, as poliaminas estão envolvidas na transdução sináptica e em praticamente todas as etapas da síntese de DNA, RNA e proteínas. Sendo assim, são substâncias essenciais para o crescimento e proliferação celular (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997; SILVA e GLÓRIA, 2002; KALAC e KRAUSOVÁ, 2005). Além disso, a participação no crescimento e diferenciação celular tem sido de enorme interesse para a ciência, já que as poliaminas, tanto as formadas endogenamente, quanto as ingeridas na dieta, podem estar envolvidas no desenvolvimento de tumores de diversos tipos (KALAC e KRAUSOVÁ, 2005; KALAC *et al.*, 2005).

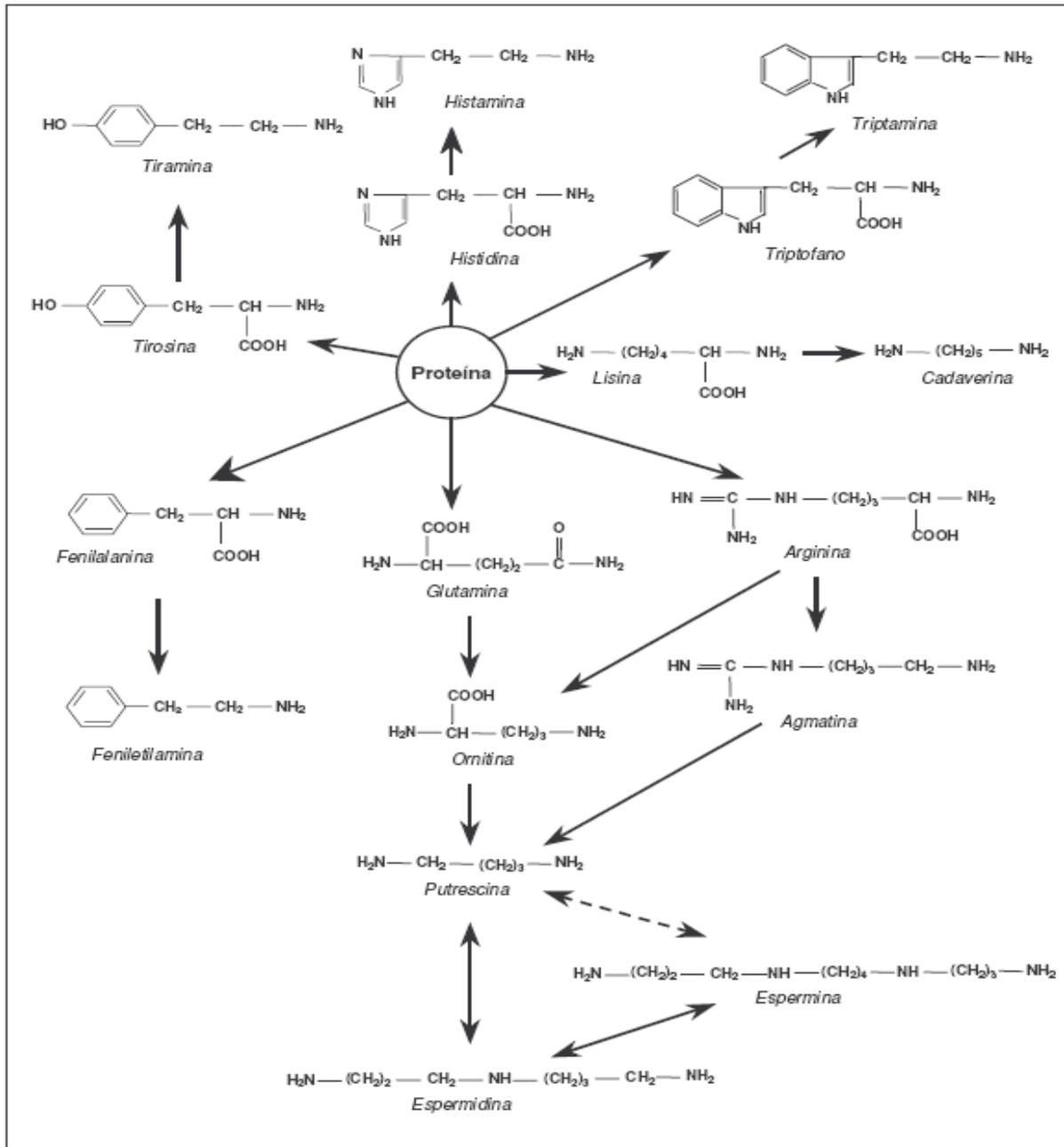


Figura 2. Esquema representativo da origem, formação e estrutura química das poliaminas e aminas biogênicas.

FONTE: LAPA-GUIMARÃES (2005)

As aminas biogênicas, segundo Bardócz (1995), são geradas durante o processo final de quebra de proteínas, por descarboxilação enzimática bacteriana de aminoácidos. Histamina, putrescina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina podem ser formadas durante o armazenamento de carnes frescas ou durante o processamento de produtos derivados. A ingestão de alimentos contendo altos teores

de amins bioativas, principalmente histamina e tiramina, pode causar intoxicações graves e enxaquecas (SILVA e GLÓRIA, 2002; ÖNAL, 2007).

A proteólise autolítica ou bacteriana tem um papel importante na liberação de aminoácidos livres dos tecidos protéicos, os quais podem servir de substrato para reações de descarboxilase (SHALABY, 1996; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Assim, a quantidade e o tipo de amina formada dependerão da composição do alimento, viabilidade dos precursores, ou seja, aminoácidos livres, do tipo de microorganismo presente e do estabelecimento de condições favoráveis para seu crescimento e atividade enzimática (BRINK *et al.*, 1990; SUZZI e GARDINI, 2003). O resultado da descarboxilação é uma amina que, dependendo do peso molecular e da estrutura do aminoácido que a origina, pode ser uma monoamina, diamina ou amina com grupos químicos suplementares. Dessa forma, por exemplo, em músculo de peixes da família *Escombridae*, que contém naturalmente teores mais elevados de histidina, a produção de histidina descarboxilase pode ser induzida e, conseqüentemente, pode ocorrer formação de histamina em grande quantidade (LAPA-GUIMARÃES, 2005; LAPA-GUIMARÃES, FELÍCIO e CONTRERAS, 2005).

Embora a atividade descarboxilase não esteja amplamente distribuída entre as bactérias, espécies de muitos gêneros, tais como *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Streptococcus*, são capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos (SILLA-SANTOS, 1996; SHALABY, 1996; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Microorganismos com atividade descarboxilase podem fazer parte da flora associada ao alimento ou podem ser introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento (BOVER-CID *et al.*, 2006). Em carne bovina fresca sob condições de aerobiose, espécies de *Enterobacteriaceae* têm sido identificadas como principais produtoras de cadaverina, enquanto putrescina está mais associada com altas contagens de microrganismos aeróbios viáveis (RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Bactérias láticas produtoras de amins biogênicas, tais como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* e *Lactobacillus hilgardii*, foram também isoladas de carne e produtos cárneos (MAIJALA *et al.*, 1993), sendo que especialmente em produtos fermentados, como salames, por exemplo, espécies láticas parecem ser as principais produtoras de amins (RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Nem todas

as cepas de bactérias lácticas produzem aminas. Assim, diferenças na concentração e no tipo de bactérias lácticas presentes no alimento podem ajudar a explicar a grande variação de concentrações de aminas biogênicas encontradas em produtos cárneos. Aminas biogênicas são formadas também em carne bovina embalada a vácuo. Smith *et al.* (1993), ao maturar carne bovina por até 120 dias sob temperatura de refrigeração (1°C) detectou níveis significativos de aminas a partir do 20º dia de maturação, demonstrando que mesmo sob refrigeração, ambiente de anaerobiose e apresentando características sensoriais aceitáveis, a carne bovina pode apresentar algum risco aos indivíduos sensíveis às aminas biogênicas.

### **2.3.2. Aminas em carnes e produtos cárneos**

As carnes são componentes importantes da dieta humana, sobretudo nos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos e na maioria dos países da Europa, a carne é o principal item do total de despesa com alimentação (TULEY, 1996 *apud* RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). O fato de o principal componente da dieta de diversos países conter concentrações variadas de substâncias como aminas bioativas, as quais, em determinadas circunstâncias, podem colocar os consumidores em risco de intoxicação, certamente merece consideração especial.

Atualmente os consumidores têm se preocupado mais com a dieta e a saúde, preferindo produtos de alta qualidade, minimamente processados, seguros, etc. Nesse sentido, a indústria de carne está constantemente à procura de tecnologias emergentes que possam conferir essas qualidades no processamento e preservação desses produtos. Porém, essas tecnologias tradicionais e emergentes também podem ocasionar mudanças nas características dos produtos que . Tais modificações podem produzir diferentes compostos, alguns dos quais tóxicos e mutagênicos, com implicações na saúde do consumidor. Existe, todavia, um claro interesse no estudo da toxicidade e mutagenicidade das aminas bioativas, bem como dos fatores determinantes de sua formação no âmbito das condições de processamento e preservação.

Embora existam estudos sobre a produção de aminas bioativas em carnes, esses são geralmente direcionados aos produtos cárneos fermentados, havendo poucos estudos disponíveis direcionados à produção de aminas em outros tipos de produtos, como carnes cozidas e carnes frescas, por exemplo (RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004).

### 2.3.3. Aspectos clínicos e toxicologia

Muitas aminas desempenham um papel importante em funções fisiológicas do homem e de animais, tais como regulação da temperatura corporal, pH e volume do estômago, atividade cerebral, pressão sanguínea, regulação da função dos ácidos nucléicos e síntese de proteínas (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997; SILVA e GLÓRIA, 2002). Em plantas, putrescina, espermidina e espermina estão envolvidas nos processos de divisão celular, floração, desenvolvimento de frutos, resposta ao estresse e senescência (HALÁSZ *et al.*, 1994). De acordo com Kalac *et al.* (2005), a função mais importante das poliaminas é como mensageiras secundárias, mediando a ação de hormônios e fatores de crescimento conhecidos.

