

GISELA DE MAGALHÃES MACHADO MOREIRA

**QUEIJOS GORGONZOLA, PRATO, PARMESÃO E MUSSARELA:
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS
BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2018

GISELA DE MAGALHÃES MACHADO MOREIRA

**QUEIJOS GORGONZOLA, PRATO, PARMESÃO E MUSSARELA:
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS
BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Abreu Glória

Coorientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2018



FOLHA DE APROVAÇÃO

QUEIJOS GORGONZOLA, PRATO, PARMESÃO E MUSSARELA: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

GISELA DE MAGALHÃES MACHADO MOREIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 22 de outubro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Maria Beatriz de Abreu Gloria (Orientadora e Presidente da Comissão)
Faculdade de Farmácia - UFMG

Prof. Dr. Christian Fernandes
Faculdade de Farmácia - UFMG

Profa. Dra. Maria José de Sena
UFRPE

Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo
Faculdade de Farmácia - UFMG

Prof. Dr. Maximiliano Soares Pinto
ICA - UFMG

Prof. Dr. Luiz Carlos Gonçalves Costa Junior
Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Belo Horizonte, 22 de outubro de 2018.

M838q Moreira, Gisela de Magalhães Machado.
Queijos Gorgonzola, Prato, Parmesão e Mussarela: influência do tempo de maturação no perfil de aminas bioativas, aminoácidos livres, textura e características físico-químicas e microbiológicas / Gisela de Magalhães Machado Moreira. – 2018.
172 f. : il.

Orientadora: Maria Beatriz Abreu Glória.

Coorientador: Christian Fernandes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Queijo – Produção – Teses. 2. Maturação – Teses. 3. Proteólise – Teses. 4. Ácido glutâmico – Teses. 5. Tiramina – Teses. 6. Bactérias lácticas – Teses. I. Glória, Maria Beatriz Abreu. II. Fernandes, Christian. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 637.3

*Ao meu marido Bruno e às minhas filhas, Manuela e Mariana,
que me acompanharam no dia-a-dia desta caminhada,
com muito amor,
dedico este trabalho.*

*“Disse a flor para o Pequeno Príncipe: é preciso que eu suporte
duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.”*

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, que por seu amor proporcionou a oportunidade e os meios necessários para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Junia e José Nivaldo, minha irmã Tatiana e meu sobrinho Mateus, por serem fortaleza e fonte de amor, inspiração, exemplo e dedicação. Ao meu marido Bruno e minhas filhas Manuela e Mariana, agradeço o imensurável apoio, companheirismo, a compreensão nos momentos de ausência, a paciência e, sobretudo a oportunidade de vivenciar o amor familiar em sua plenitude, neste período de tantas provações. Aos meus avós (que se foram ao longo dessa caminhada), e também ao meu padrinho e minha “padrinha” pelo amor e palavras de carinho sempre disponíveis quando precisei. Muito obrigada à minha família.

À professora Maria Beatriz de Abreu Glória pela orientação, amizade e ensinamentos, exemplo de pesquisadora e pessoa humana; obrigada também pela paciência e pela oportunidade de fazer parte da família do LBqA.

À Cristina Mosquim, que não só me apresentou ao tema e à minha orientadora, mas também me incentivou a perseguir meus sonhos.

Aos professores Christian Fernandes, Leorges Moraes da Fonseca, Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior, Maria José de Sena, Maximiliano Soares Pinto, Raquel Linhares Bello de Araújo e Roseane Passos de Oliveira pelas valiosas contribuições.

Aos amigos do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em especial Denise Sobral, Elisângela Michele Miguel, Junio César Jacinto de Paula, Renata Golin Bueno Costa, Vanessa Aglaê Martins Teodoro e Alcy Laender de Brito pela parceria e inestimável apoio em etapas cruciais deste trabalho, mas também pela amizade sincera, paciente e duradoura. Fazer parte deste grupo me estimula a ser cada vez melhor e buscar sempre mais, sou privilegiada por tê-los como amigos.

Aos bolsistas Taynan Barroso, Mariana Braga, Gabriela Cantarino e à técnica Irani pela dedicação e apoio no Laboratório de Pesquisa do ILCT.

Aos amigos do LBqA, Aisa Del Rio, Bárbara Costa, Caroline Paiva, Douglas Braga, Edinéia Xavier, Fabiana Diniz, Letícia Guidi, Maria José Oliveira, Naiara Ciríaco, Nathália Luíza, Nilton Almeida, Patrícia Tette, Raquel Braga, Regina Carvalho, Ricardo Byrro, Warley Evangelista, e especialmente Bruno Dala Paula, Flávia Beatriz Custódio, Guilherme Reis, José Maria Soares e Laura Ciribelli, pelo aprendizado, convívio, conversas, mas sobretudo pela amizade.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais e Instituto de Laticínios Cândido Tostes, pela oportunidade de capacitação profissional.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa PCRH.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para realização deste trabalho.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1. Mercado de queijos	24
2. Definições e classificações	27
3. Produção de queijos de coagulação enzimática	30
4. Proteólise em queijos durante a maturação	30
4.1 Textura em queijos	36
5. Algumas variedades de queijos produzidos no Brasil	39
5.1 Queijo Prato	39
5.2 Queijo Mussarela	39
5.3 Queijo Gorgonzola	41
5.4 Queijo Parmesão	42
6. Aminoácidos em queijos	43
7. Aminas bioativas em queijos	50
7.1 Formação de aminas bioativas em queijos	51
7.2 Toxicidade de aminas bioativas	52
7.3 Presença de aminas bioativas em queijos	55
7.4 Determinação de aminas em queijos	59
8. Métodos analíticos para a determinação simultânea de aminoácidos livres e aminas bioativas	60
CAPÍTULO I. PARÂMETROS DE DESEMPENHO EM MÉTODO UHPLC-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES E AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS MUSSARELA, PRATO, PARMESÃO E GORGONZOLA	65
1. Objetivos	65
2. Material e Métodos	65
2.1 Material	65
2.1.1 Reagentes	65
2.1.2 Queijos	66
2.2 Métodos	66
2.2.1 Preparo de amostras e derivação	66
2.2.2 Análise cromatográfica	67

