

HISTAMINA EN QUESOS MADURADOS: MANCHEGO, PARMESANO Y DE AÑO

Histamine in Maturated Cheeses: Manchego, Parmesano and Year

Pedro Izquierdo, María Allara, Gabriel Torres, Aiza García, Yasmína Barboza y María Isabel Piñero

Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. E-mail: izquier@cantv.net ~ allara@mipunto.com

RESUMEN

La presencia de Histamina en quesos madurados, en concentraciones de 500 partes por millón (ppm), ha sido asociada con intoxicaciones. Los objetivos de esta investigación fueron determinar la concentración de histamina en quesos madurados tipo: de Año, Manchego y Parmesano, así como identificar bacterias del género *Lactobacillus* productoras de histamina. Se analizaron 12 muestras de cada queso, éstas fueron sembradas en agar nutritivo y caldo Man Rogosa Sharpe (MRS), para el aislamiento de *Lactobacillus*. Los lactobacilos se identificaron mediante pruebas de catalasa, oxidasa, tinción de Gram y sistema API. Se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Resolución para determinar Histamina en cada muestra de queso y la producida por cepas del género *Lactobacillus*. Se determinó el porcentaje NaCl por la técnica Mercurimétrica. Los resultados mostraron que las concentraciones promedio de histamina (ppm) fueron, en el queso de Año 113; Manchego 109 y Parmesano 152. Los *Lactobacillus* productores de histamina en Parmesano fueron: *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum 1*, *L. rhamnosus*. En Manchego *L. buchneri*, mientras que en queso de Año no se aislaron bacterias, posiblemente debido a la concentración de NaCl (6,9%), a diferencia de la del queso Parmesano (2,5%) y Manchego (3,5%). Se concluye que aunque las concentraciones de histamina no sobrepasaron los límites tóxicos (500 ppm) de la FDA, exceden los límites tolerables (50 ppm); y que las bacterias del género *Lactobacillus* aisladas poseen potencial para la producción de histamina.

Palabras clave: Histamina, cromatografía líquida de alta resolución, *Lactobacillus*, quesos madurados.

ABSTRACT

Histamine levels of 500 parts per million (ppm), has been associated with poisoning related to the consumption of maturated

cheeses. The objectives of this work were to determine histamine concentrations in parmesan, manchego and año cheese, and isolate and identify histamine producing strains of *Lactobacillus* in these cheeses. 12 samples of each cheese were analyzed, inoculated in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar, for *Lactobacillus* isolation. *Lactobacilli* were identified using catalase, oxidase, Gram dyeing and API identification gallery. In order to quantify histamine in cheese and each isolated bacteria, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used. NaCl was determined using mercurimetric technique. Mean histamine concentration for año cheese was 113 ppm, for manchego 109 ppm and for parmesan 152 ppm. Histamine producing *Lactobacillus* in parmesan cheese were: *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum 1* and *L. rhamnosus*. *L. buchneri* was isolated in manchego cheese, meanwhile there was no bacterial growth in año cheese, maybe due to NaCl concentration (6.9%), greater than concentrations found in Parmesan (2.5%) and Manchego (3.5%). It can be concluded, that although mean values of histamine concentration are not higher than FDA toxic levels (500 ppm), they are higher than tolerable levels (50 ppm); and *Lactobacillus* isolated in this study have potential for histamine production.

Key words: Histamine, High Performance Liquid Chromatography, *Lactobacillus*, aged cheese.

INTRODUCCIÓN

El queso es un producto alimenticio básico en la dieta de la mayoría de los países del mundo. Por su elevado aporte nutritivo es considerado indispensable para complementar una adecuada alimentación, ya que posee un alto contenido de compuestos nitrogenados, grasas, calcio, fósforo y vitaminas, entre las cuales se encuentran las vitaminas A, B₁, B₆, B₅ y ácido nicotínico [16].