Tanto poliaminas, quanto aminas biogênicas são constituintes comuns em muitos alimentos e geralmente não representam qualquer perigo à saúde humana. Em condições normais o organismo humano é capaz de detoxificar rapidamente as aminas absorvidas com os alimentos. As aminas ingeridas são metabolizadas através de reações de acetilação e oxidação mediada por enzimas monoamino-oxidase (MAO; EC 1.4.3.4), diamino-oxidase (DAO; EC 1.4.3.6) e poliamino-oxidase (PAO; EC 1.5.3.11) (SHALABY, 1996; SILLA-SANTOS, 1996; RUIZ-CAPILLAS e COLMENERO, 2004; ÖNAL, 2007). Entretanto, intoxicações por aminas bioativas podem ocorrer quando estas são ingeridas em grande quantidade, quando substâncias potencializadoras, como álcool e drogas, estão presentes ou quando o mecanismo natural individual de catabolismo de uma ou mais aminas é geneticamente deficiente ou está inibido por agentes farmacológicos, como no caso de indivíduos que fazem uso de medicamentos antidepressivos inibidores do sistema das monoaminoxidases (SHALABY, 1996; ÖNAL, 2007).

Geralmente é muito difícil estabelecer os limites de toxicidade das aminas bioativas em um dado produto, pois seus efeitos não dependem apenas da sua presença e quantidade no alimento, mas são influenciados por outros compostos que modulam esses efeitos e pela eficiência do mecanismo de detoxificação de cada indivíduo. Consequentemente, a toxicidade das aminas depende de fatores associados ao próprio alimento (quantidade e qualidade), e de fatores associados aos consumidores (susceptibilidade individual e estado de saúde).

Existe uma grande lacuna no entendimento da importância toxicológica desses compostos, bem como dos mecanismos de sua toxicidade. Diversos estudos de cunho epidemiológico falharam ao estabelecer uma relação clara entre dose e efeito (CLIFFORD *et al.*, 1989). O papel de várias substâncias que aumentam a toxicidade das aminas bioativas e a existência de efeitos sinérgicos entre aminas tem sido demonstrado (LEIGH *et al.*, 2000). Por essa razão, a determinação da concentração de aminas muitas vezes não é suficiente para determinar seu potencial de toxicidade. Recentemente, têm sido desenvolvidos alguns estudos *in vitro* sobre a toxicidade e mutagenicidade das aminas bioativas (BADOLO *et al.*, 1998), nos quais os efeitos foram analisados com base na toxicidade de compostos individualmente.

As aminas predominantes em carnes e produtos cárneos são a tiramina, cadaverina, putrescina e histamina (RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). A concentração dessas aminas tende a variar dependendo do tipo de produto. Algumas aminas, como a histamina, por exemplo, é frequentemente encontrada em menor quantidade em carnes do que em outros produtos, como pescado e laticíneos, e seus efeitos tóxicos parecem ser mais limitados (RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Porém, existem alguns produtos onde isso não é verdadeiro. Observou-se que as concentrações de histamina em produtos cárneos fermentados podem atingir 100 mg.kg<sup>-1</sup> ou mais, como é o caso de salame. Partindo-se do princípio de que essa concentração é considerado o limite para o aparecimento de sintomas de intoxicação em indivíduos saudáveis (BRINK *et al.*, 1990; STRATTON *et al.*, 1991), esses produtos devem ser excluídos da dieta de pessoas predisponentes ou que ingerem drogas inibidoras da MAO, como muitos antidepressivos de uso comum. Em uma análise da concentração de aminas bioativas em produtos processados comercializados, Vidal-Carou *et al.* (1990) encontraram que 63% das amostras de salsichão e 64% das amostras de chouriço (produtos maturados) continham quantidade de tiramina suficiente para intoxicar consumidores de medicamentos inibidores da enzima MAO.

Em função dos alimentos fermentados sofrerem naturalmente a ação de bactérias fermentativas (como bactérias lácticas, por exemplo), as quais, muitas vezes, possuem atividade descarboxilase, esses são alimentos considerados fontes potenciais de aminas. Dentre os produtos cárneos já estudados que apresentam maiores concentrações de aminas biogênicas, os salames, lingüiças e salsichas são, sem dúvida, os alimentos recordistas.

Os efeitos tóxicos das aminas ocorrem geralmente devido a sua ação sobre neurotransmissores no sistema nervoso central ou sobre o sistema vascular. A tiramina, por exemplo, é a amina biogênica mais ativa no aumento da pressão sanguínea; histamina, ao contrário, é um forte vasodilatador e pode causar hipotensão (RUIZ-JIMÉNEZ e LUQUE DE CASTRO, 2006). A espermina possui uma marcante toxicidade renal, afetando a pressão e a coagulação sanguínea, a pulsação e a respiração (KALAC e KRAUSOVÁ, 2005). A rapidez com que os primeiros sintomas ocorrem após o consumo de altas concentrações de histamina e tiramina sugere que parte da absorção ocorra na mucosa oral, desviando-se da atuação do sistema natural de desintoxicação intestinal e hepático (SHALABY, 1996; LAPA-GUIMARÃES, 2005). Os sintomas mais comuns que podem ocorrer após a ingestão de quantidades elevadas de aminas são: náuseas, desordens respiratórias, inchaço, palpitações, cefaléia, eritema da face e pescoço e hiper ou hipotensão (RUIZ-JIMÉNEZ e LUQUE DE CASTRO, 2006).

A histamina possui poderosa atividade biológica, servindo como substância mediadora primária nos sintomas imediatos das reações alérgicas. Seus efeitos são bastante conhecidos, pois na grande maioria dos casos de intoxicação por aminas documentados e notificados, ela está presente em quantidades consideráveis (SILLA-SANTOS, 1996). Vômitos, dores abdominais, eritema da face e dor de cabeça são os seus efeitos mais perceptíveis. Em casos mais graves, sintomas como espasmos brônquicos, sufocação e severo distúrbio respiratório podem também estar presentes (SHALABY, 1996; ÖNAL, 2007). A intoxicação por histamina é também conhecida como *envenenamento por peixes escombrídeos*, devido à freqüente associação da doença com o consumo de peixes da Família *Scombridae*, tais como atum, cavalinha e bonito. Peixes da família *Cupleidae*, como sardinhas, por exemplo, também estão implicados na intoxicação histamínica. Isso se deve ao fato destes peixes possuírem maior teor de histidina em sua composição, o que acaba sendo transformada em histamina na presença de microrganismos descarboxilase positivos (SHALABY, 1996; SILLA-SANTOS, 1996; ÖNAL, 2007).

A ingestão de histamina em quantidades entre 8 e 40mg, 40 e 100mg e mais de 100mg pode causar intoxicações leve, moderada e grave, respectivamente (PARENTE et al., 2001). Nout (1994) apontou que o nível máximo permitido de histamina e tiramina em alimentos deve estar na faixa de 50-100 mg.kg<sup>-1</sup> e 100-800 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, pois acima de 1.080mg.kg<sup>-1</sup> a tiramina torna-se comprovadamente

tóxica. Uma vez que em muitos casos de intoxicação a concentração de histamina encontrada no alimento suspeito é insuficiente para provocar sintomas se ingeridas experimentalmente, tem sido sugerido que outras substâncias encontradas no próprio alimento possam atuar como sinergistas, possibilitando a absorção de quantidades de histamina maiores que aquelas absorvidas na ausência de alimentos (HALÁSZ *et al.*, 1994; SILLA-SANTOS, 1996; LAPA-GUIMARÃES, 2005). Com base nisso, putrescina, cadaverina e agmatina foram identificadas como aminas potencializadoras, pois aumentam a toxicidade da histamina em humanos ao deprimirem a sua oxidação no organismo (SILLA-SANTOS, 1996; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ COLMENERO, 2004).

As poliaminas, isoladamente, não representam perigo do ponto de vista toxicológico, porém estão fortemente relacionadas com o crescimento e desenvolvimento tumoral (ELIASSEN *et al.*, 2002). Seus efeitos na proliferação de células cancerígenas parecem derivar não somente do efeito da estimulação direta do crescimento e diferenciação, mas também do efeito exercido sobre o sistema imune não específico ligado à morte tumoral, sobre a concentração plasmática de interleucina-1 e 6 e concentração do fator de necrose tumoral. Além disso, a putrescina e a cadaverina podem reagir com nitrito para formar nitrosaminas heterocíclicas, potencialmente carcinogênicas (SILLA-SANTOS, 1996; ELIASSEN *et al.*, 2002), comumente presentes em produtos embutidos cárneos curados (fermentados ou não), os quais incluem sais de cura (nitratos e nitritos) em sua formulação.

Segundo Eliassen *et al.* (2002), regimes de privação de poliaminas, combinados com a ingestão de inibidores de ornitina descarboxilase e poliamina oxidase e a utilização de antibióticos capazes de causar a descontaminação parcial do trato gastrointestinal, tem mostrado uma redução no crescimento de diversos tipos de tumores sólidos (SARHAN, KNODGEN E SEILER, 1992 apud ELIASSEN *et al.*, 2002). Não obstante, tratamento alternativo com drogas citotóxicas bem estabelecidas e a privação da ingestão de poliaminas, elevam significativamente a eficácia dos tratamentos quimioterápicos (QUEMENER *et al.*, 1992 apud ELIASSEN *et al.*, 2002).

Além de seu potencial tóxico e carcinogênico, existe outra importante razão para a determinação de aminas em alimentos: sua utilização como indicadores de qualidade de um produto.

#### 2.3.4. Aminas como indicadores de qualidade de carnes

As aminas biogênicas, por serem formadas principalmente a partir da ação de microrganismos, estão freqüentemente relacionadas com a deterioração de alimentos (HALÁSZ *et al.*, 1994) e tendem aumentar durante o armazenamento prolongado. Além disso, as aminas biogênicas são estáveis ao calor, sendo adequadas para avaliar a qualidade de produtos processados termicamente (SILLA-SANTOS, 1996). Assim, Mietz e Karmas (1977 apud RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004) observaram o aumento de cadaverina, putrescina e histamina em amostras deterioradas de atum enlatado, enquanto que os níveis de espermina e espermidina permaneceram baixos quando comparados com amostras de atum de boa qualidade. Baseados nessa observação esses autores estabeleceram um índice de qualidade química, igual à soma de histamina + putrescina + cadaverina, dividido pela soma de 1 + espermidina + espermina, sendo que os valores entre 0 e 1, 1 e 10 e acima de 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  indicam classes 1 (boa), 2 (intermediária) e 3 (decomposto), respectivamente.