2.2.3 Desempenho do método	67
3. Resultados.....	68
3.1 Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho	68
3.2 Seletividade e efeito matriz.....	68
3.3 Precisão	70
3.4 Recuperação.....	71
3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	71
4. Conclusão.....	75
CAPÍTULO II. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO GORGONZOLA.....	76
1. Objetivos.....	76
2. Material e Métodos	76
2.1 Produção dos queijos Gorgonzola.....	76
2.2 Reagentes.....	77
2.3 Análises físico-químicas	78
2.4 Análises bioquímicas.....	79
2.5 Análises microbiológicas	79
2.6 Perfil de textura	79
2.7 Análises estatísticas.....	79
3. Resultados e Discussão.....	80
3.1 Características do queijo Gorgonzola aos 14 dias de maturação	80
3.2 Alterações ocorridas durante a maturação do queijo Gorgonzola.....	83
3.2.1 pH e proteína total.....	83
3.2.2 Índices de proteólise.....	84
3.2.3 Aminoácidos livres e aminas bioativas	85
3.2.4 Perfil de textura	89
3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis	90
3.2.6 Análise multivariada	90
4. Conclusão.....	93
CAPÍTULO III. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO MUSSARELA	95
1. Objetivos.....	95
2. Material e Métodos	95
2.1 Produção dos queijos Mussarela.....	95
2.2 Reagentes.....	96
2.3 Análises físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas	96
2.4 Perfil de textura	96
2.5 Análises estatísticas.....	97

3. Resultados e Discussão.....	97
3.1 Características do queijo Mussarela aos 15 dias de maturação	97
3.2 Alterações ocorridas durante a estocagem do queijo Mussarela	99
3.2.1 pH e proteína total.....	99
3.2.2 Índices de proteólise.....	100
3.2.3 Aminoácidos livres e aminos bioativas	101
3.2.4 Perfil de textura	104
3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis	105
3.2.6 Análise multivariada	106
4. Conclusão.....	107
CAPÍTULO IV. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO PRATO.....	110
1. Objetivos.....	110
2. Material e Métodos	110
2.1 Produção dos queijos Prato.....	110
2.2 Reagentes.....	111
2.3 Análises físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas	111
2.4 Perfil de textura	111
2.5 Análises estatísticas.....	112
3. Resultados e Discussão.....	112
3.1 Características do queijo Prato aos 8 dias de maturação	112
3.2 Alterações ocorridas durante a maturação do queijo Prato.....	114
3.2.1 pH e proteína total.....	114
3.2.2 Índices de proteólise.....	116
3.2.3 Aminoácidos livres e aminos bioativas	118
3.2.4 Perfil de textura	120
3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis	121
3.2.6 Análise multivariada	122
4. Conclusão.....	123
CAPÍTULO V. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO PARMESÃO	126
1. Objetivos.....	126
2. Material e Métodos	126
2.1 Produção dos queijos Parmesão.....	126
2.2 Reagentes.....	127
2.3 Análises físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas	127
2.4 Perfil de textura	127
2.5 Análises estatísticas.....	128

3. Resultados e Discussão.....	128
3.1 Características do queijo Parmesão aos 29 dias de maturação	128
3.2 Mudanças ocorridas durante a estocagem do queijo Parmesão.....	129
3.2.1 pH e proteína total.....	129
3.2.2 Índices de proteólise.....	131
3.2.3 Aminoácidos livres e aminos bioativas	132
3.2.4 Perfil de textura	136
3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis	138
3.2.6 Análise multivariada	139
4. Conclusão.....	141
CAPÍTULO VI. AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS COMO PARÂMETROS DE DIFERENCIAÇÃO DAS VARIEDADES DE QUEIJO ESTUDADAS POR MEIO DE ANÁLISE MULTIVARIADA.....	142
1. Objetivos.....	142
2. Material e Métodos	142
3. Resultados e Discussão.....	142
4. Conclusão.....	144
CONCLUSÕES INTEGRADAS	146
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
ANEXO I	164
ANEXO II.....	165
ANEXO III.....	166
ANEXO IV	167
RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	167
AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS PARMESÃO RALADOS.....	167
INFLUENCE OF REFRIGERATED STORAGE ON PROTEOLYSIS AND TEXTURE OF MOZZARELLA CHEESE	172

