

AMINAS BIÓGENAS Y CRECIMIENTO BACTERIANO EN CARNE DE HAMBURGUESAS

Biogenic Amines and Microbial Growth on Hamburgers Meat

Pedro Izquierdo¹, María Allara¹, Gabriel Torres¹, Marlory Sánchez², Gabriela Peña² y Mónica Sangronis²

¹Unidad de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia

²Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. E-mail: izquier@cantv.net; allara@mipunto.com

RESUMEN

Se determinó el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre el recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias potencialmente productoras de aminas biógenas en dos marcas de carne de hamburguesa (A y B). Cincuenta y seis (56) muestras, fueron almacenadas a -10, 4 y 10°C, durante 96 horas. A las 0 (menos de seis horas de preparación), 48 y 96 horas, se retiró una muestra de cada temperatura, con la finalidad de realizar recuento de aerobios mesófilos (RAM), recuento e identificación de Enterobacterias, según ICMSF, y concentración de aminas biógenas (hora 0) por cromatografía líquida de alta resolución. El mayor RAM para las marcas A y B se produjo a 10°C a 96 horas, 5,83 y 6,86 log UFC/g, respectivamente, el menor valor se encontró en el tiempo 0, siendo 5,06 para la marca A y 4,91 para la marca B. A 4 y 10°C, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el recuento de enterobacterias entre las marcas A y B, a partir de 48 horas. Se identificaron las enterobacterias potencialmente productoras de aminas biógenas: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, y las aminas biógenas espermina, espermidina, cadaverina y serotonina, en concentraciones inferiores a los límites máximos (200-500 ppm). Conclusión: se observaron incrementos significativos en el recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias en ambas marcas de carne de hamburguesa almacenadas a 4 y 10°C a partir de 48 horas. Las concentraciones de aminas biógenas no excedieron los límites establecidos.

Palabras clave: Aminas biógenas, crecimiento bacteriano, hamburguesas.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the effect of temperature and storage time on aerobic mesophilic bacteria and

enterobacteria potentially producer of biogenic amines, in two brands (A and B) of hamburger's meat. Fifty six (56) samples were purchased and stored at -10, 4 and 10°C during 96 hours. A sample was taken from each temperature at the 0 (less of six hours of preparation), 48 and 96 hours, to count aerobic mesophilic bacteria (RAM), and enterobacteriaceae according ICMSF. *Enterobacteriaceae* colonies were tested for their identification. Biogenic amines concentration was determined by high performance liquid chromatography. The highest RAM for brands A and B was produced at 10°C and 96 hours, 5.83 and 6.86 log UFC/g; and the lowest values were found at time 0, being 5.06 for brand A, and 4.91 for brand B. Significant differences ($P < 0.05$) were found at 4 and 10°C in enterobacteria count from 48 hours in both brands. Potentially biogenic amine producing enterobacteria were identified: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*. Spermine, spermidine, cadaverine and serotonine were detected in concentrations lower than the maximum allowed values (200-500 ppm). In conclusion, significant increases in aerobic mesophilic and enterobacteria counts were detected for both brands of hamburger meat stored at 4 and 10°C from 48 hours. Although biogenic amine producing enterobacteria were found, they didn't exceed allowed limits.

Key words: Biogenic amines, bacterial growth, hamburger.

INTRODUCCIÓN

La carne fresca que constituye la materia prima para la elaboración de hamburguesas, puede presentar cierta contaminación bacteriana, ya sea endógena (antes de la muerte del animal) o exógena, la cual se produce después de la muerte del animal, en los subsiguientes episodios de desangramiento, evisceración, y en la preparación de la canal, debido a la utilización de utensilios contaminados, condiciones higiénicas de la sala de matanza y del personal que allí labora. Obtenida la canal, ésta continúa expuesta a la contamina-

ción bacteriana en los procesos de almacenamiento, refrigeración, transporte, distribución, industrialización y manipulación doméstica [13, 14].