El queso es un derivado lácteo que contiene los principales elementos nutritivos de la leche, y se obtiene mediante

la coagulación de la caseína, su proteína más abundante. Puede ser elaborado a partir de diferentes tipos de leche y mediante diferentes técnicas, según la clase de queso que se desee obtener [16].

Aunque el queso es uno de los mejores y más sanos alimentos que puede consumir el hombre, no se descarta la posibilidad de que su consumo provoque intoxicaciones, esto es debido a que el queso madurado representa un ambiente propicio para la producción de aminas biógenas, entre las que destaca la histamina, la cual tiene implicación en la salud del hombre [3]. Estas aminas se producen por la descarboxilación de aminoácidos específicos presentes en los quesos y debido a la actividad de enzimas descarboxilasas de las bacterias implicadas en la maduración de los mismos [11].

La producción de estas aminas puede ocurrir durante la elaboración o maduración del queso, ya que en cualquiera de las dos etapas del proceso de fabricación se favorece el crecimiento bacteriano y como consecuencia de ello, el catabolismo de los componentes del queso por la actividad enzimática bacteriana.

En la elaboración de los quesos madurados Manchego y Parmesano se utilizan cultivos iniciadores, los cuales consisten en cepas de una o varias especies bacterianas cuya función principal es la de producir ácido láctico a partir de la lactosa, regulando el sabor y textura [9]. Entre las bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración del queso se encuentran los estreptococos, leuconostoc y lactobacilos, entre ellos: *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* y *L. casei* [15].

Si los cultivos lácticos utilizados no son suficientemente eficaces o se encuentran contaminados con otros microorganismos, pueden producirse alteraciones que afectan desfavorablemente la calidad del queso [6].

Se ha reportado que una gran variedad de bacterias, en presencia de histidina libre son capaces de producir histamina, debido a que poseen la enzima histidina decarboxilasa. Los géneros bacterianos productores más importantes de histamina son: *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Enterobacter* [3].

Los factores que influyen en la formación de histamina en los quesos madurados son: bacterias presentes, disponibilidad de sustratos y de cofactores apropiados, tiempo de maduración, catabolismo amínico o proteólisis y la existencia de un medio ambiente apropiado, el cual está determinado por la temperatura de almacenamiento, concentraciones de cloruro de sodio y la disponibilidad de agua [10, 11].

La histamina, es la amina biógena que con mayor frecuencia ha sido reportada en los alimentos como agente causal de intoxicaciones alimentarias, por esta razón en la actualidad está siendo objeto de estudio debido a los importantes efectos fisiológicos y toxicológicos que pueden producir en humanos y animales [10, 21]. Si se ingiere en cantidades elevadas, o si los mecanismos naturales para su catabolismo están deprimidos

por medicamentos tales como los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO), se puede afectar la salud del hombre [8].

La histamina es responsable de diversas reacciones químicas en el organismo, como mensajero para estimular la memoria, producir contracción o relajación del músculo liso, estimular el sistema sensitivo o motor y controlar las secreciones gástricas. De esta manera, la intoxicación causada por histamina es manifestada por una amplia variedad de síntomas [17].

El objetivo de esta investigación fue identificar en quesos madurados de Año, Manchego y Parmesano, cepas del género *Lactobacillus*, determinar su capacidad de producción de histamina y cuantificar las concentraciones de histamina en los quesos estudiados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de la muestra

Se analizaron doce muestras de cada uno de los siguientes quesos madurados elaborados en Venezuela: tipo Manchego, Parmesano y Año (un tipo de queso criollo elaborado con leche cruda), las cuales fueron obtenidas en comercios locales, a excepción del queso de año que fue adquirido en el Mercado Popular "Las Pulgas" de la ciudad de Maracaibo. El peso de cada muestra fue de 250g.