LISTA DE TABELAS

1. Classificação geral de queijos em função do percentual de gordura no extrato seco e de umidade, conforme Portaria nº 146 /1996 do MAPA	29
2. Parâmetros de textura, definição, representação na curva e unidades.....	37
3. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação do queijo Prato conforme RTIQ	40
4. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação da Mussarela conforme RTIQ	41
5. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação dos queijos azuis conforme RTIQ	42
6. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação do queijo Parmesão conforme RTIQ	43
7. Tipos e teores de aminoácidos livres em diversas variedades de queijos...	48
8. Teores de aminos bioativas encontradas em diversos queijos.....	57
9. Resumo de algumas técnicas cromatográficas utilizadas para determinação de aminoácidos livres (AA) e aminos bioativas (AB) em queijos.....	63
I.1 Gradiente de concentração das soluções de fases móveis empregadas na separação das aminos bioativas e aminoácidos livres nos extratos de queijo	67
I.2 Mínimo e máximo da faixa de trabalho, intercepto (a) e inclinação (b) da curva analítica e coeficiente de determinação (R^2) para cada analito calculado em extrato de matriz fortificado	69
I.3 Coeficientes de variação para as determinações em condições de repetitividade de aminos, aminoácidos e íon amônio em três níveis de concentração para os queijos Gorgonzola, Mussarela, Parmesão e Prato	72
I.4 Médias das porcentagens de recuperação e desvio padrão para aminos, aminoácidos e íon amônio em queijos Gorgonzola, Mussarela, Parmesão e Prato	73
I.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para aminoácidos, aminos e íon amônio, em mg/100 g.....	74
II.1 Composição média de queijos Gorgonzola aos 14 dias após a perfuração dos queijos	81
II.2 Aminoácidos livres e aminos bioativas em queijos Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias	82
II.3 Médias de pH e proteína total para o queijo Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias.....	83
II.4 Parâmetros de textura de queijo Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias	89
II.5 Contagem média (log UFC/g \pm desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias	90

III.1 Composição média de queijos Mussarela aos 15 dias após sua fabricação	97
III.2 Aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos Mussarela durante estocagem refrigerada (2 a 4 °C) por 85 dias	98
III.3 Médias de pH e proteína total para o queijo Mussarela durante a estocagem refrigerada (2 a 4 °C)	99
III.4 Parâmetros de textura de queijo Mussarela durante a estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C por 85 dias.....	104
III.5 Contagem média (log UFC/g ± desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Mussarela durante a estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C por 85 dias	105
IV.1 Composição média de queijos Prato aos 8 dias após sua fabricação	112
IV.2 Aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias	114
IV.3 Médias de pH e proteína total para o queijo Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias	115
IV.4 Médias de extensão e profundidade de proteólise para o queijo Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.....	116
IV.5 Parâmetros de textura de queijo Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.....	121
IV.6 Contagem média (log UFC/g ± desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias	121
V.1 Composição média de queijos Parmesão aos 29 dias após sua fabricação	128
V.2 Aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos Parmesão durante maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias	130
V.3 Médias de pH e proteína total para o queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias	131
V.4 Médias de extensão e profundidade de proteólise para o queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias	132
V.5 Parâmetros de textura de queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias	137
V.6 Contagem média (log UFC/g ± desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias	138
VI.1. Aminoácidos, aminas bioativas e íon amônio presentes nos queijos em pelo menos um tempo de análise.....	143

LISTA DE FIGURAS

1. Produção mundial de queijo (de leite integral de vaca) de 2005 a 2014	24
2. Produção brasileira de queijos de 2006 a 2013	25
3. Produção nacional de queijos Mussarela e Prato de 1998 a 2015	26
4. Produção nacional de queijos Parmesão (ralado, forma e fração) e Gorgonzola de 1998 a 2015	26
5. Consumo mundial de queijos em 2013, em kg/habitante/ano	27
6. Classificação dos queijos em grupos de acordo com o tipo de coagulação, principais agentes coagulantes e tipo de tecnologia	29
7. Etapas básicas de produção de queijo coagulado enzimaticamente	31
8. Evolução da proteólise em queijos	34
9. Sistema plasmina/plasminogênio do leite	35
10. Curva típica força/tempo de um teste de compressão em duas etapas para queijos	36
11. Visão geral das reações do catabolismo de aminoácidos relevantes para a formação de compostos de aroma em queijos	45
12. Rotas de síntese de algumas aminas bioativas	51
13. Reação de derivação de grupos amino por 6-aminoquinolil-N-hidroxi succinimidil carbamato (AQC)	62
I.1. Cromatograma comparativo de uma amostra de queijo Parmesão após três meses de fabricação (picos menores e mais escuros) e um <i>pool</i> dos aminoácidos e aminas em solução (picos maiores em sobreposição, mais claros)	70
II.1 Regressão linear para os índices de extensão e profundidade do queijo Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias	84
II.2 Regressão linear para o teor de aminoácidos livres totais (AA total) do Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias	85
II.3 Regressão linear para o teor de aminas bioativas totais (AB total) do Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias	85
II.4 Aminoácidos livres em queijo Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias.....	86
II.5 Aminas bioativas em queijo Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias	87
II.6 Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a maturação de queijos Gorgonzola a 12 ± 2 °C por 49 dias	91
II.7 Gráficos de <i>Score</i> (A) e <i>loading</i> (B), obtidos pela Análise de Componentes Principais, para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a maturação de queijos Gorgonzola a 12 ± 2 °C por 49 dias contados a partir	