A combinação de putrescina e cadaverina tem sido sugerida como indicadora da aceitabilidade de carnes frescas, já que suas concentrações aumentam previamente à deterioração e correlacionam-se bem com a carga microbiana (RUIZ-CAPILLAS e COLMENERO, 2004). Wortberg e Woller (1982 apud RUIZ-CAPILLAS e COLMENERO, 2004) observaram que altas concentrações de cadaverina eram nitidamente indicativas de deterioração. Esses autores propuseram então um índice de aminas biogênicas (IAB) constituído pela soma de putrescina, cadaverina, histamina e tiramina, e estabeleceram o valor de  $500\text{mg.kg}^{-1}$  como limite máximo para lingüiça tipo bolonhesa, carne bovina moída e carne suína. Utilizando esse mesmo índice de aminas biogênicas, Hernández-Jover *et al.* (1996) sugeriram os seguintes limites: IAB <  $5\text{mg.kg}^{-1}$  para carne bovina fresca de boa qualidade; entre 5 e  $20\text{mg.kg}^{-1}$  para carne aceitável, mas com sinais iniciais de deterioração; e entre 20 e  $50\text{mg.kg}^{-1}$  para carne de baixa qualidade. Finalmente, concentrações de aminas maiores que  $50\text{mg.kg}^{-1}$  correspondem a carnes deterioradas, impróprias para o consumo.

Em outro estudo, Veciana-Nogués *et al.* (1997) ao analisarem amostras de atum quanto aos teores de aminas (aminas biogênicas e poliaminas), detectaram o aumento de putrescina, cadaverina, tiramina e histamina durante o armazenamento, sendo que a concentração dessa última foi maior nas amostras armazenadas em temperaturas mais elevadas. Assim, esses autores estabeleceram outro índice de qualidade, baseado na

soma das concentrações de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina, sendo que somente os valores inferiores a  $50\text{mg.kg}^{-1}$  representam um alimento de boa qualidade. De forma semelhante, Silva e Glória (2002) criaram um índice químico de qualidade para a carne de frango baseado na razão entre espermidina e espermina, onde valores abaixo de 0,5, entre 0,5 e 0,7 e acima de  $0,7\text{ mg.kg}^{-1}$  denotam um produto fresco, de consumo imediato e em estágio avançado de decomposição, respectivamente.

Para produtos cárneos fermentados em geral, é mais difícil aplicar critérios de qualidades semelhantes aos citados acima. Isso ocorre, em parte, porque a variação da concentração de aminas é muito maior em embutidos curados fermentados do que em carnes frescas ou cozidas, em função de que nestes existem muito mais fatores diferentes envolvidos no processo, como tipo e grau de contaminação da matéria-prima fresca, práticas durante a manufatura, vários estágios de processamento e uso de culturas iniciadoras, por exemplo.

Não há um índice específico para carne bovina maturada, porém muitos autores sugerem a utilização de índices de qualidade já existentes e a verificação de sua aplicabilidade em produtos de outras origens e gêneros.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

Foram utilizados contrafilés (músculo *Longissimus dorsi*) de 12 meias-carcaças de bovinos machos, sendo 6 da raça Red Angus (subespécie europeia) e 6 de animais mestiços (subespécie zebuina), abatidos com aproximadamente 3 anos de idade e 350kg, provenientes de frigorífico comercial da região de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Os músculos foram extirpados das massas musculares adjacentes usando-se como referência o quinto espaço intercostal.

#### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento constou de 60 amostras decorrentes do delineamento inteiramente casualizado entre 20 tratamentos (2 subespécies bovinas x aplicação ou não de estimulação elétrica da carcaça x 5 tempos de maturação), com três repetições, avaliando-se a quantidade de aminas bioativas (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, triptamina, feniletilamina, espermina e espermidina), contagem total de bactérias lácticas e contagem padrão em placa de microrganismos aeróbios, perfazendo 540 determinações, como mostra a Tab.1.

Para a análise estatística foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para o experimento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5 % de significância. Foram estimadas as

correlações (Pearson,  $p \leq 0,01$ ) entre contagens de microrganismos e tempo de maturação.

Tabela 1. Delineamento experimental.

Tratamento	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes	
	Subespécie Bovina	Estímulo Elétrico Carcaça	Tempo (dias) da		
1	<i>Red Angus</i>	<i>Com</i>	0	Aminas bioativas;	
2			7		
3			14		
.			35		
.			56		
.			0		
.			7		
.			14		
.			35		
.		56			
.		0			
.		7			
.		14			
.		35			
.		56			
19		<i>Mestiços Zebuínos</i>	<i>Sem</i>	7	Contagem padrão em placa de microrganismos aeróbios (30°C);
19				14	
20				35	
				56	
			0	Contagem total de bactérias lácticas.	

### 3.2.2. Processamento de amostras

O abate dos bovinos, bem como a desossa e o acondicionamento dos cortes, foi efetuado conforme as normas descritas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1997), nas dependências do Frigorífico Mercosul S/A, localizado no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, durante jornada matutina de abate e processamento de carnes.

Foram selecionadas duas categorias de animais baseadas na raça: bovinos Red Angus (linhagem européia pura), certificados pela agência credenciadora da raça Red Angus em Pelotas; e bovinos mestiços, ou seja, aqueles que apresentavam características fenotípicas evidentes da presença do genótipo *Bos indicus* como:

ossatura robusta e sobressalente, pele escura, fina, solta e flexível, cabeça em formato de ataúde e perfil ligeiramente convexo, presença de barbela profusa e presença de cupim, características estas peculiares dos bovinos de linhagem zebuína. Todos os animais selecionados mostravam-se aparentemente saudáveis, com boa conformação física, peso aproximado de 350kg e 3 anos de idade.

Para o controle da variável “*estimulação elétrica da carcaça*”, os animais de cada uma das categorias (Red Angus e mestiços) foram divididos em outros dois grupos homogêneos, com número igual de indivíduos: grupo de animais que receberam estimulação elétrica *post-mortem* da carcaça (barra metálica fixa, na região do “vazio”; 70 V, durante dois minutos; frequência de 15 pulsos por segundos); e grupo controle, que não recebeu estimulação elétrica da carcaça após o abate.

Cada um dos músculos do contrafilé foi seccionado e da sua porção mais central (mediana), foram separadas cinco amostras de aproximadamente 200g, as quais foram embaladas a vácuo, separadamente, identificadas, acondicionadas sob refrigeração e remetidas ao laboratório de Análises Bioquímicas e Bromatológicas (DCTA/FAEM/UFPEL), onde permaneceram sob temperatura de  $-1,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 0, 7, 14, 35 e 56 dias, quando foram efetuadas as determinações.

### **3.2.3. Determinações microbiológicas**

A determinação da contagem padrão em placa (CPP) de microrganismos aeróbios e contagem de bactérias lácticas (BAL) foi realizada transferindo-se assepticamente 25g de amostra para um saco tipo *stomacher* contendo 225ml de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. A homogeneização foi procedida à temperatura ambiente durante 2 minutos.

Para a contagem padrão em placas efetuou-se o plaqueamento em superfície de 0,1mL de amostra diluída em placas de Petri estéreis, em duplicata, contendo meio ágar padrão para contagem (PCA - Merck), às quais foram incubadas à temperatura de 30°C por 48h (JONES, 2004).

A contagem de bactérias lácticas seguiu o método de plaqueamento em profundidade sugerido por Silva, Junqueira e Silveira (1997), onde alíquotas de 1mL de

amostra diluída foram inoculadas em placas de Petri (estéreis), em duplicata, e sobre as quais se verteu meio de cultura Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS – Acumedia). Após a solidificação do ágar MRS, a superfície das placas foi recoberta por uma sobrecamada do mesmo meio, a fim de promover uma atmosfera de microaerofilia. As placas foram incubadas em estufa, também à temperatura de 30°C, por 72h. Todas as diluições que apresentaram entre 25 e 250 unidades formadoras de colônia (UFC) foram selecionadas e tiveram seus resultados transformados em unidades logarítmicas ( $\text{LogUFC.g}^{-1}$ ).

#### **3.2.4. Determinação de aminas bioativas**

Porções de 5g de amostra de carne previamente moída foram misturadas a uma solução de ácido tricloroacético 5% (TCA), agitadas por 5 minutos em agitador eletrônico (Vortex, QL 902) e centrifugadas ( $10.000 \times g$ , 4°C, 21 minutos) em centrífuga refrigerada Sorvall – RC5C (Refrigerated Superspeed Centrifuge, rotor SS-34, Sorvall Equipaments, Du Pont Instruments, Newtown, CT). Os sobrenadantes foram filtrados e coletados, e os resíduos sólidos dos centrifugados foram re-suspendidos e submetidos à extração por mais duas vezes, com volumes de 7 e 6mL de TCA 5%, totalizando 20mL de ácido adicionado. Os conteúdos coletados de cada amostra foram combinados e congelados à -18°C por aproximadamente 30 dias (SILVA e GLÓRIA, 2002).

Os extratos das amostras foram remetidos ao Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, onde foram determinados os teores de aminas bioativas. Como preconiza a metodologia utilizada nesse estudo (SILVA e GLÓRIA, 2002), os extratos foram filtrados em membrana HAWP de 13mm de diâmetro e 45 $\mu\text{m}$  de tamanho do poro (Millipore Corp, Milford, MA, EUA) e as aminas separadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência por pareamento de íons, em coluna de fase reversa. A quantificação foi por fluorimetria após a derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído (VALE e GLÓRIA, 1997). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho da marca Shimadzu, composto por três bombas modelo LC-10 AD e LC-10 ADVP, conjunto de lavagem automática do pistão, injetor automático modelo SIL-10 ADVP, detector espectrofluorimétrico modelo RF-551 a 340 e 445nm de excitação e emissão, respectivamente, além de uma unidade de controle CBM-10 AD conectada a

um microcomputador. Foi utilizada coluna  $\mu$ Bondapak C18, de fase reversa (3,9 x 300mm, 10 $\mu$ m) e pré-coluna  $\mu$ Bondapak (Waters, Milford, MA, EUA).