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio en una cava con temperatura promedio 15°C, para realizarles los siguientes análisis:

Aislamiento, identificación de *Lactobacillus* y producción de histamina

En la identificación de cepas del género *Lactobacillus*, se empleó la técnica propuesta por Stratton [18]. Se pesaron 10g de cada muestra y se homogeneizaron en 90 mL de agua peptonada 0,9%. A partir de esta dilución (10^1) se prepararon diluciones seriadas desde 10^2 hasta 10^5 , las cuales se sembraron por duplicado en placas de agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS), y se incubaron en una estufa Thelco® a 37°C por 24 a 48 horas en condiciones de microaerofilia (5-10% CO₂). A las colonias presentes en el agar se les realizó la prueba de Gram, así como las pruebas de oxidasa y catalasa [1].

Con la finalidad de determinar la capacidad de producción de histamina de las cepas de *Lactobacillus* aisladas de los quesos madurados estudiados, éstas se sembraron en tubos con caldo MRS suplementado con 2% de L-histidina, 37 nM de Pridoxina o vitamina B₆, e incubados a 37°C por 24 horas en microaerofilia según la técnica recomendada por Zee y col. [22].

A partir de los cultivos anteriores se repicaron placas de agar MRS para obtener colonias puras de las cepas de lactobacilos, las cuales fueron incubadas a 37°C en microaerofilia durante 24 horas.

La identificación de las diferentes especies de *Lactobacillus* se realizó utilizando el kit API 50 CHL Medium 50 410 bioMerieux® (Francia). Los medios de cultivo utilizados en los análisis microbiológicos fueron de la marca Merck®, Alemania.

Cuantificación de histamina

La cuantificación de histamina se realizó con un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución Shimadzu®, constituido por una válvula de inyección Rheodyne, equipado con un loop de 20 µl de capacidad, una bomba modelo LC 6A, una columna de fase reversa Merck® RP 18 Lichrosper de 12,5 cm de longitud por 4,5 mm de diámetro interno y un diámetro de partícula 5 µm, detector de fluorescencia FLD-6A. Para el análisis de los resultados se utilizó el software cromatográfico Class Vp de la marca Shimadzu®.

La fase móvil estuvo constituida por Acetonitrilo al 40% en agua, con 50 mM de NaH₂PO₄·H₂O, utilizando un flujo constante de 1,2 mL/min, según la técnica desarrollada por Gouygou [7]. Se realizaron doce corridas cromatográficas por duplicado de cada tipo de queso. El volumen de inyección fue 20 µL.

Para la extracción de la histamina a partir de las muestras de queso y de caldo MRS, se utilizó la metodología descrita por Zee y col. [22]. De cada queso y caldo MRS se pesaron 10 g o midieron 10 mL, respectivamente, y colocaron en 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, luego se mezclaron en un agitador vortex durante 5 min y centrifugaron a 6000 rpm por 30 min.

El sedimento de la centrifugación anterior se reextrajo tres veces y el sobrenadante obtenido fue ajustado a 100 mL con TCA al 5%. Los sobrenadantes se filtraron secuencialmente a través de filtros Whatman número 1, y membranas Millipore de 0,45 µm de poro. Los extractos se almacenaron a 4°C, para su derivatización con ortoftaldehído (OPA) [7]. La identificación se realizó con un estándar de 50 ppm de histamina en TCA al 5%. Los solventes y reactivos utilizados fueron de la marca Merck®, Alemania.

Determinación de cloruros

El porcentaje de cloruros de los quesos fue analizado utilizando la técnica Mercurimétrica descrita por Faria y col. [5]. Se mezcló 1g de cada queso con 40 mL de H₃PO₄, que fue calentado a ebullición y enfriado posteriormente para adicionarle 5 mL de HNO₃ 25%, mas 2 mL de difenilcarbazona como indicador. La mezcla se tituló con Hg(NO₃)₂ 0,1 N hasta conseguir el punto final el cual se evidenció por el cambio del indi-

cador de rojo a violeta. El porcentaje de Cloruros se obtuvo por el volumen gastado de Hg(NO₃)₂.