da perfuração dos queijos; (C) Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as observações obtidas em cada tempo de maturação	92
III.1 Regressão linear para os índices de extensão e profundidade de Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C.....	100
III.2 Regressão linear para o teor de aminoácidos livres totais (AA total) do queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C	101
III.3 Regressão linear para o teor de aminos bioativas totais (AB total) do queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C	101
III.4 Aminos bioativas em queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C	102
III.5 Aminoácidos livres em queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C.....	103
III.6 Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios, aminos bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C por 85 dias de queijo Mussarela	106
III.7 Gráficos de <i>score</i> (A) e <i>loading</i> (B), obtidos pela Análise de Componentes Principais, para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios viáveis, aminos bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C por 85 dias de queijos Mussarela; (C) Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as observações obtidas em cada tempo de estocagem.....	108
IV.1 Regressão linear para a porcentagem de proteína total do queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias	116
IV.2 Regressão linear para os índices de extensão e profundidade da proteólise do queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias	117
IV.3 Regressão linear para os teores de aminoácidos (AA) livres e aminos bioativas (AB) totais do queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias	118
IV.4 Aminoácidos livres em queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.....	119
IV.5 Aminos bioativas em queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.....	120
IV.6 Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios, aminos bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias de queijo Prato	122
IV.7 Gráficos de <i>score</i> (A) e <i>loading</i> (B), obtidos pela Análise de Componentes Principais, para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios viáveis, aminos bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias de queijo Prato; (C) Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as observações obtidas em cada tempo de maturação	124

V.1 Regressão linear para os índices de extensão e profundidade da proteólise do queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias	131
V.2 Regressão linear para os teores de aminoácidos (AA) livres e aminas bioativas (AB) totais do queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias	133
V.3 Aminoácidos livres em queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias.....	134
V.4 Aminas bioativas em queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias.....	136
V.5 Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a maturação de queijo Parmesão entre 10 e 12 °C por 181 dias	139
V.6 Gráficos de <i>score</i> (A) e <i>loading</i> (B), obtidos pela Análise de Componentes Principais, para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios viáveis, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a maturação de queijos Parmesão por 181 dias entre 10 e 12 °C; (C) Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as observações obtidas em cada tempo de maturação	140
VI.1 Gráficos de <i>score</i> (A) e <i>loading</i> (B), obtidos pela Análise de Componentes Principais, para as médias dos índices de proteólise extensão e profundidade, pH, aminas bioativas e aminoácidos livres totais, teor de tiramina (TYM) e dos aminoácidos livres serina (SER), asparagina (ASN), ácido glutâmico (GLU), treonina (THR), alanina (ALA), prolina (PRO), valina (VAL), lisina (LYS), leucina (LEU) e fenilalanina (PHE), gordura no extrato seco (GES) e umidade para os queijos Mussarela, Gorgonzola, Prato e Parmesão; (C) Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as observações obtidas para cada variedade de queijo.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	aminoácidos
AB	aminas bioativas
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ACN	acetonitrila
ADQ	Análise Descritiva Quantitativa
AGM	agmatina
Ala	alanina
AQC	6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidil carbamato
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
BAL	bactérias ácido lácticas
C ⁴ D	detector condutométrico sem contato
CAD	cadaverina
CCR	4-carbonil cloreto rodamina
CV	coeficiente de variação
Cys	cistina
d ₂₀	densidade a 20 °C
DEEMM	dietil etoximetileno malonato
DMDS	dissulfeto de dimetila
DMTS	trissulfeto de dimetila
DP	desvio padrão
DUADLLME	derivatization ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction
EFSA	European Food Safety Authority
ELS	evaporative light scattering detector
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EPD	espermidina
EPM	espermina
EST	extrato seco total
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FIL	Federação Internacional de Laticínios
FEM	2-feniletilamina
FMOC	9-fluorenilmetil cloroformato
GABA	ácido gama-aminobutírico
Gd	gordura
GES	gordura no extrato seco
Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
HIM	histamina
His	histidina
HPLC	high performance liquid chromatography
ILCT	Instituto de Laticínios Cândido Tostes
Ile	isoleucina
IMAO	inibidores de mono amino oxidases
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
LD	limite de detecção
Leu	leucina
LQ	limite de quantificação
Lys	lisina
MAO	mono amino oxidases

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAV	mesófilos aeróbios viáveis
Met	metionina
metOH	metanol
nd	não detectado
NH ₄ ⁺	íon amônio
NSLAB	non-starter acid lactic bacteria
NS _{pH4,6}	nitrogênio solúvel em pH 4,6
NS _{TCA12%}	nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12%
NT	nitrogênio total
ONU	Organização das Nações Unidas
OPA-ET	o-ftalaldeído-etanotiol
Orn	ornitina
PCA	Principal Component Analysis
PCR	polymerase chain reaction
PDA	arranjo de diodos (photodiode array)
Phe	fenilalanina
PITC	fenil-iso-tiocianato
Pro	prolina
PUT	putrescina
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
S/U	sal na umidade
Ser	serina
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SPE	solid phase extraction
SRT	serotonina
TCA	ácido tricloroacético
TDPA	ácido 3,3 k-tiodipropiônico
Thr	treonina
TIM	tiramina
TPA	Texture Profile Analysis
TRM	triptamina
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
UFC	unidade formadora de colônia
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography
UV	ultra-violeta
Val	valina