A quantificação de aminas foi feita por interpolação em curva-padrão externa, sendo os valores multiplicados pelo fator de correção correspondente a cada amina. Os padrões de aminas empregados foram: dicloridrato de putrescina (PUT), dicloridrato de cadaverina (CAD), cloridrato de tiramina (TIM), dicloridrato de histamina (HIM), cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT), complexo sulfato creatinina agmatina (AGM), tricloridrato de espermidina (EPD), tetracloridrato de espermina (EPM), cloridrato de 2-feniletilamina (FEA) e triptamina (TRM), da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Contagens de microrganismos aeróbios e bactérias lácticas**

A capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos presentes em um alimento depende de uma série de fatores, dentre os quais estão os relacionados às características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados ao ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos) (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Os dados obtidos nesse experimento não sugerem que a diferença racial dos animais utilizados (fator intrínseco), tampouco a aplicação ou não de estimulação elétrica da carcaça (fator extrínseco) influenciem significativamente as contagens de microrganismos, tanto para microrganismos aeróbios quanto bactérias lácticas, como mostra a tabela 2.

O método de contagem padrão em placa pode ser utilizado tanto para a contagem de grandes grupos microbianos (microrganismos aeróbios mesófilos ou psicrotróficos, por exemplo), como também para a contagem de gêneros e espécies específicas, variando-se, para isso, o tipo de meio e as condições de incubação (SILVA, JUNQUEIRA E SILVEIRA, 1997). Optou-se, nesse experimento, pela utilização de metodologia para contagem padrão em placas utilizando-se temperatura de 30°C, a fim de que fossem favorecidos os grupos de microrganismos psicrotróficos e se pudesse comparar as quantidades de microrganismos aeróbios e bactérias lácticas obtidas, as quais também foram incubadas à temperatura de 30°C.

Dessa forma, os resultados demonstram que o grau de contaminação inicial da matéria-prima foi baixo (tabela 2), não sendo detectadas unidades formadoras de colônias de microrganismos nas amostras de carne fresca, no dia 0, nos diferentes tratamentos estudados. Amostras de carne de Red Angus sem estimulação elétrica da

carcaça apresentaram uma contagem inicial média de microrganismos de 0,9 Log.UFC.g<sup>-1</sup>, mas a análise de variância dos resultados aponta uma diferença não significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ). Estas contagens iniciais baixas refletem as boas condições de manipulação e processamento das amostras, muito melhores que as habitualmente encontradas na maioria dos abatedouros e salas de desossa, onde essas taxas costumam ser mais elevadas. Isso se deve, provavelmente, ao fato dos cortes de carnes utilizados na amostragem terem sido adquiridos diretamente em um abatedouro comercial que realiza controle higiênico rígido das operações e à adequada preparação das amostras para a microbiologia, feitas em laboratório, também com medidas higiênicas apropriadas.

Até o final da segunda semana do experimento (aos 14 dias) a contagem de aeróbios permaneceu baixa, não ultrapassando 1,77 LogUFC.g<sup>-1</sup>. Para Mano, Peneda e Fernando (2002), a fase de latência de uma população microbiana indica o tempo que essa população leva para iniciar sua multiplicação ativamente. Manço (2002), comparando a microbiota de carnes maturadas durante 28 dias, observou que não houve diferença entre os dias 2, 7, 14 e 21, porém um aumento significativo ( $p<0,05$ ) pôde ser observado aos 28 dias, caracterizando o início da fase logarítmica de crescimento. Semelhantemente, no presente estudo os valores encontrados nas contagens padrão em placas, em todos os tratamentos estudados, não diferiram significativamente entre os dias 0, 7 e 14 de maturação, porém houve diferenças a partir do 35º dia, o que demonstra que a passagem da fase de latência para a fase logarítmica de crescimento bacteriano ocorreu no período compreendido entre a 2ª e a 5ª semana de maturação, não sendo possível, no entanto, apurar o momento mais aproximado dessa mudança, visto que não foram realizadas determinações em tempos intermediários a esses.

Tabela 2. Médias e erros-padrão das contagens de microrganismos em carne bovina maturada durante a maturação (acondicionamento a vácuo e temperatura de  $-1,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

Tratamento	Contagem de Microrganismos	Tempo de armazenamento (dias)				
		0	7	14	35	56
<b>Red Angus</b>						
<b>Com estímulo</b>	CPP	Nd <sup>*a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	5,78±0,71 <sup>b</sup>	6,19±0,43 <sup>b</sup>
	BAL	Nd <sup>a</sup>	1,64±0,82 <sup>ab</sup>	2,66±0,01 <sup>b</sup>	6,09±0,00 <sup>c</sup>	6,95±0,24 <sup>c</sup>
	CPP	0,9±0,9 <sup>a</sup>	0,8±0,8 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	4,7±0,26 <sup>b</sup>	6,67±0,2 <sup>c</sup>
	BAL	1,64±1,64 <sup>a</sup>	1,44±1,44 <sup>a</sup>	2,94±0,09 <sup>ab</sup>	5,37±0,27 <sup>b</sup>	7,56±0,12 <sup>c</sup>
<b>Sem estímulo</b>						
<b>Mestiços</b>						
<b>Com Estímulo</b>	CPP	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	5,92±0,25 <sup>b</sup>	6,46±0,16 <sup>c</sup>
	BAL	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	2,39±0,03 <sup>a</sup>	5,96±0,45 <sup>b</sup>	6,65±1,33 <sup>b</sup>
	CPP	Nd <sup>a</sup>	1,77±0,89 <sup>a</sup>	1,47±1,47 <sup>a</sup>	5,59±0,87 <sup>b</sup>	6,6±0,32 <sup>b</sup>
	BAL	Nd <sup>a</sup>	3,03±0,43 <sup>bc</sup>	2,61±0,29 <sup>b</sup>	4,64±1,00 <sup>c</sup>	7,6±0,31 <sup>d</sup>
<i>Sem estímulo</i>						

n = 6; \*nd = não detectado; CPP = Contagem padrão em placa de microrganismos aeróbios; BAL = Contagem de bactérias lácticas totais; valores com letras minúsculas iguais, na mesma linha, não diferem significativamente (teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ );

Levando-se em consideração os valores obtidos em todos os tratamentos, o aumento nas contagens de microrganismos aeróbios entre o 14º e o 35º dia atingiu o valor médio de 5,13 LogUFC.g<sup>-1</sup>, ao passo que entre os dias 35 e 56 de maturação houve uma diminuição no crescimento médio, com valores restringindo-se à aproximadamente 0,98 LogUFC.g<sup>-1</sup>. Ponderando que o número de dias compreendido entre os dois períodos (14 a 35 e 35 a 56) é idêntico (ou seja, 21 dias), pode-se afirmar que houve uma redução acentuada na capacidade de multiplicação dos microrganismos presentes nas amostras de carne, apontando para o estabelecimento da fase de platô e, conseqüentemente, decréscimo populacional e morte dos microrganismos.

Cabe ressaltar que não foram constatadas características típicas e evidentes de deterioração das amostras (odor pútrido, cor esverdeada, embalagem estufada, superfície pegajosa, etc) durante o período de maturação. As máximas contagens de microrganismos aeróbios encontradas nesse experimento ficaram entre 6 e 7 LogUFC.g<sup>-1</sup>, resultado semelhante aos obtidos por Smith *et al.* (1993) quando constatou que a contagem total bacteriana de amostras de carne bovina aumentava consideravelmente até os 60 dias de maturação (1°C), quando então estagnava. Nesse momento a contagem de microrganismos de suas amostras também se encontravam ao redor de 6 e 7 LogUFC.g<sup>-1</sup> e suas carnes eram consideradas organolepticamente aceitáveis. Em contrapartida, o mesmo não ocorreu com carnes armazenadas a vácuo sob temperaturas de 0, 5 e 10°C, onde Yano *et al.* (1995) detectaram leve odor pútrido em carnes maturadas aos 35, 14 e 6 dias de maturação, respectivamente, quando a contagem total de microrganismos aeróbios viáveis também encontrava-se ao redor de 6-7 LogUFC.g<sup>-1</sup>.

Uma explicação para esse fenômeno está na característica de crescimento dos microrganismos. Como afirma Holley e Gill (2006), em carnes acondicionadas em ambiente aeróbico e sob temperaturas de refrigeração os microrganismos aeróbios utilizam preferencialmente a glicose disponível e quando essa é exaurida iniciam o catabolismo dos aminoácidos, dando continuidade ao processo deteriorativo e desenvolvendo acentuadas alterações organolépticas e estruturais da carne. Em carnes acondicionadas em ambiente de anaerobiose, todavia, a situação é um pouco diferente. As bactérias lácticas predominam nesse meio e fermentam a glicose e outros substratos presentes nas carnes. Quando estes elementos se esgotam, o crescimento pára. Isso normalmente ocorre quando o número de bactérias lácticas atinge valores ao redor de 7

LogUFC.g<sup>-1</sup>. Como a grande maioria das espécies lácticas não são capazes de deteriorar carnes mantidas em baixas temperaturas por longos períodos, essas podem permanecer próprias para o consumo por bastante tempo. Um exemplo disso está nas observações realizadas por Borch, Kant-Muermans e Blixt (1996) em carne bovina maturada mantida à temperatura de 0°C, onde o tempo de vida-de-prateleira de seus espécimes variou de 10 a 12 semanas, com uma microbiota dominada, sobretudo, por *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp. e *Leuconostoc* spp.

Em diversos trabalhos pesquisadores avaliaram a qualidade microbiológica de cortes de carne durante longos períodos de maturação e constataram que o crescimento da população total de microrganismos aeróbios e bactérias lácticas correlacionava-se positivamente com o tempo de maturação (GILL e BADONI; 2002; NAPRAVNIKOVA, VORLOVA e MALOTA, 2002; JONES, 2004). Como mostra a tabela, o mesmo pôde ser observado nesse experimento.

Resultado semelhante foi observado por Jones (2004), quando observou que em carne bovina embalada a vácuo e mantida sob temperatura de -1,5°C por aproximadamente 16 semanas, houve uma sucessão de espécies lácticas dominantes durante a maturação, mas a contagem total dessas bactérias não ultrapassou o valor de 8 LogUFC.g<sup>-1</sup>. Comparando esses resultados com os dados encontrados nesse estudo, observa-se que o máximo valor alcançado para a contagem de bactérias lácticas foi 7,6 LogUFC.g<sup>-1</sup> em carne de bovinos mestiços, sem estímulo elétrico, aos 56 dias de maturação. Embora não tenham sido isoladas e identificadas as espécies lácticas dominantes, os resultados de ambos os trabalhos foram semelhantes.