Análisis estadístico

El diseño empleado fue completamente aleatorizado, a los resultados obtenidos se les aplicó un Análisis de Varianza con la finalidad de determinar diferencias significativas entre los contenidos promedio de histamina de los diferentes quesos estudiados, con una probabilidad de 5%. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de las medias. Para ello se utilizó el paquete estadístico Statistics, Versión 3,0 [12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bacterias potencialmente productoras de histamina en queso madurado

En la TABLA I se presentan las especies de *Lactobacillus* implicadas como productoras de histamina en los quesos madurados estudiados. Tanto el queso Parmesano como Manchego mostraron diferencias en cuanto a las especies encontradas. Así se tiene que a partir del queso Parmesano se aislaron: *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum 1* y *L. rhamnosus*. Mientras que en el queso Manchego sólo se aisló *L. buchneri*.

Resultados similares al presente estudio fueron reportados por Edwards y Sandine [3], quienes aislaron *L. buchneri* como bacterias productoras de histamina a partir del queso Suizo. Por su parte, Joosten y Northolt en 1989 [13], aislaron e identificaron como bacterias productoras de histamina a partir del queso Gouda: *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. lactis subsp lactis*, *L. buchneri* y *S. faecium*. En 1985, Sumner y col. [20] y Stratton en 1992 [17], aislaron una cepa de *L. buchneri* y la identificaron como productora de histamina en queso Suizo implicado en un brote de intoxicación.

En el queso de Año no se detectó crecimiento de *Lactobacillus*, posiblemente esto se deba al elevado porcentaje de NaCl encontrado, 6,9 % (TABLA I), en contraste con lo detectado en los quesos tipos Parmesano y Manchego, que fue de 2,6 y 3,5% respectivamente.

Es probable que las elevadas concentraciones de NaCl y el bajo contenido de agua (35%) que presenta este queso no permitan el crecimiento bacteriano [4, 14]. Este resultado concuerda con las investigaciones realizadas por Chander y Ba-

TABLA I
LACTOBACILLUS PRODUCTORES DE HISTAMINA Y PORCENTAJE DE NaCl EN QUESOS MADURADOS

Tipo de Queso	Especies de <i>Lactobacillus</i>	% NaCl
Parmesano	<i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum 1</i> , <i>L. rhamnosus</i>	2,6
Manchego	<i>L. buchneri</i>	3,5
Año	ND	6,9

ND: no detectado.

tish [2], quienes reportan inhibición en el crecimiento por parte del *Lactobacillus bulgaricus*, cuando se cultiva en caldo MRS con una concentración de 5% de NaCl. Un resultado similar fue encontrado en quesos madurados, donde reportan que un 5,5% de NaCl, en caldo MRS, inhibe el crecimiento bacteriano y la habilidad de producir histamina por el *Lactobacillus buchneri* [19].

Producción de histamina

En la TABLA II se presentan las concentraciones de histamina expresadas en nmoles/mL/ 24 h producidas en caldo MRS suplementado con histidina por especies del género *Lactobacillus*, identificadas en los quesos madurados estudiados. La mayor concentración de histamina se observó en el queso Parmesano con los siguientes valores: *L. rhamnosus*, 201,6 seguido de *L. fermentum* 187,76; *L. buchneri* 157,23; *L. helveticus* 54,49 y *L. plantarum* 1 con 17,61. Mientras que en el queso Manchego para *L. buchneri* se obtuvo una concentración de 108,34.

Los valores encontrados en el presente estudio son inferiores a los reportados por otros autores tales como Stratton y col. [18], quienes identificaron diferentes especies de *Lactobacillus* productores de histamina en queso suizo. Las bacterias implicadas como productoras de histamina y las concentraciones detectadas, expresadas en nmoles de histamina/mL/24 h, fueron: *L. fermentum* 5180; *L. helveticus* con 2260, también se aislaron dos cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y una cepa de *Enterococcus faecium* quienes produjeron 2450, 1680 y 1530 respectivamente.