RESUMO

A maturação é uma etapa importante na produção de queijos, visto que as transformações bioquímicas que ocorrem neste período são responsáveis pela caracterização do produto final e influenciam sua qualidade e inocuidade. O objetivo deste trabalho foi produzir os queijos Mussarela, Gorgonzola, Prato e Parmesão e caracterizá-los durante seu período de maturação quanto aos perfis bioquímico (aminoácidos e aminas bioativas livres), físico-químico, de textura e aspectos microbiológicos. Os parâmetros de desempenho do método para avaliação simultânea de 10 aminas bioativas, 19 aminoácidos e íon amônio por UHPLC-UV mostraram que o método é adequado para determinação dessas substâncias nas variedades de queijos estudadas. Os queijos estavam de acordo com as legislações específicas de gordura no extrato seco (GES) e umidade para cada variedade. Índices de extensão e profundidade da proteólise aumentaram em todos os queijos e nos últimos tempos de análise foram, respectivamente, 30,7% e 24,4% aos 49 dias do Gorgonzola; 13,4% e 7,1% aos 85 dias da Mussarela; 13,2% e 6,7% aos 42 dias do Prato, e 21,6% e 13,5% aos 181 dias do Parmesão. Os queijos que apresentaram maiores teores globais de aminoácidos livres foram o Parmesão (737 mg/100 g) e o Gorgonzola (496 mg/100 g), ao final da maturação. Os aminoácidos mais encontrados em todos os queijos foram lisina, leucina, fenilalanina e ácido glutâmico, enquanto glicina e cistina foram os menos prevalentes. Tiramina foi a amina presente em todos as variedades e em maior quantidade. As poliaminas espermina e espermidina não foram encontradas em nenhum queijo e a serotonina estava presente no Gorgonzola e no Parmesão. Os parâmetros de textura que apresentaram variação durante a maturação foram a coesividade no Gorgonzola, gomosidade e mastigabilidade na Mussarela, elasticidade e adesividade no Prato e adesividade no Parmesão. Com exceção da Mussarela, foi observado decréscimo na contagem de mesófilos aeróbios viáveis durante a maturação de todos os queijos. A contagem de bactérias lácticas só não se manteve constante no queijo Parmesão, em que apresentou diminuição ao longo do tempo. A abordagem utilizada na caracterização dos queijos se mostrou eficiente e a análise multivariada sintetizou as influências que diferenciam cada variedade. Os dados gerados neste trabalho aumentam o conhecimento sobre os fatores que influenciam as características intrínsecas e a qualidade de queijos produzidos no Brasil, podendo servir de instrumento para classificação e tomadas de decisões acerca de melhorias tanto em processos produtivos como possivelmente na legislação pertinente, em relação à caracterização, qualidade e padronização dos produtos, e também sob o ponto de vista de saúde pública.

Palavras-chave: Maturação. Proteólise. Ácido glutâmico. Tiramina. Bactérias lácticas.

ABSTRACT

Ripening is an important step in the production of cheeses, since the biochemical transformations that occur in this period are responsible for the characterization of the final product and affects its quality and safety. The objective of this work was to produce Mozzarella, Gorgonzola, Prato and Parmesan cheeses and characterize them during ripening concerning biochemical profiles (free amino acids and bioactive amines), physical-chemical, texture and microbiological aspects. The performance parameters of the method for simultaneous evaluation of 10 bioactive amines, 19 amino acids and the ammonium ion by UHPLC-UV showed that the method is suitable for the determination of these substances in the studied varieties of cheese. The cheeses were in accordance with the specific legislation of fat in dry matter (FDM) and humidity for each variety. Extension and depth of proteolysis indexes increased in all cheeses and in the last analysis time were, respectively, 30.7% and 24.4% at 49 days of Gorgonzola; 13.4% and 7.1% at 85 days of Mussarela; 13.2% and 6.7% at 42 days of the Prato, and 21.6% and 13.5% at 181 days of Parmesan. Parmesan cheese (737 mg/100 g) and Gorgonzola (496 mg/100 g) were the cheeses with the highest overall free amino acid content, at the end of ripening time assessed. The most common amino acids found in all cheeses were lysine, leucine, phenylalanine and glutamic acid, whereas glycine and cystine were the least prevalent. Tyramine was the amine present in all varieties and in greater quantity. The polyamines spermine and spermidine were not found in any cheese and serotonin was present in Gorgonzola and Parmesan. The texture parameters that showed variation during ripening were cohesiveness in Gorgonzola, gumminess and chewiness in Mozzarella, elasticity and adhesiveness in Prato and adhesiveness in Parmesan. Except for Mozzarella, a decrease in viable mesophilic aerobic count during ripening of all cheeses was observed. The lactic acid bacteria count changed only in Parmesan cheese, showing a decrease over time. The approach used for cheese characterization was efficient and the multivariate analysis synthesized the influences that distinguish each variety. The data generated in this work increase the knowledge on the factors that affect the intrinsic characteristics and the quality of some cheeses produced in Brazil. It can be used as an instrument for classification and decision making about improvements in productive processes and possibly in the pertinent legislation, regarding characterization, quality and standardization of products, and also from the point of view of public health.

Key words: Ripening. Proteolysis. Glutamic acid. Tyramine. Lactic acid bacteria.

INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento lácteo fermentado, produzido de formas variadas em todo o mundo, tendo sua origem considerada na região sudeste da Turquia até a costa do Mediterrâneo, entre os rios Tigres e Eufrates, há 8.000 anos (FOX & McSWEENEY, 2004). No Brasil, a história da fabricação de queijos é relativamente recente, sendo que apenas no início do século XX houve consolidação da produção industrial, a começar em Minas Gerais com a atuação de imigrantes dinamarqueses no sul do Estado e de holandeses nas regiões de Barbacena e Santos Dumont (FURTADO, 1991). O queijo foi primeiramente formulado com o objetivo de conservar os principais constituintes do leite e atualmente é consumido pelo seu elevado valor nutricional e sabor característico (FOX & McSWEENEY, 2004).

Segundo dados fornecidos pela FAO/ONU - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - a produção mundial de queijos cresceu mais que 20% em 10 anos, chegando a 18,7 milhões de toneladas produzidas em 2014. O Brasil é o oitavo maior produtor de queijos do mundo, sendo os maiores produtores os Estados Unidos, França, Alemanha, Itália e Holanda (FAO, 2017).

Além da sua reconhecida importância mercadológica, o queijo é um alimento com aspectos nutricionais importantes, contribuindo para aumentar a eficiência do metabolismo, uma vez que possui substâncias que são rápida e facilmente absorvidas pelo organismo. A presença de aminoácidos, vitaminas A, E e do complexo B, minerais (em particular o cálcio e o magnésio) e proteínas fazem do queijo um alimento único (KABELOVÁ et al., 2009). O cálcio proveniente dos alimentos contribui para a saúde dos ossos e dentes, atividade neural, contração muscular, coagulação do sangue, regulação da pressão arterial e da adiposidade. A absorção do cálcio presente nos queijos é mais elevada quando comparada a outros alimentos com altos teores de cálcio, como brócolis e espinafre (SILVA, 2012).

Queijos de massa coagulada pela ação enzimática são maturados por períodos que variam de duas semanas a dois ou mais anos (McSWEENEY, 2011). O processo de maturação é muito complexo e envolve mudanças bioquímicas e microbiológicas no queijo que resultam no sabor e textura característicos de cada variedade. As mudanças bioquímicas que ocorrem durante a maturação podem ser agrupadas em eventos primários (que incluem o metabolismo de lactose residual, lactato e citrato, lipólise e proteólise) e secundários, estes importantes para o desenvolvimento de diversos compostos voláteis de sabor devido ao metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos

(McSWEENEY, 2011). Neste processo também pode ocorrer a formação de aminas bioativas nos queijos como resultado da descarboxilação enzimática de aminoácidos livres (SHALABY, 1996; VALE & GLÓRIA, 1998).

A quantidade e perfil de aminoácidos livres em queijos são dependentes de muitos fatores, que compreendem a quantidade de proteína na matéria prima utilizada, a atividade proteolítica das enzimas usadas nos procedimentos de manufatura e os microrganismos envolvidos no processo. O desprendimento de aminoácidos durante o processo de maturação tem papel vital no desenvolvimento da textura e do sabor dos queijos. A proteólise contribui para mudanças de textura na matriz protéica dos queijos, decréscimo da atividade de água e aumento de pH, o que facilita a liberação de compostos de sabor durante a mastigação. Isso contribui diretamente para o *flavor* e para o *off-flavor* de queijos pela formação de peptídeos e aminoácidos livres, além de liberar substratos (aminoácidos) para mudanças catabólicas secundárias como transaminação e descarboxilação (YVON & RIJNEN, 2001; KABELOVÁ et al., 2009; BØRSTING et al., 2012). O perfil e os teores de aminoácidos livres também são importantes na avaliação nutricional de alimentos e podem indicar possíveis adulterações e as transformações que ocorrem durante o processamento e a estocagem (KABELOVÁ et al., 2009).

Aminas bioativas em baixas concentrações exercem papel importante ao homem, entretanto, em concentrações elevadas, passam a causar efeitos adversos à saúde. Ainda, algumas aminas são importantes sob o ponto de vista sanitário, uma vez que poderão se acumular no queijo quando as condições higiênico-sanitárias forem inadequadas (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2006; EFSA, 2011). Os queijos são um ambiente ideal para formação dessas aminas devido à presença de aminoácidos livres, bactérias capazes de promover a descarboxilação destes e outros fatores como pH, concentração salina, atividade de água, temperatura e tempo de estocagem/maturação, densidade bacteriana e a presença do cofator piridoxal fosfato (VALE & GLÓRIA, 1998). Portanto torna-se fundamental estudar cada vez mais a presença dessas substâncias em queijos comercializados no Brasil.

A fabricação de queijos é uma arte constantemente aprimorada pela ciência dos alimentos, resultado da investigação básica e aplicada e da necessidade cada vez maior de compreender e controlar as características do leite, dos microrganismos utilizados no fabrico e maturação, das tecnologias, das propriedades físicas e do sabor do queijo. A necessidade de uma maior compreensão das características do queijo também tem sido impulsionada pelo uso crescente desse produto como ingrediente em outros alimentos

exigindo controle específico de propriedades selecionadas para conferir os atributos desejados ao alimento e para reter características do queijo durante várias tecnologias de processamento de alimentos, bem como minimização de custos (FOX & McSWEENEY, 2004).