La carne, presenta enzimas tisulares (constitutivas) y enzimas microbianas (producto de la contaminación existente). Estas enzimas actúan después de la muerte del animal por un proceso denominado autólisis, dando origen a cierto grado de hidrólisis de las proteínas (proteólisis) de los tejidos musculares y conectivos, y de las grasas (lipólisis). La autólisis predispone a los productos cárnicos convirtiéndolos en sustratos favorables para el crecimiento microbiano, debido a la liberación de péptidos y aminoácidos, los cuales son utilizados por los microorganismos presentes [18].

Los cortes de carnes frescas poseen una flora microbiana mixta que contamina principalmente la superficie, los géneros más frecuentemente encontrados son *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micobacterium* y *Micrococcus* [9]. Entre éstos pueden estar aquellos que contengan enzimas descarboxilasas, existiendo así todos los elementos favorables para la formación de aminas biógenas [18].

Las aminas biógenas se forman como consecuencia de la proliferación bacteriana [1]. Numerosas bacterias han sido reportadas como poseedoras de capacidad de formación de aminas biógenas: *Escherichia coli*, *Aeromonas sp*, *Enterobacter sp*, *Citrobacter sp* [15]. Cuando están presentes en carne fresca y procesada, son indicadores de deficiente calidad sanitaria, elevada contaminación y condiciones inapropiadas durante el procesamiento y almacenamiento, que afectan la higiene alimentaria [3].

Estos compuestos químicos producen efectos tóxicos y farmacológicos en el organismo, las aminas biógenas psicoactivas actúan sobre los neurotransmisores en el sistema nervioso central, mientras que las aminas biógenas vasoactivas actúan tanto directa como indirectamente sobre el sistema vascular [5, 7, 15, 20]. La histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermina y espermidina, han sido consideradas como las más importantes en los alimentos, causantes de numerosos episodios de intoxicación por el consumo de pescados, quesos madurados, vinos, en especial el tinto y productos cárnicos, entre los cuales están las salchichas secas, pastrami, salami y carnes no procesadas [17].

La temperatura es uno de los factores que influye en la viabilidad y desarrollo microbiano, debido a que interviene favorablemente en el crecimiento de microorganismos y por lo tanto, en la producción de aminas biógenas. El uso de temperaturas inferiores a 10°C y preferiblemente a 5°C o menos, es recomendable para disminuir la formación de estos compuestos [2, 11].

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre el número de aerobios mesófilos y enterobacterias, potencialmente productoras de aminas biógenas en dos marcas de carne de hamburguesas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de la muestra

Se adquirieron 56 muestras de dos marcas de carne de hamburguesa lista para cocinar, denominadas A y B (28 de cada marca), que fueron preparadas el mismo día del muestreo (las muestras se adquirieron con menos de seis horas de preparación), en dos supermercados de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Se realizó un total de cuatro muestreos, con intervalo de tres semanas.

Las muestras fueron transportadas en cavas de anime al laboratorio, donde se procesaron en un lapso inferior a seis horas de su preparación; cada una fue dividida asépticamente en 2 porciones de tamaño similar, que se colocaron en bolsas plásticas herméticamente cerradas y se almacenaron en refrigeradores con temperaturas controladas de -10, 4 y 10°C, durante 96 horas. La temperatura de -10°C representa la temperatura promedio de un congelador, 4°C la del establecimiento de expendio del producto y 10°C la de un refrigerador doméstico.

El día de llegada de la carne de hamburguesa al laboratorio, que corresponde a la hora 0, además de los tiempos de almacenamiento de 48 y 96 horas, se retiró una muestra almacenada a cada una de las temperaturas, con la finalidad de realizar por duplicado las siguientes determinaciones:

Análisis microbiológico

Se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-4}), según la metodología propuesta por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) [12], a partir de las cuales se determinó recuento de aerobios mesófilos (RAM), utilizando agar plate count, y recuento e identificación de Enterobacterias, utilizando agar violeta rojo bilis dextrosa, en placas sembradas por profundidad; el recuento de las colonias formadas (UFC/g) se realizó con un contador de colonias Fisher. Las colonias color púrpura características de Enterobacterias, se sembraron en agar nutritivo con la finalidad de realizar la prueba de la oxidasa. Las colonias oxidasa negativa, fueron inoculadas en el medio triple azúcar hierro, a partir del crecimiento en ese medio se realizaron pruebas bioquímicas según Zinsser [22]. Todos los medios utilizados fueron adquiridos de la marca Merck.