Estudios realizados por Sumner [20], señalan que el hallazgo de histamina en los quesos madurados podría deberse a la cantidad de histidina libre disponible en la leche. La leche fresca contiene poca histidina libre, pero las proteínas que la constituyen contienen 9,6 g%. En tal sentido, debido a la proteólisis que ocurre durante la maduración, podría aumentar la concentración de histidina libre. El mismo autor demostró que el queso suizo estaba implicado en intoxicaciones alimentarias, aislando cepas de *L. buchneri* cuya producción de histamina dependía de la disponibilidad de histidina en el medio.

TABLA II
PRODUCCIÓN DE HISTAMINA (nmoles/mL/24h)
DE LACTOBACILLUS AISLADOS DE LOS QUESOS
MADURADOS

Especie de <i>Lactobacillus</i>	Histamina (nmoles/mL/24h)	
	Parmesano	Manchego
<i>L. rhamnosus</i>	201,60	ND
<i>L. fermentum</i>	187,76	ND
<i>L. buchneri</i>	157,53	108,34
<i>L. helveticus</i>	54,49	ND
<i>L. plantarum</i> 1	17,61	ND

ND: no detectado.

En la TABLA III se muestran las concentraciones de histamina expresadas en ppm, en los tres quesos estudiados. El queso Parmesano presentó la mayor concentración 151,65; el queso de Año tuvo una concentración de 113,32, mientras que el queso Manchego presentó la más baja concentración con 100,07. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en las concentraciones de histamina en los tres quesos analizados.

La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, ha establecido una concentración tolerable de histamina en pescado de 50 ppm y una concentración entre 50-200 ppm consideradas como riesgo. Para los quesos no existen concentraciones de histamina establecidas [19].

La FDA establece para los alimentos concentraciones de histamina que no sobrepasen los límites tóxicos de 500 ppm. Los quesos madurados estudiados no exceden estas concentraciones, pero sobrepasan los niveles mínimos establecidos como tolerables por la FDA. Por lo tanto las concentraciones detectadas en el presente trabajo, podrían representar un riesgo para la salud, debido a que el queso posee una variedad de otras aminas biógenas tales como cadaverina, putrescina, triptamina, tiramina, feniletilamina, β - feniletilamina, que se considera potencian el efecto tóxico de la histamina aún cuando sea consumida en pequeñas cantidades, ya que esto ocasiona un efecto inhibitor de las enzimas que la metabolizan [17].

CONCLUSIONES

- Las bacterias productoras de histamina en los quesos madurados estudiados fueron: *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum* 1 y *L. rhamnosus* en queso parmesano; en queso manchego *L. buchneri*. En queso de año no se observó crecimiento bacteriano del género *Lactobacillus*.
- Las concentraciones de histamina detectadas no fueron superiores a los valores reportados en otros países para los mismos quesos. Sin embargo, se resalta la importancia de la capacidad de producción de histamina por especies del género *Lactobacillus* que son utilizadas como cultivos iniciadores.
- Las concentraciones de histamina en las muestras de queso analizadas fueron inferiores a las concentraciones tóxicas establecidas por la FDA.

TABLA III
CONCENTRACIÓN EN PPM DE HISTAMINA
EN QUESOS MADURADOS

Tipo de Quesos	Concentración de Histamina en ppm
Parmesano	151,65
Manchego	100,07
Año	113,32

RECOMENDACIONES

- Determinar y cuantificar las aminos biógenas en los quesos madurados, que pueden actuar como potenciadoras de la histamina.
- Determinar las repercusiones en la utilización de cepas del género *Lactobacillus* productoras de histamina, como cultivos iniciadores para la industria láctea.