Estudos no sentido de determinar o perfil de aminoácidos e aminas em queijos como forma de contextualização da qualidade e caracterização de queijos tem sido realizados em todo o mundo: Espanha (BARCINA et al., 1995; GOROSTIZA et al., 2004; DIANA et al., 2014; POVEDA et al., 2016), Itália (MARTELLI et al., 1993; GOBBETTI et al., 1997; SCHIRONE et al., 2013; CENTI et al., 2017), Áustria (FIECHTER et al., 2013), Coréia do Sul (JIA et al., 2011), República Tcheca (KABELOVÁ et al., 2009; STANDAROVÁ et al., 2009), Egito (KEBARY et al., 1999), Hungria (KORÖS et al., 2008), e Portugal (PINHO et al., 2001), o que demonstra a importância dessa abordagem. Entretanto, não foi encontrado, na literatura pesquisada, este tipo de estudo no Brasil.

Assim sendo, este trabalho pretende contribuir para o conhecimento sobre os fatores que influenciam as características intrínsecas e a qualidade de queijos produzidos no Brasil, servindo de instrumento para classificação e tomadas de decisões acerca de melhorias tanto em processos produtivos como possivelmente na legislação pertinente, pois não há uma normalização detalhada relacionada à qualidade de queijos durante a maturação. Existe uma demanda por estas informações, o que demonstra escassez destes dados na literatura. Desta forma este estudo se torna importante sob o ponto de vista de caracterização, qualidade e padronização dos produtos, e também sob o ponto de vista de saúde pública.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi produzir os queijos convencionais e especiais mais consumidos no Brasil, a saber: Mussarela, Gorgonzola, Prato e Parmesão, e caracterizá-los durante o período de estocagem/maturação quanto aos perfis bioquímico, físico-químico, de textura e aspectos microbiológicos. Além disso, objetivou-se realizar a avaliação de desempenho de método para avaliação concomitante de 10 aminas bioativas, 19 aminoácidos e amônia por cromatografia líquida de ultra-eficiência e detecção por ultra-violeta (UHPLC-UV).

Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- (i)** determinar em método cromatográfico de análise simultânea de aminas e aminoácidos os seguintes parâmetros de desempenho para cada analito: linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, efeitos de matriz e seletividade, veracidade, precisão, limites de detecção e quantificação, e recuperação;
- (ii)** fabricar, em três repetições, os queijos Mussarela, Gorgonzola, Prato e Parmesão;
- (iii)** quantificar os teores de umidade e de gordura no extrato seco dos queijos para a classificação conforme a Portaria nº 146 de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA);
- (iv)** realizar as seguintes determinações em seis tempos de estocagem/maturação:
 - perfil de aminas bioativas: histamina (HIM), agmatina (AGM), serotonina (SRT), tiramina (TIM), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (EPD), 2-feniletilamina (FEM), triptamina (TRM), espermina (EPM);
 - perfil de aminoácidos livres: ácido aspártico (Asp), serina (Ser), asparagina (Asn), glicina (Gly), ácido glutâmico (Glu), glutamina (Gln), histidina (His), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), prolina (Pro), cistina (Cys), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), lisina (Lys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe) e íon amônio (NH_4^+);
 - perfil de textura (dureza, adesividade, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade, coesividade);
 - pH e proteína total

- índices de proteólise - extensão e profundidade (relação entre os nitrogênios solúveis em pH 4,6 e em ácido tricloroacético 12% em relação ao nitrogênio total, respectivamente);
 - contagem de bactérias lácteas e contagem de mesófilos aeróbios viáveis nos queijos fabricados em seis tempos de estocagem/maturação;
- (v)** correlacionar estatisticamente todos os dados encontrados para estudo de interação de fatores nas características dos queijos por PCA – Principal Component Analysis, HCA – Hierarchical Cluster Analysis e outros métodos estatísticos adequados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Mercado de queijos

O mercado mundial de queijos vem crescendo nos últimos anos, sendo que entre 2005 e 2014 houve um crescimento de 23,8% na produção de queijos de leite integral de vaca no mundo, saltando de 15,1 milhões de toneladas em 2005 para 18,7 milhões de toneladas em 2014 (Figura 1). Os maiores produtores são os Estados Unidos, França, Alemanha, Itália e Holanda. O Brasil figura em oitavo lugar na produção mundial de queijos (FAO, 2017).

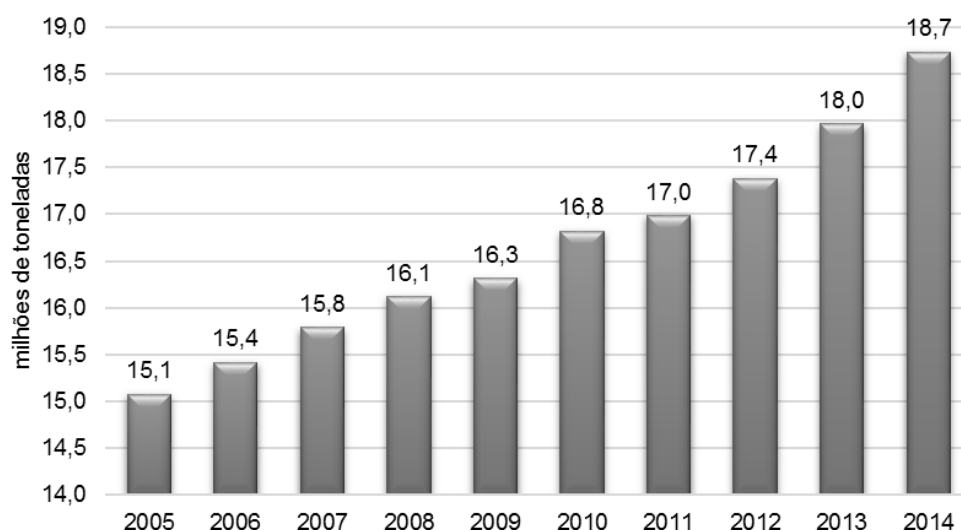


Figura 1. Produção mundial de queijo (de leite de vaca) de 2005 a 2014.