Análisis químico

Se determinó la presencia y concentración de las aminas biógenas: putrescina, cadaverina, triptamina, histamina, feniletilamina, serotonina, tiramina, espermidina y espermina, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo la metodología propuesta por Eerola y col. [8].

Para la extracción de las aminas biógenas, 2 g de carne fueron adicionados de 10 mL de ácido perclórico 0,4 M, y homogenizados utilizando un homogenizador Ultraturrax[®]. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 3500 rpm, el sobrenadan-

te fue filtrado con papel Whatman N° 2. Al sedimento se le agregó 10 mL de ácido perclórico, que fue centrifugado y filtrado, combinándose los sobrenadantes y ajustando a un volumen de 25 mL con ácido perclórico 0,4 M.

Con la finalidad de formar un derivado fluorescente, 1 mL de la muestra fue mezclado con 200 µl de NaOH 2N, 300 µl de Na₂CO₃ saturado y 2 mL de cloruro de dansilo en una concentración de 0,01mg/mL, incubado a una temperatura de 40°C por 45 min. Transcurrido el tiempo se agregó 100 µl de amoníaco y se filtró a través de un filtro millipore (tamaño de poro 0,22 µm). Posteriormente 20 µl del filtrado se inyectaron en el cromatógrafo.

El cromatógrafo líquido Shimadzu de la serie 6 A, estuvo integrado por una válvula de inyección manual Rheodyne con un loop de 20 µl de capacidad, una bomba LC-6 A, una columna de fase reversa Merck, RP-18 Lichrospher de 12,5 cm de longitud por 4,5 mm de diámetro interno, tamaño de las partículas de sílica 5 µm. Se utilizó un detector UV-Visible modelo SPD-6AD, a una longitud de onda de 254 nm.

Las condiciones de trabajo del equipo consistieron en un sistema isocrático con una fase móvil constituida por Acetonitrilo: Acetato de Amonio 0,1M, en dos proporciones, la primera 55:45 para la detección de histamina, putrescina, feniletilamina, cadaverina y triptamina. La segunda 78:22 para la detección de serotonina, tiramina, espermina y espermidina. El flujo fue 0,8 mL/min. El registro y análisis de la data se realizaron con el software cromatográfico class-VP marca Shimadzu.

La detección y cuantificación de las aminas se realizó por comparación del tiempo de retención de la muestra y del estándar de referencia, que consistió en una mezcla con una concentración de 20 ppm de las aminas estudiadas, preparada en una solución de ácido perclórico 0,4 M, a partir de una solución madre de 500 ppm en agua destilada.

Análisis estadístico

Se aplicó un diseño factorial 2x3x3, siendo los factores estudiados: dos marcas de hamburguesas (A y B), tres niveles de temperatura (-10, 4, 10°C) y tiempo a tres niveles diferentes (0, 48, 96 h). A los tratamientos les fueron asignadas las unidades experimentales en forma aleatoria, las variables dependientes RAM y recuento de enterobacterias, mientras que las independientes fueron temperatura y tiempo. Los datos se analizaron mediante el software estadístico SAS PROC-GLM [16]. Las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey, con un nivel de significación de 0,05 [6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de Aerobios Mesófilos

En la TABLA I, se muestran los valores promedio de recuento de aerobios mesófilos (RAM), expresados en log UFC/g, en dos marcas de carne de hamburguesas a tres tem-

peraturas y tiempos de almacenamiento. El mayor recuento para las marcas A y B se produjo a 10°C en un tiempo de 96 horas, 5,83 y 6,86 respectivamente, mientras que el menor valor se encontró en el tiempo 0, siendo 5,06 para la marca A y 4,91 para la marca B.

En la marca A, a las temperaturas de -10 y 4°C, no se observaron diferencias significativas en el RAM durante 96 horas de almacenamiento, mientras que a 10°C se observó un incremento significativo (P<0,05) a partir de 48 horas. Por su parte, en la marca B, a -10°C no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los tiempos de almacenamiento, mientras que a 4 y 10°C se observó un incremento significativo (P<0,05) en el RAM a partir de 48 horas.