AGRADECIMIENTO

Los autores del trabajo agradecen, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, por el financiamiento otorgado para la ejecución de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CASTELLANO, M. **Guía Práctica de Microbiología**. Unidad III. Metabolismo Bacteriano. Cátedra de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia. 112 pp. 1998.
- [2] CHANDER, H.; BATISH, V. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Food Sci.** 54 (27): 940. 1989.
- [3] EDWARDS, S.; SANDINE, W. Public health significance of amines in cheese. **J. Dairy Sci.** 12 (64): 2431-2438. 1981.
- [4] ESCODA, A; HERNÁNDEZ, E. **Estudio del queso Llenero en el estado Zulia**. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. (Trabajo mimeografiado). 75 pp. 1968.
- [5] FARÍA, J.; BOSCAN, L. Aplicación de la Mercurimetría en la Determinación de Cloruros en Productos Lácteos. **Acta Científica Venezolana**. 31:154-160. 1981.
- [6] FRAZIER, W.; WESTHOFF, D. **Microbiología de los Alimentos**. Tercera Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 376-378 pp. 1978.
- [7] GOUYGOU, J.; SINQUIN, C.; DURAND, P. High Pressure Liquid Chromatography Determination of Histamine in Fish. **J. Food Sci.** 52 (4). 925- 927. 1987.
- [8] HOWARD, R. **Sanidad Alimentaria**. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 376-378 pp. 1978.
- [9] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Ecología Microbiana de los Alimentos**. Vol. 2. Productos Alimenticios. Editorial Acribia. Zaragoza España. 505 – 506 pp. 1985.
- [10] ISEA, G.; VILLALOBOS, J. Efecto del Extracto acuoso del queso Manchego sobre la presión arterial del perro. **Revista Científica FCV-LUZ**. IX (3): 231-234. 1999.
- [11] JAMES, W.; SANDINE, W. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. **J. Dairy Sci.** 68 (11): 2840-2846. 1985.
- [12] JOHN, E.; GARY, A. **Estadística Elemental**. Octava Edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 385-419 pp. 1992.
- [13] JOOSTEN, H.; NORTHOLT, M. Detection, growth, and Amine-Producing capacity of Lactobacilli in cheese. **Applied Environm. Microbiol.** 55 (9): 2356-2359. 1989.
- [14] PÉREZ, J.; PÉREZ, P. **Bioquímica y Microbiología de la Leche**. Primera Edición. Editorial Limusa. 134 pp. 1984.
- [15] RANKEN, M. **Manual de Industrias de los Alimentos**. Productos Lácteos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España. 88-93 pp. 1988.
- [16] REVILLA, A. Serie de libros y materiales educativos Nº 53. **Tecnología de la leche**. Editorial II CA. 192-193. 1982.
- [17] STRATTON, J.; HUTKINS, R.; TAYLOR, S. Biogenic Amines in cheese and other Fermented Foods: A Review. **J. Food Prot.** 54 (6). 460- 470. 1991.
- [18] STRATTON, J.; HUTKINS, R.; SUMNER, S.; TAYLOR, S. Histamine and Histamine Producing Bacteria in Retail Swiss and Low Salt Cheeses. **J. Food Prot.** 55 (6): 435-439. 1992.
- [19] SUMNER, S.; ROCHE, F.; TAYLOR, S. Factors Controlling Histamine Production in Swiss cheese Inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **J. Dairy Sci.** 73 (11): 3050-3058. 1990.
- [20] SUMNER, S.; SPECKHARD, M.; SOMERS, E.; TAYLOR, S. Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. **Applied Environm. Microbiol.** 50 (4): 1094-1096. 1985.
- [21] VALE, S.; GLORIA, B. Biogenic amines in Brazilian cheeses. **Food Chem.** 63 (3): 343-348. 1998.
- [22] ZEE, J.; SIMARD, R.; HEUREUX, L.; LEBENS, W. Technol. **Food Sci. Technol.** 18: 245 - 248. 1985.