Vale apontar ainda que, mesmo abrangendo um período longo de avaliações (8 semanas de maturação), não foi possível comprovar a estabilização do crescimento das bactérias lácticas nesse experimento. Ao contrário, Gill e Badoni (2002), em um estudo de seis semanas, identificaram que a contagem de bactérias lácticas de carne bovina maturada partiu de aproximadamente 2 LogUFC.g<sup>-1</sup>, na semana 0, e atingiu 8,1 LogUFC.g<sup>-1</sup> na 4ª semana de experimentação, valor este que permaneceu constante durante as semanas seguintes, até o final do período. Cabe ressaltar, entretanto, que no presente estudo a temperatura de condicionamento das carnes foi inferior, da mesma forma que inferiores foram também os valores encontrados nas contagens de microrganismos no início das avaliações. Napravnikova, Vorlova e Malota (2002), estudando carne suína, também observaram um marcante aumento no número de

bactérias lactogênicas após o 28º dia de maturação, sendo que as contagens iniciais partiram de zero e cresceram até valores ao redor de 6 LogUFC.g<sup>-1</sup>, aos 35 dias.

#### 4.2 Teores de aminos bioativas na carne fresca (tempo 0)

Os tipos e níveis de aminos bioativas encontradas na carne bovina de animais da raça Red Angus e mestiços, ambos tratados com e sem estimulação elétrica *post-mortem* da carcaça, no início da maturação (tempo 0), estão indicados na Tab.3 e Fig.3. Das aminos pesquisadas, somente a cadaverina (CAD), tiramina (TRM) e serotonina (SRT) não foram encontradas no tempo 0. Sob condições fisiológicas normais espera-se encontrar espermina e espermidina em carnes, pois essas substâncias desempenham um importante papel no crescimento celular *in vivo*. Segundo Michels (1963 apud SILVA e GLÓRIA, 2002) e Taylor (1985 apud SILVA e GLÓRIA, 2002), a histamina em pequenas quantidades pode também ser encontrada nos tecidos vivos, armazenada nos mastócitos e nos basófilos.

Os níveis totais iniciais de aminos em carnes de Red Angus e animais mestiços, com e sem estímulo elétrico *post-mortem*, foram similares (34,2 e 35,2; e 34,2 e 32,2mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente; p<0,05). Em todos os tipos de carne, a espermina foi a amina predominante, seguida pela espermidina (Fig.4). Essas poliaminas, juntas, contribuíram com mais de 80% do conteúdo total de aminos encontrados nas amostras. Outros estudos demonstram também que a espermina e a espermidina são também as aminos predominantes em carne suína e de frango (BARDÓCZ et al., 1993; HERNÁNDEZ-JOVER et al., 1996; SILVA e GLÓRIA, 2002).

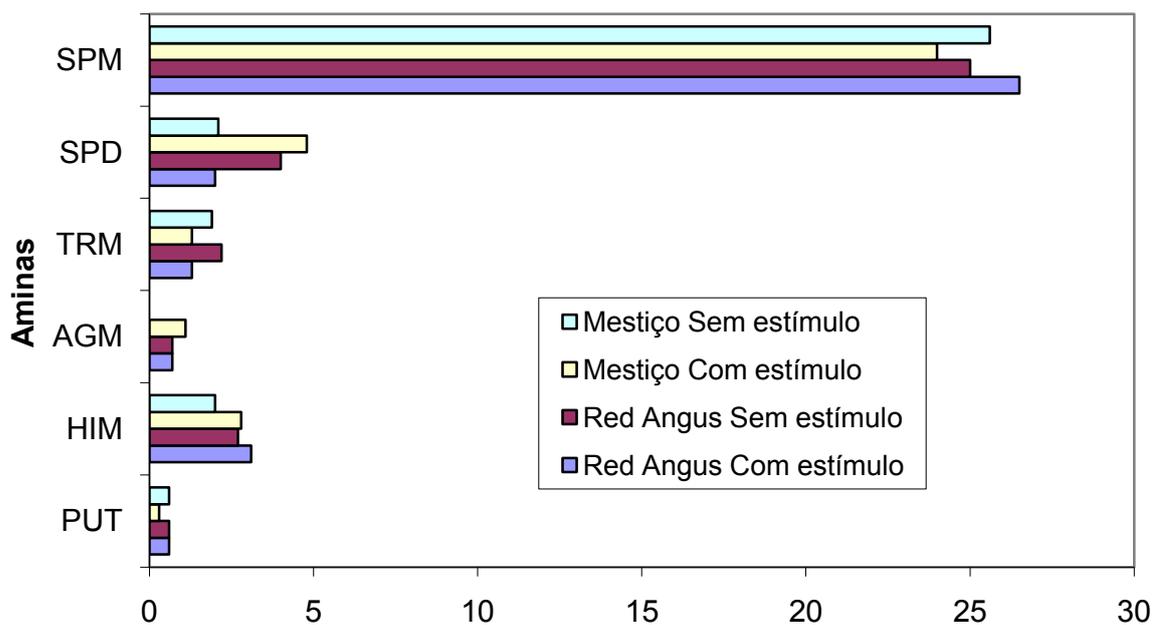


Figura 3. Teores médios de aminas bioativas ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) encontrados nas amostras frescas (tempo 0) de carne bovina. SPM: espermina; SPD: espermidina; TRM: tiramina; AGM: agmatina; HIM: histamina; PUT: putrescina.

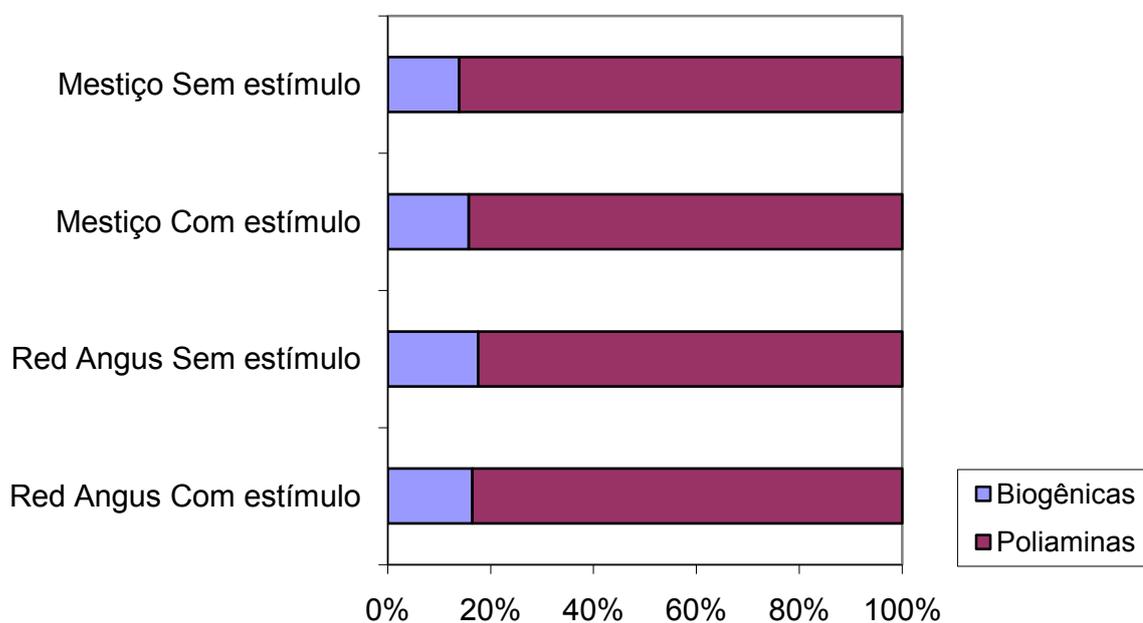


Figura 4. Demonstração percentual do conteúdo de aminas biogênicas e poliaminas em amostras de carne.

Tabela 3. Médias e erros-padrão dos conteúdos de aminas bioativas em carne bovina armazenada sob refrigeração (-1,0±0,5°C) durante 56 dias de maturação.