El tiempo y la temperatura de almacenamiento, son determinantes en el aumento del crecimiento de aerobios mesófilos, a medida que aumenta el tiempo y la temperatura de almacenamiento aumenta el crecimiento de la población bacteriana [11].

Al comparar los resultados obtenidos con las normas COVENIN para carnes de hamburguesa [4], se observó que el RAM, se encuentra dentro de los límites permisibles (<7 log UFC/g). Resultados similares fueron reportados en Venezuela por Narváez y col. [14], al evaluar el desempeño higiénico sanitario en la producción de hamburguesa. Estos autores reportaron elevados valores de RAM a la temperatura de 10°C, indicativo de que no es una temperatura óptima para el almacenamiento de la carne de hamburguesa.

Enterobacterias

En la TABLA II se observan los valores promedios de Enterobacterias expresados en log UFC/g, en las dos marcas de carnes de hamburguesas estudiadas, a tres temperaturas y

TABLA I
RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS (log UFC/g)
EN DOS MARCAS DE CARNE DE HAMBURGUESA
ALMACENADAS A DIFERENTES TIEMPOS
Y TEMPERATURAS

Temperatura °C	Marca A		
	0	48	96
-10	5,06 ^a	5,09 ^a	5,26 ^{ab}
4	5,06 ^a	5,29 ^{ab}	5,74 ^b
10	5,06 ^a	5,77 ^b	5,83 ^b
Temperatura °C	Marca B		
	0	48	96
-10	4,91 ^a	4,99 ^{ab}	5,17 ^{ab}
4	4,91 ^a	5,87 ^{bc}	6,26 ^{cd}
10	4,91 ^a	6,34 ^{cd}	6,86 ^d

Superíndices con letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

TABLA II
RECUESTO DE ENTEROBACTERIAS (log UFC/g)
EN DOS MARCAS DE CARNE DE HAMBURGUESA
ALMACENADAS A DIFERENTES TIEMPOS
Y TEMPERATURAS

Temperatura °C	Marca A			
	Horas			
	0	48	96	
-10	4,62 ^{ab}	4,70 ^{ab}	4,09 ^a	
4	4,62 ^{ab}	4,75 ^{ab}	4,15 ^a	
10	4,62 ^{ab}	5,17 ^b	4,59 ^{ab}	
	Marca B			
	-10	4,24 ^a	4,68 ^{abc}	4,34 ^{ab}
	4	4,24 ^a	5,68 ^c	5,54 ^{bc}
	10	4,24 ^a	5,79 ^c	5,70 ^c

Superíndices con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

tiempos de almacenamiento. Al analizar la marca A, a la temperatura de -10°C no se detectaron diferencias significativas en los valores para los diferentes tiempos de almacenamiento. El menor valor se observó a 96 horas, de 4,09, un comportamiento similar se observó para ese tiempo de almacenamiento y a las temperaturas de 4 y 10°C .

A las temperaturas de 4 y 10°C se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el recuento de enterobacterias entre las marcas A y B, a partir de 48 horas de almacenamiento. Por otra parte, a -10°C no se presentaron diferencias relativas al tipo de marca consideradas en el ensayo.

En la marca B se encontró menor contaje a las 0 horas siendo éste de 4,24, con un incremento significativo ($P < 0,05$) a las 48 horas en las temperaturas de 4 y 10°C , pero manteniendo el mismo comportamiento que en la marca A, es decir, disminuyendo a las 96 horas de almacenamiento, lo cual podría ser atribuido a una gradual disminución de los nutrientes [11]. Resultados similares obtuvieron Treviño y col. [19] en salchichas donde el contaje de enterobacterias mostró tendencia decreciente a partir del tercer día de almacenamiento.

Según la ICMSF [11], la velocidad del crecimiento puede verse afectada por los cambios de temperatura que estén por debajo del óptimo. Pudiendo llegar a ser más lento en aquellas temperaturas inferiores a los 0°C , esto podría explicar el crecimiento de las enterobacterias a esta temperatura.

Enterobacterias potencialmente productoras de aminas biógenas

En la TABLA III se presenta una lista donde se muestran las enterobacterias potencialmente productoras de aminas biógenas presentes en las marcas comerciales de carnes para hamburguesas. Se encontraron en ambas marcas: *Citrobacter*

TABLA III
ENTEROBACTERIAS POTENCIALMENTE PRODUCTORAS
DE AMINAS BIÓGENAS EN DOS MARCAS
DE CARNE DE HAMBURGUESAS

Enterobacteria	Marca A	Marca B
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Klebsiella terrigena</i>	+	
<i>Citrobacter sp.</i>	+	
<i>E. agglomerans group</i>		+
<i>Escherichia coli inactiva</i>		+
<i>Enterobacter gergoviae</i>		+
<i>Klebsiella ozaense</i>		+
<i>Morganella sp.</i>		+

+ indica la presencia del microorganismo.

freundii, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*. En el caso de la marca A también estuvieron presentes *Citrobacter sp.*, *Klebsiella terrigena*, mientras que en la marca B se encontraron *Enterobacter gergoviae*, *Klebsiella ozaense*, *Morganella sp.*

Dichos resultados son similares a los reportados por Fugen y col. [10], quienes encontraron en carne de hamburguesas que las bacterias formadoras de histamina fueron *Escherichia coli* seguida por *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus pennerii*, y *Hafnia alvei*. El productor de cadaverina más importante fue *Escherichia coli*, al igual que *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter fergusonii*; la putrescina por su parte fue producida por *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia guinesu*, *Proteus alcalifagens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus pennerii* y *Hafnia alvei*. La feniletilamina y la triptamina son producidas por *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter taylorae*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*.

Concentración de aminas biógenas

La TABLA IV muestra las concentraciones expresadas en partes por millón (ppm) de las aminas biógenas detectadas en las marcas de hamburguesa A y B. Se encontraron cuatro aminas biógenas: espermina, espermidina, cadaverina y serotonina, el resto de las aminas biógenas no fue detectado por el cromatógrafo. En la marca A, serotonina y espermina se encontraron en mayor concentración y en la marca B, espermina

TABLE IV
**CONCENTRACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS (ppm)
 EN DOS MARCAS DE CARNE DE HAMBURGUESA**

Amina biógena	Marca A	Marca B
Espermina	59,58	104,45
Espermidina	58,20	73,07
Cadaverina	57,53	68,00
Serotonina	59,78	33,73

y espermidina. Las concentraciones detectadas en las marcas de carnes de hamburguesas estudiadas se ubicaron por debajo de los niveles permitidos para alimentos (200-500 ppm) [21].

Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren de los realizados por Bover y col. [3] en salchichas maduras, donde las principales aminas formadas fueron tiramina y cadaverina; la presencia de putrescina fue variable dependiendo de la muestra utilizada. Por otra parte Fugen y col. [10] encontraron en productos cárnicos en primer lugar la putrescina seguida por la cadaverina, tiramina e histamina. Al comparar los resultados del presente estudio, con los realizados por dichos investigadores, se encontró similitud en relación a la cadaverina.

CONCLUSIONES

- Se observaron incrementos significativos en el recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias en ambas marcas de carne de hamburguesa almacenadas a 4 y 10°C a partir de 48 horas.
- El conteo de aerobios mesófilos en carne de hamburguesa almacenada a -10, 4 y 10°C durante 96 horas, fue inferior a los límites microbiológicos establecidos por la norma COVENIN.
- En las dos marcas estudiadas se identificaron las enterobacterias potencialmente productoras de aminas biógenas: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*.
- Las aminas biógenas encontradas fueron: espermina, espermidina, cadaverina, serotonina, en concentraciones inferiores a los límites permitidos para alimentos.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios en cuanto a la calidad microbiológica en otras marcas de carne de hamburguesa de alto consumo en la población zuliana.
- Realizar estudios complementarios de aminas biógenas en carnes de hamburguesa en función de los factores tiempo y temperatura.