Tratamento Tempo (dias)	Aminas Biogênicas (mg.kg <sup>-1</sup> )						Poliaminas				Total
	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	TRM	PUT	EPM	EPD		
<b>ANGUS</b>											
<b>Estímulo</b>	Nd <sup>a</sup>	3,1±0,5 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	1,3±1,3 <sup>a</sup>	0,6±0,3 <sup>a</sup>	26,5±3,2 <sup>ab</sup>	2,0±0,5 <sup>a</sup>	34,2±1,9 <sup>a</sup>	
0	Nd <sup>a</sup>	2,3±0,4 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	3,4±1,8 <sup>a</sup>	0,4±0,2 <sup>a</sup>	24,8±1,2 <sup>ab</sup>	12,0±10,0 <sup>a</sup>	43,6±8,9 <sup>a</sup>	
7	Nd <sup>a</sup>	2,5±0,1 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,4±0,4 <sup>a</sup>	3,7±2,0 <sup>a</sup>	0,6±0,4 <sup>a</sup>	22,7±2,5 <sup>aA</sup>	1,6±0,3 <sup>a</sup>	31,5±3,8 <sup>aA</sup>	
14	0,3±0,3 <sup>a</sup>	2,0±0,4 <sup>a</sup>	42,2±12,2 <sup>b</sup>	3,3±2,5 <sup>ab</sup>	0,8±0,8 <sup>a</sup>	13,5±1,6 <sup>b</sup>	0,5±0,5 <sup>a</sup>	32,9±2,4 <sup>b</sup>	2,0±0,6 <sup>a</sup>	97,5±6,4 <sup>b</sup>	
35	Nd <sup>a</sup>	2,4±0,1 <sup>a</sup>	27,0±25,0 <sup>ab</sup>	6,4±1,0 <sup>b</sup>	1,5±0,5 <sup>a</sup>	24,3±3,4 <sup>c</sup>	1,3±0,3 <sup>a</sup>	33,0±4,9 <sup>b</sup>	1,2±0,2 <sup>a</sup>	97,1±19,9 <sup>b</sup>	
56											
<b>Sem estímulo</b>	Nd <sup>a</sup>	2,7±0,6 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	2,2±1,3 <sup>a</sup>	0,6±0,3 <sup>a</sup>	25,0±1,3 <sup>a</sup>	4,0±2,7 <sup>a</sup>	35,2±2,7 <sup>a</sup>	
0	Nd <sup>a</sup>	2,7±0,2 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	3,5±2,1 <sup>a</sup>	0,4±0,2 <sup>a</sup>	25,1±1,6 <sup>a</sup>	1,9±0,2 <sup>a</sup>	34,3±3,6 <sup>a</sup>	
7	Nd <sup>a</sup>	2,4±0,0 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,5±0,5 <sup>a</sup>	0,4±0,4 <sup>a</sup>	5,0±3,6 <sup>a</sup>	0,5±0,3 <sup>a</sup>	13,9±5,9 <sup>bA</sup>	1,5±0,2 <sup>a</sup>	24,2±1,8 <sup>aA</sup>	
14	26,6±26,6 <sup>a</sup>	1,9±0,5 <sup>a</sup>	46,9±24,2 <sup>b</sup>	1,8±0,5 <sup>a</sup>	0,8±0,8 <sup>a</sup>	14,3±2,1 <sup>b</sup>	0,3±0,2 <sup>a</sup>	32,2±1,5 <sup>a</sup>	3,1±0,5 <sup>a</sup>	127,9±37,3 <sup>b</sup>	
35	Nd <sup>a</sup>	2,3±0,1 <sup>a</sup>	25,0±7,1 <sup>b</sup>	12,2±6,8 <sup>b</sup>	2,8±2,7 <sup>a</sup>	29,3±4,6 <sup>c</sup>	0,9±0,5 <sup>a</sup>	45,0±0,9 <sup>c</sup>	2,3±0,5 <sup>a</sup>	119,8±22,8 <sup>b</sup>	
56											
<b>MESTIÇA</b>											
<b>Estímulo</b>	Nd <sup>a</sup>	°2,8±0,2 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	1,1±1,1 <sup>a</sup>	1,3±1,3 <sup>a</sup>	0,3±0,3 <sup>a</sup>	24,0±0,8 <sup>a</sup>	4,8±3,4 <sup>a</sup>	34,3±0,4 <sup>a</sup>	
0	Nd <sup>a</sup>	2,1±0,2 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	1,8±1,0 <sup>a</sup>	0,7±0,2 <sup>a</sup>	21,3±1,8 <sup>a</sup>	1,9±0,3 <sup>a</sup>	28,5±2,4 <sup>a</sup>	
7	Nd <sup>a</sup>	2,5±0,4 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,3±0,3 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	2,5±1,4 <sup>a</sup>	0,8±0,1 <sup>a</sup>	28,8±1,1 <sup>aB</sup>	1,7±0,4 <sup>a</sup>	36,6±2,5 <sup>aB</sup>	
14	3,4±3,1 <sup>a</sup>	1,8±0,3 <sup>a</sup>	36,7±11,5 <sup>b</sup>	2,3±1,9 <sup>a</sup>	0,9±0,7 <sup>a</sup>	13,6±3,2 <sup>b</sup>	0,9±0,7 <sup>a</sup>	29,2±4,4 <sup>a</sup>	3,4±0,5 <sup>a</sup>	92,2±9,3 <sup>b</sup>	
35	°Nd <sup>a</sup>	2,8±0,3 <sup>a</sup>	36,7±9,6 <sup>b</sup>	6,1±4,4 <sup>a</sup>	1,0±0,6 <sup>a</sup>	21,5±1,6 <sup>c</sup>	0,9±0,5 <sup>a</sup>	40,1±4,9 <sup>b</sup>	2,8±1,3 <sup>a</sup>	111,9±20,7 <sup>b</sup>	
56											
<b>Sem estímulo</b>	°Nd <sup>a</sup>	2,0±0,4 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	1,9±1,9 <sup>a</sup>	0,6±0,1 <sup>a</sup>	25,6±0,8 <sup>a</sup>	2,1±0,7 <sup>a</sup>	32,2±2,5 <sup>a</sup>	
0	Nd <sup>a</sup>	2,0±0,2 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	2,2±1,5 <sup>a</sup>	0,4±0,2 <sup>a</sup>	22,7±2,3 <sup>a</sup>	1,7±0,3 <sup>a</sup>	29,7±1,4 <sup>a</sup>	
7	0,4±0,4 <sup>a</sup>	1,5±0,4 <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	Nd <sup>a</sup>	5,3±3,1 <sup>a</sup>	0,4±0,2 <sup>a</sup>	31,8±1,0 <sup>abB</sup>	1,8±0,4 <sup>a</sup>	41,2±3,6 <sup>aB</sup>	
14	10,1±7,0 <sup>a</sup>	1,3±0,7 <sup>a</sup>	42,9±8,5 <sup>b</sup>	3,3±1,4 <sup>a</sup>	0,2±0,2 <sup>a</sup>	16,5±6,1 <sup>ab</sup>	0,1±0,1 <sup>a</sup>	27,7±3,2 <sup>a</sup>	2,4±0,4 <sup>a</sup>	104,5±9,6 <sup>b</sup>	
35	1,4±1,4 <sup>a</sup>	1,8±0,4 <sup>a</sup>	22,7±4,3 <sup>c</sup>	5,3±4,6 <sup>a</sup>	2,2±2,0 <sup>a</sup>	22,9±6,6 <sup>b</sup>	0,8±0,4 <sup>a</sup>	40,8±7,6 <sup>b</sup>	2,8±0,9 <sup>a</sup>	100,7±16,6 <sup>b</sup>	
56											

\* Nd: não detectado; n=3; valores médios com letras iguais na mesma coluna, minúsculas (abc) para o mesmo tratamento e maiúsculas (AB ou nenhuma) entre os tratamentos, dentro do mesmo tempo, não diferem significativamente (P≤0,05, teste de Duncan);

### 4.3. Teores de aminas bioativas durante a maturação

Os tipos e níveis de aminas bioativas detectadas nos tratamentos durante a maturação a  $-1,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , estão descritos na tabela 3. Dentre as dez aminas investigadas, a feniletilamina não foi detectada em nenhuma amostra durante o período total de maturação de 56 dias, ao passo que histamina (HIM), triptamina (TRM), putrescina (PUT), espermina (EPM) e espermidina (EPD) foram detectadas na totalidade das amostras maturadas analisadas.

Segundo Okamoto *et al.* (1997), a carne bovina contém maiores concentrações de espermina, espermidina, putrescina e cadaverina que carnes de frango e suína. Espermina e espermidina, em especial, estão amplamente distribuídas nos mais diversos tipos de carnes, onde alcançam valores superiores àqueles relatados para outros tipos de alimentos. A putrescina também é comum às carnes, pois é uma amina intermediária, necessária para a formação de poliaminas. Por outro lado, porém, a cadaverina não deve ser encontrada naturalmente em tecidos animais (PEGG, 1986 apud ELIASSEN *et al.*, 2002); quando presentes indicam que há contaminação bacteriana.

Na carne proveniente de animais Red Angus, sem estimulação elétrica da carcaça, a espermina sofreu uma diminuição em seu conteúdo no 14º dia ( $p < 0,05$ ) para então voltar a aumentar para valores ao redor de  $32 \text{ mg.kg}^{-1}$  no 35º dia. Esses resultados são semelhantes àqueles reportados para pescado (VECIANA-NOGUÉS *et al.*, 1997; RUIZ-CAPILLAS e MORAL, 2001 a,b), carne suína (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1996, 1997) e carne de frango (SILVA e GLÓRIA, 2002). Esse decréscimo na quantidade de espermina pode ocorrer porque esta poliamina é muitas vezes pelos próprios microrganismos presentes no meio, como fonte de nitrogênio (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.* 1997). Rogowskil e Döhla (1984 apud HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997) e Majjala e Eerola (1993 apud HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1997), também reportaram níveis semelhantes de poliaminas em carnes bovinas frescas. Esses autores dizem que enquanto a espermina, espermidina e putrescina estão sempre presentes em carnes frescas, em níveis relativamente constantes, as aminas biogênicas (histamina, agmatina, serotonina, tiramina, cadaverina, triptamina, feniletilamina) não são usualmente encontradas no início da maturação das carnes.

Dentre as aminas biogênicas encontradas durante o período de maturação, histamina, agmatina (AGM), cadaverina e putrescina não sofreram variações nos seus teores. Já a tiramina, serotonina e triptamina aumentaram durante o período. De acordo com a literatura, as aminas biogênicas são formadas por atividade enzimática de bactérias que podem ou não fazer parte da microbiota natural dos alimentos (HALÁSZ *et al.*, 1994). Assim, os tipos e níveis de aminas formadas dependem da espécie e da quantidade de microrganismos presente (VECIANA-NOGUÉS *et al.*, 1997). Segundo Shalaby (1996), dentre os microrganismos encontrados naturalmente em produtos cárneos a histamina pode ser produzida por *Hafnia alvei*, *klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Edwardsiella* spp., assim como por espécies de bactérias lácticas, tais como *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. divergens*, *L. canis*, *L. curvatus* e *L. hilgardii*. Tiramina pode ser produzida por *Streptococci* grupo D, *Enterococcus faecalis*, coliformes e bactérias lácticas, particularmente *L. divergens* e *L. canis*. Algumas cepas de *Enterobacteriaceae* produzem apreciáveis quantidades de cadaverina, enquanto *Pseudomonas* produzem principalmente putrescina.

Especificamente quanto aos níveis de aminas biogênicas, não foram observadas diferenças significativas no total dessas aminas durante os 14 primeiros dias de maturação, mas diferenças significativamente ocorreram a partir do 35º dia. Também entre os tratamentos não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos valores de aminas biogênicas, o que demonstra que a variação racial dos bovinos e a aplicação ou não de estimulação elétrica da carcaça não causaram efeito significativo nos teores de aminas biogênicas das amostras de carne dos diferentes tratamentos estudados.

A tiramina (TIM), embora não tenha sido detectada no tempo 0, foi detectada no decorrer do processo de maturação. Seu teor aumentou consideravelmente aos 35 dias de maturação e sofreu uma queda, nem sempre significativa (Tab.3), ao final do acondicionamento das carnes (56 dias). O valor máximo encontrado para essa amina foi  $46,9 \text{mg.kg}^{-1}$  (35º dia, amostras de animais Red Angus sem estímulo elétrico da carcaça). Comportamento semelhante não foi observado em outros estudos documentados sobre aminas em carne bovina maturada.

A quantidade de serotonina encontrada no final do período (aos 56 dias de maturação) foi um levemente superior na carne de animais Red Angus do que na carne de animais mestiços. Sabe-se que uma diferença na concentração tanto dessa quanto de outras aminas, dependente da amostra e do tratamento, pode indicar uma diferença

também na microbiota espécie específica presente, porém os resultados obtidos pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos em tempos iguais demonstraram que esse conteúdo mais elevado de serotonina em cortes cárneos de carcaças de animais Red Angus não é significativamente diferente daqueles de animais mestiços. Assim, para fins estatísticos, os teores de serotonina não foram diferentes entre as subespécies bovinas avaliadas nesse estudo.