- Se recomienda a los organismos gubernamentales fortalecer el sistema de vigilancia y establecer un mayor control microbiológico en plantas procesadoras de hamburguesas, con el fin de mejorar la calidad sanitaria del producto y resguardar la salud de los consumidores.
- Establecer límites dentro de las normas COVENIN para diferentes especies de enterobacterias y aminas biógenas.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ), por su apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASKAR, A.; TREPTOW, H. Biogenic amine in Lebensmittel (Biogenic Amine in Food). Eugen Ulmer GmbH: Stuttgart, 44-55 pp. 1986.
- [2] BEHLINE, A.; TAYLOR, S. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. **J. Food Sci.** 47: 1311-1317. 1982.
- [3] BOVER, S.; IZQUIERDO, M.; VIDAL, C. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. **Meat Sci.** 57: 2115-221. 2001.
- [4] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) **Normas para hamburguesas**. COVENIN 2127. Caracas 4 pp.1998.
- [5] COULTATE, T. **Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos**. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza, España. 376 pp. 1998.
- [6] DANIEL, W. **Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud**. Editorial Limusa. México. 415-455 pp. 1991.
- [7] EEROLA, S.; MAIJALA, R.; ARTUR, X. Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant Amine-Positive Lactobacillus. **J. Food Sci.** 61 (6): 1243-1246. 1996.
- [8] EEROLA, S.; HINKKANEN, R. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. **J. AOAC Int.** 76(3): 575-577. 1993.
- [9] FRAZIER, W.; WESTHOFF, D. **Microbiología de los Alimentos**. 3era edición, Editorial Acribia. Zaragoza, España. 522 pp. 1985.
- [10] FUGEN, D.; KAMURA, A.; NILUFER, V. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. **Meat Sci.** 58: 163 -166. 2001.
- [11] COMISIÓN INTERNACIONAL DE ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS EN ALIMENTOS. **Ecología Microbiana de los Alimentos. Factores que afectan a la su-**

- pervivencia de los microorganismos en los alimentos.** Vol. I. 2da edición. Editorial Acribia. Zaragoza-España. 332 pp. 1980.
- [12] COMISIÓN INTERNACIONAL DE ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS EN ALIMENTOS. **Microbiología de los Alimentos, Técnicas de Análisis Microbiológico.** Vol. I. 2da edición. Editorial Acribia. Zaragoza-España. 431 pp. 1984.
- [13] MANDELL, G.; DOUGLAS, R.; BENETT, J. **Enfermedades Infecciosas, Principios y Prácticas.** 4ta edición. Editorial Médica Panamericana. 2199-2210 pp. 1997.
- [14] NARVÁEZ, C.; PARRA, K.; HUERTA, N.; RODAS, A. Evaluación del desempeño higiénico al procesar hamburguesas en una pequeña planta de Maracaibo. **Rev Científ FCV-LUZ.** XI (6): 529-532. 2001.
- [15] RICE, S.; EITENMILLER, R.; KOEHJER, P. Biologically active amines in food: a review. **Food Tech.** 39: 353-358. 1976.
- [16] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). Version 6,0. **User's guide: Statistic.** Carry Editors. 5th Ed. USA. 1985.
- [17] SHALALBY, A. Survey of biogenic amines in Egyptian food Sausage. **J. Sci. Food Agric.** 62: 291-293. 1993.
- [18] TORRES, G.; IZQUIERDO, P.; MÁRQUEZ, E.; SÁNCHEZ, E.; BARBOZA, Y. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la carga bacteriana, concentración de histidina libre y la producción de histamina en el músculo de la corvina (*Cynoscion maracaiboensis*). **Rev Científ FCV-LUZ.** X (2): 130-135. 2000.
- [19] TREVIÑO, E.; BEIL, D.; STEINHART, H. Determination of biogenic amines in mini-salami during long-term storage. **Food Chem.** 58: 385-390. 1997.
- [20] TREVIÑO, E.; BEIL, D.; STEINHART, H. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products for example of cervelat sausage. **Food Chem.** 60: 521-526. 1997.
- [21] VECIANA-NOGUES, M.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. **J. Agric Food Chem.** 45 (6): 2036-2041. 1997.
- [22] ZINSSER, J. **Microbiología.** Cap. 2. Ed. Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 20° Edición. 1696 pp. 1992.