#### **4.4. Correlações e indicadores de qualidade da carne bovina**

Ao longo do tempo de maturação, correlações significativas ( $p < 0,01$ ) foram observadas entre as contagens de microrganismos e os totais de amins das amostras (Tab.4). Resultados semelhantes foram observados por Yano *et al.* (1995), Halász *et al.* (1994), Masson *et al.* (1999) e Veciana-Nogués *et al.* (1997) para carne bovina, suína e de peixe. Esses resultados sugerem que a formação de amins em carne sofre influência de fatores semelhantes.

As enzimas aminoácido-descarboxilases de origem bacteriana desempenham um papel fundamental na formação de amins biogênicas e, dessa forma, os microrganismos que as produzem são também de extrema importância (RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Slemr (1981 apud RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004) e Slemr e Beyermann (1985 apud RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004) reportam que não houve formação de amins biogênicas em carnes esterilizadas, e que quando suas concentrações aumentavam em carnes, eram acompanhadas pelo aumento no número de microrganismos. Diversos trabalhos têm tentado estabelecer a relação entre a formação de amins biogênicas em carnes e derivados e a atividade de grupos específicos de microrganismos. Em geral, a atividade de enzimas descarboxilase é atribuída à espécies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Micrococaceae* e bactérias lácticas (SILLA-SANTOS, 1996; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004). Diferenças na concentração e nos tipos de microrganismos pode ajudar a explicar a grande variação na concentração de amins biogênicas encontrada em produtos cárneos, sobretudo nos embutidos fermentados (MAIJALA e EEROLA, 1993; ROIG-SAGUÉS e EEROLA, 1997).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre contagens de microrganismos, teores totais de aminos e tempo de maturação.

Tratamento	Coeficiente de correlação (r)
<b>Red Angus</b>	
<i>Com estímulo</i>	CPP – Tempo (0,934)
	BAL – Tempo (0,957)
	Total de Bioativas - Tempo (0,900)
	Total de Biogênicas – Tempo (0,923)
	Total de Poliaminas – Tempo (0,426)
	CPP - BAL (0,926)
	BAL - Total de Biogênicas (0,857)
BAL - Total de Bioativas (0,832)	
<i>Sem estímulo</i>	CPP - Tempo (0,802)
	BAL - Tempo (0,960)
	Total de Bioativas - Tempo (0,875)
	Total de Biogênicas – Tempo (0,852)
	Total de Poliaminas – Tempo (0,735)
	CPP - BAL (0,936)
	BAL - Total de Biogênicas (0,687)
BAL - Total de Bioativas (0,727)	
<b>Mestiço</b>	
<i>Com estímulo</i>	CPP – Tempo (0,938)
	BAL - Tempo (0,956)
	Total de Bioativas – Tempo (0,966)
	Total de Biogênicas – Tempo (0,950)
	Total de Poliaminas – Tempo (0,905)
	CPP - BAL (0,909)
	BAL - Total de Biogênicas (0,947)
BAL - Total de Bioativas (0,962)	
<i>Sem estímulo</i>	CPP – Tempo (0,948)
	BAL – Tempo (0,957)
	Total de Bioativas – Tempo (0,946)
	Total de Biogênicas – Tempo (0,888)
	Total de Poliaminas – Tempo (0,834)
	CPP - BAL (0,964)
	BAL - Total de Biogênicas (0,689)
BAL - Total de Bioativas (0,758)	

CPP: Contagem padrão em placa de microrganismos aeróbios; BAL: Contagem de bactérias lácticas;

O estabelecimento de uma relação entre a qualidade da carne e as mudanças nos conteúdos individuais ou combinados de aminos biogênicas tem sido bastante estudado. Os valores obtidos usando o índice de qualidade química (IQQ) proposto por Mietz e Karmas (1977 apud SHALABY, 1996) estão demonstrados na Tab.5. O aumento no IQQ foi observado somente aos 35 dias de maturação, para as carnes sem estímulo elétrico, mas não suficientemente alto para mudar a qualidade das carnes, que

permaneceram boas (produtos frescos) durante todo o condicionamento, de acordo com o critério estabelecido por aqueles autores.

A aplicação, nesse estudo, do índice de aminas biogênicas (IAB) proposto por Veciana-Nogués *et al.* (1997) conferiu resultados de qualidade das amostras diferentes daqueles obtidos com a aplicação do IQQ. Até o 14º dia de maturação os valores foram inferiores de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , o que significa, segundo a autora, um produto adequado para o consumo. No entanto, aos 35 dias percebe-se um aumento considerável na concentração de aminas em todos os tratamentos. Nos grupos sem estímulo elétrico esses valores foram  $> 50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , caracterizando um produto impróprio para o consumo, segundo o conceito de Veciana-Nogués *et al.* (1997). No 56º dia, porém, esses altos valores não se confirmaram, e nenhum tratamento mostrou-se em estágio avançado de decomposição (IAB $>50\text{mg}$ ).

De forma semelhante, Silva e Glória (2002), ao aplicarem, em carne de frango, os mesmos índices de qualidade baseados em aminas, também encontraram valores conflitantes, que nem sempre condiziam com a realidade de seus espécimes. Desenvolveram então um índice baseado na razão entre espermidina e espermina, que melhor representou seus resultados. Como mostra a Tab.5, de acordo com o índice EPD/EPM, a carne bovina submetida a diferentes tratamentos, armazenada a vácuo, sob refrigeração ( $-1,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) durante 56 dias, reportadas no presente estudo, apresentaram-se frescas, sem sinais de deterioração até o final do período.

Tabela 5. Índices de qualidade obtidos para carne bovina maturada.

Tratamento/ Tempo (dias)	Índices de Qualidade (média±desvio-padrão; n=3)		
	Mietz e Karmas <sup>a</sup>	Veciana-Nogués (mg.kg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Silva e Glória <sup>c</sup>
<b>Red Angus</b>			
<b>Com estímulo</b>			
0	0,09±0,02	3,63±1,14	0,07±0,03
7	0,06±0,03	2,67±1,04	0,47±0,68
14	0,09±0,03	3,1±0,7	0,07±0,02
35	0,06±0,03	45,00±22,38	0,06±0,03
56	0,09±0,02	30,65±35,56	0,04±0,01
<b>Red Angus</b>			
<b>Sem estímulo</b>			
0	0,09±0,02	3,33±0,64	0,15±0,16
7	0,08±0,02	0,31±0,06	0,08±0,01
14	0,13±0,04	2,97±0,51	0,22±0,24
35	0,61±0,95	75,67±62,8	0,10±0,04
56	0,05±0,00	28,1±10,61	0,05±0,01
<b>Mestiço</b>			
<b>Com estímulo</b>			
0	0,08±0,00	3,1±0,2	0,20±0,21
7	0,09±0,03	2,8±0,7	0,09±0,02
14	0,08±0,01	3,37±0,57	0,06±0,03
35	0,17±0,21	42,73±22,72	0,12±0,01
56	0,07±0,01	40,3±13,9	0,07±0,03
<b>Mestiço</b>			
<b>Sem estímulo</b>			
0	0,06±0,02	2,55±0,64	0,08±0,04
7	0,07±0,02	2,47±0,6	0,07±0,02
14	0,06±0,01	2,37±0,3	0,06±0,02
35	0,30±0,27	54,4±24,5	0,09±0,01
56	0,08±0,03	26,55±7,0	0,07±0,01

a (PUT+CAD+HIM)/(1+SPM+SPD). Valores de 0-1 = produto fresco; 1-10 = estágio inicial de decomposição; >10 = estágio avançado de decomposição.

b (PUT+CAD+HIM+TIM). Valores >50 indicam produto em estágio avançado de decomposição.

c (EPD/EPM). Valores <0,50 = produto fresco; 0,50-0,70 = produto para consumo imediato; e >0,70 = produto em estágio avançado de decomposição.

Segundo Ruiz-Capillas e Jiménez-Colmenero (2004), nem todos os microrganismos deteriorativos ou fermentativos são capazes de descarboxilar os aminoácidos livres. Mesmo dentro da mesma espécie, não são todas as cepas que desenvolvem atividade descarboxilase. Assim, uma baixa concentração de aminas nem sempre indica boa qualidade microbiológica. Por outro lado, o contrário também é verdadeiro. Aminas biogênicas foram encontradas em carne bovina, armazenada a 1°C, por 120 dias, acondicionada a vácuo (SMITH *et al.*, 1993), onde níveis significativos foram detectados a partir do 20º dia. Os autores relatam que no decorrer do processo de maturação, até os 120 dias, a carne estava sensorialmente aceitável, porém os teores

de aminos eram suficientes para colocar em risco a saúde de indivíduos mais sensíveis. Assim, como já afirmaram Shalaby (1996) e Silva e Glória (2002), é difícil estabelecer um índice que seja aplicável aos diversos tipos de alimentos existentes, pois são muitos os fatores que interferem na formação de aminos em cada alimento em especial.

## 5. CONCLUSÕES

1. Os tratamentos utilizados nesse experimento não demonstraram causar diferenças significativas nas contagens totais de microrganismos aeróbios viáveis e bactérias lácticas, bem como nos teores de aminas da carne maturada por até 56 dias ( $-1,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ );
2. No decorrer do processo de maturação das amostras de carne bovina houve correlação positiva, significativa ( $p < 0,001$ ), entre as contagens de microrganismos aeróbios e bactérias lácticas e tempo de maturação.
3. Nas amostras de carne bovina estimuladas eletricamente houve correlação positiva ( $p < 0,001$ ) entre a contagem de bactérias lácticas e total de aminas bioativas.
4. Correlação ao nível de 1% de significância não foi observada em amostras de carne maturadas de carcaças bovinas não estimuladas eletricamente, independentemente da raça.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D.D.; GOES, R.H.T.B. & MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina. *Ciência Animal Brasileira*, v.6, p.135-149, 2005.

BAIXAS-NOGUERAS, S.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, T. & VIDAL-CAROU, M.C. Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8 °C) and stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6504-6510, 2002.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 341-346, 1995.

BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A. & PUSZTAI, A. Polyamines in food-implications for growth and health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.4, p.66-71, 1993.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L. & BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v.33, p.103-120, 1996.

BOVER-CID, S.; MIGUELEZ-ARRIZADO, M.J.; MORATALLA, L.L.L. & VIDAL-CAROU, M.C. Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Science*, v.72, p.62-68, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, e alterações. DOU. Brasília: atualizado em 1997.

BRINK, B.T.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.L.J. & VELD, J.H.J.H. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.11, p.73-84, 1990.

CACCIOPPOLI, J.; CUSTÓDIO, F.B.; VIEIRA, S.M.; COELHO, J.V. & GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas e características físico-químicas de salames tipo italiano. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, p.648-657, 2006.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISØEN, U. & RØNNING, H.F. Dietary polyamines. *Food Chemistry*, v.78, p.273-280, 2002.

EMBRAPA. Noções de ciência da carne. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/03nocoescarne.html>>. Acesso em: 22/03/2005.

FELÍCIO, P.E. Produção e qualidade da carne bovina. Revista Nacional da Carne, São Paulo, ano 20, n.232, p.52-62, 1996.

FELÍCIO, P.E. In: I Congresso Brasileiro das Raças Zebuínas. Anais... Associação Brasileira de Criadores de Zebu. Uberaba MG, p. 63-71, 1994.

FRANCO, B.D.G. & LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996.

GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. Meat Science, v.43, pS99-S109, 1996.

GILL, C.O. & BADONI M. Microbiological and organoleptic qualities of vacuum-packaged ground beef prepared from pasteurized manufacturing beef. International Journal of Food Microbiology, v.74, p.111-118, 2002.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L. & HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in Food Science and Technology, v. 5, p. 42-49, 1994.

HEINEMANN, R.J.B. & PINTO, M.F. Efeito da injeção de diferentes concentrações de cloreto de cálcio na textura e aceitabilidade de carne bovina maturada. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.23S, p.146-150, 2003.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A. & VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines and polyamines contents in meat and meat products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.45, p.2098-2102, 1997.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, M.T. & VIDAU-CAROU, M.C. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.44, p.2710-2715, 1996.

HOLLEY, R.A. & GILL, C.O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. Traduzido por YAMADA, E.A. Disponível em: <[http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro\\_congresso/5.doc](http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro_congresso/5.doc)>. Acesso em: 15/01/2006.

HWANG, I.H.; DEVINE, C.E. & HOPKINS, D.L. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. Meat Science, v.62, p.677-691, 2003.

ILIAN, M.A.; BEKHIT, A.E. & BICKERSTAFFE, R. The relationship between meat tenderization, miofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging. Meat Science, v.66, p.387-397, 2004.

JATURASITHA, S., THIRAWONG, P., LEANGWUNTA, V. & KREUZER, M. Reducing toughness of beef from *Bos indicus* draught steers by injection of calcium chloride: effect of concentration and time postmortem. *Meat Science*, v.68, p.61-69, 2004.

JONES, R.J. Observation on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology*, v. 90, p.273-282, 2004.

KALAC, P. & KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, v.90, p.219-230, 2005.

KALAC, P., KRIZEK, M., PELIKONOVA, T., LANGOVA, M. & VESKRNA, O. Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry*, v.90, p.561-564, 2005.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*, v.36, p.93-104, 1994.

KUBOTA, E.H.; OLIVO, R. & SHIMOKOMAKI, M. Maturação da carne um processo enzimático. *Revista Nacional da Carne*, v. 18, p.12-15, 1993.

LAPA-GUIMARÃES, J.G. Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas, 2005, 139f.

LAPA-GUIMARÃES, J.; FELÍCIO, P.E. & CONTRERAS, E.S.G. Chemical and microbial analyses of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice. *Food Chemistry*, v.91, n.3, p.477-483, 2005.

LAWRENCE, R.W.; DOYLE, J.; ELLIOTT, R.; LOXTON, I.; MCMENIMAN, J.P.; NORTON, B.W.; REID, D.J. & TUME, R.W. The efficacy of a vitamin D3 metabolite for improving the myofibrillar tenderness of meat from *Bos indicus* cattle. *Meat Science*, v.72, p.69-78, 2006.

LAWRIE, R.A. *Ciência da carne*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

MAIJALA, R. & EEROLA, S. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*, v.35, p.387-395, 1993.

MANÇO, M.C.W. Efeito da idade de abate em parâmetros post-mortem e na maturação da carne de bovinos da raça Nelore. Dissertação (Mestrado em Zootecnia/Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2002, 84f.

MANO S.B., PEREDA J.A.O. & FERNANDO G.D.G. Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.22, p.1-10, 2002.

MIETZ, J.L. & KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. *Journal of Food Science*, v. 42, p. 155-158, 1977.

MONSÓN F.; SAÑUDO C. & SIERRA I. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Science* v.68, p.595-602, 2004.

MONTEL, M.C.; MASSON, F. & TALON, R. Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sciences des aliments*, v.19, p.247-254, 1998.

MORET, S. & CONTE, L.S. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in food: an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, v.729, p.363-369, 1996.

NAPRAVNIKOVA, E.; VORLOVA, L. & MALOTA, L. Changes in hygienic quality of vacuum-packaged pork during storage. *Acta Vet. Brno.*, v.71, p.255-262, 2002.

OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F. & UDAKA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 61, n. 9, p. 1582-1584, 1997.

OLIVEIRA, J. Efeito da desossa a quente e da temperatura de condicionamento na qualidade microbiológica da carne bovina embalada a vácuo. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP. Campinas, 2003, 74f.

OLIVEIRA, G.E. Influência da temperatura de armazenamento nas características físico-químicas e nos teores de aminas bioativas em ovos. Dissertação (Mestrado Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia/UFMG. Belo Horizonte, 2006, 79p.

ÖNAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, v.103, p.1475-1486, 2007.

PALKA, K. The influence of post-mortem ageing and roasting on the microstructure, texture and collagen solubility of bovine semitendinosus muscle. *Meat Science*, Barking, v.64, p.191-198, 2003.

PRATES, J.A.M. Maturação da carne dos mamíferos: Caracterização geral e modificações físicas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Lisboa, v.95, p.34-41, 2000.

ROÇA, R. O. Tecnologia da carne e produtos derivados. Botucatu: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, FCA, UNESP, 2001.

ROIG-SAGUÉS, A. & EEROLA, S. Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sake* starter strains and an amine-positive lactic acid bacterium. *Z. Lebensm Unters Forsch A*, v.205, p.227-231, 1997.

RUBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E. & TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.18, p.405-409, 1998.

RUIZ-CAPILLAS, C. & MORAL, A. Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, v.66, n.7, p.1030-1032, 2001a.

RUIZ-CAPILLAS, C. & MORAL, A. Changes in free amino acids during chilled storage of hake (*Merluccius merluccius* L.) in controlled atmospheres and their use as a quality control index. *European Food Research and Technology*, v. 212, p. 302–307, 2001b.

RUIZ-CAPILLAS, C. & JIMÉNEZ-COLMERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.44, p.489-499, 2004.

RUIZ-JIMÉNEZ, J & LUQUE DE CASTRO, M.D. Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis: determination of biogenic amines in food. *Journal of Chromatography A*, v.1110, p.245-253, 2006.

SACCANI G.; TANZI E.; PASTORE P.; CAVALLI S. & REY M. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column. *Journal of Chromatography A*, v.1082, p.43-50, 2005.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A. & REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 C. *Food Microbiology*, v.17, p.329-340, 2000.

SANTOS, W.C.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P. & GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32°C. *Food Chemistry*, v.81, p.595-606, 2003.

SAÑUDO, C.; MACIE, E.S.; OLLETA, J.L.; VILLAROEL, M.; PANEA, B. & ALBERTÍ, P. The effects of slaughter weight breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, v.66, p.925-932, 2004.

SALAZAR, M.T.; SMITH, T.K.; HARRIS, A. High-performance liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in feedstuffs, complete feeds, and animal tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 1708-1712, 2000.

SHALABY, A. L. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, v. 29, n.7, p.675-690, 1996.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 29, p.213-231, 1996.

SILVA, C.M.G. & GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at  $4 \pm 1$  °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry*, v. 78, p. 214-248, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. & SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo, SP: Varela, 1997.

SMITH, J.S. et al. 1993. Biogenic amines formation in fresh vacuum-packaged beef during storage at 1°C for 120 days. *Journal of Food Protection*, v.6, p.497-500,532.

STOLOWSKI, G.D.; BAIRD, B.E.; MILLER, R.K.; SAVELL, J.W.; SAMS, A.R.; TAYLOR, J.F.; SANDERS, J.O. & SMITH, S.B. Factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses. *Meat Science*, v.73, p.475-483, 2006.

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

TSITSILONIS, O.E.; STOEVA, S.; ECHNER, H.; BALAFAS, A. MARGOENOU, L.; KATSOUHAS H.L.; TROY, K.D.; VOELTER, W.; PAPAMICHAIL, M. & LYMBERI, P. A skeletal muscle troponin-T specific ELISA based on the use of an antibody against the soluble troponin T (16-31) fragment. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v.268, p.141-148, 2002.

VALE, S.R. & GLÓRIA, M.B.A. Methodology for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International*, v. 80, n. 5, p. 1006-1012, 1997.

VECIANA-NOGUÉS, M.C.; 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 organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 2036-2041, 1997.

VELD, J.H. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*. V.33, p.1-18, 1996.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F. & DEBEVERE, J. Evaluation of meat Born lactic acid bacteria as protective cultures for biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v.96, p.149-164, 2004.

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

YANO, Y.; KATAHO, N.; WATANABE, M.; NAKAMURA, T. & ASANO, Y. Changes in the concentration of biogenic amines and application of tyramine sensor during storage of beef. *Food Chemistry*, v.54, p.155-159, 1995.

YAMADA, E. A. A produção de salames. *Revista Nacional da Carne*, n. 220, p. 72-75, 1995.

WHITE, A.; O'SULLIVAN, A.; TROY, D.J. & O'NEILL, E.E. Effects of electrical stimulation, chilling temperature and hot-boning on the tenderness of bovine muscles. *Meat Science*, v.73, p.196-203, 2006.

WIKLUND, E.; STEVENSON-BARRY, J.M.; DUNCAN, S.J. & LITTLEJOHN, R.P. Electrical stimulation of red deer (*Cervus elaphus*) carcasses – effects on rate of pH-decline, meat tenderness, colour stability and water-holding capacity. *Meat Science*, v.59, p.211-220, 2001.