Fonte: FAO (2017).

Os maiores exportadores de queijos no mundo são a Alemanha, Holanda, França, Nova Zelândia e Itália e os maiores importadores são Alemanha, Itália, Grã-Bretanha, Rússia e Holanda (VLAHOVIC et al., 2014). O Brasil é considerado um país importador de queijos; em 2015 foram importadas mais de 20 mil toneladas de queijos, principalmente da Argentina e do Paraguai, enquanto apenas 2,5 mil toneladas foram exportadas, sobretudo para o Chile e Paraguai. As principais variedades de queijo importados são a Mussarela, o queijo fundido e queijos de pasta semidura (ZOCCAL, 2016).

No Brasil, segundo Carvalho et al. (2015), o mercado de queijos possui “*potencial de crescimento em faturamento e em volume associado a uma ainda incipiente diferenciação de produtos na ponta consumidora (o que indica um bom potencial de*

diferenciação de preços)”. Dados da empresa de pesquisa Mintel publicados pelo portal MilkPoint Indústria indicam que no período de 2006 a 2013 o mercado brasileiro de queijos cresceu em volume 9,4% ao ano (Figura 2) e em faturamento um total de 7,7% ao ano, com previsão de aumento de produção, em média, de 11,4% ao ano entre 2014 e 2017, devendo atingir R\$ 20 bilhões em vendas em 2017 (CARVALHO et al., 2015). Em 2015, o crescimento da produção de queijos no Brasil foi de apenas 2,9% em relação a 2014, bem menor que as taxas anteriores de 8% e 9% para 2014 e 2013, respectivamente, em relação aos anos anteriores. Isto pode ser explicado pela baixa do consumo deste produto devido à crise econômica e à escassez de matéria-prima para a produção (ROCHA, 2016). Apesar do crescimento menor, a produção de queijos no Brasil em 2015 foi expressiva: dos aproximadamente 34 bilhões de litros produzidos no País, 24 bilhões de litros foram captados por indústrias e 11 bilhões de litros (46%) foram transformados em queijos (ZOCCAL, 2016).

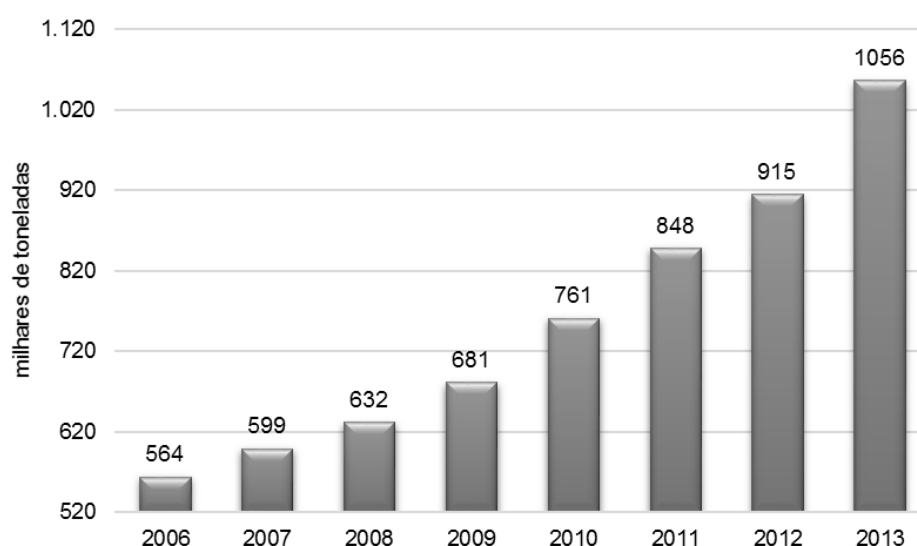


Figura 2. Produção brasileira de queijos de 2006 a 2013.

Fonte: Carvalho et al. (2015).

Os queijos Mussarela e Prato perfizeram juntos 47% do mercado de queijos no Brasil em 2014 e 2015, e os queijos especiais, 6% (Desk Research da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ em empresas com SIF). A Mussarela representou sozinha cerca de 30% da produção de queijos em 2015, com potencial de crescimento para os próximos anos (ROCHA, 2016). No período compreendido entre 2006 e 2012, a quantidade consumida de variedades de queijo como o Parmesão, o Gorgonzola, o Brie e o Camembert passou de 72,9 mil para 122 mil toneladas, se somados o consumo de nacionais e importados, o que representa um crescimento de 67,35% no período

(FRANCO, 2013). Nas Figuras 3 e 4 estão ilustradas as produções nacionais dos queijos Mussarela, Prato, Gorgonzola e Parmesão entre os anos de 1998 e 2015, segundo dados da ABIQ.

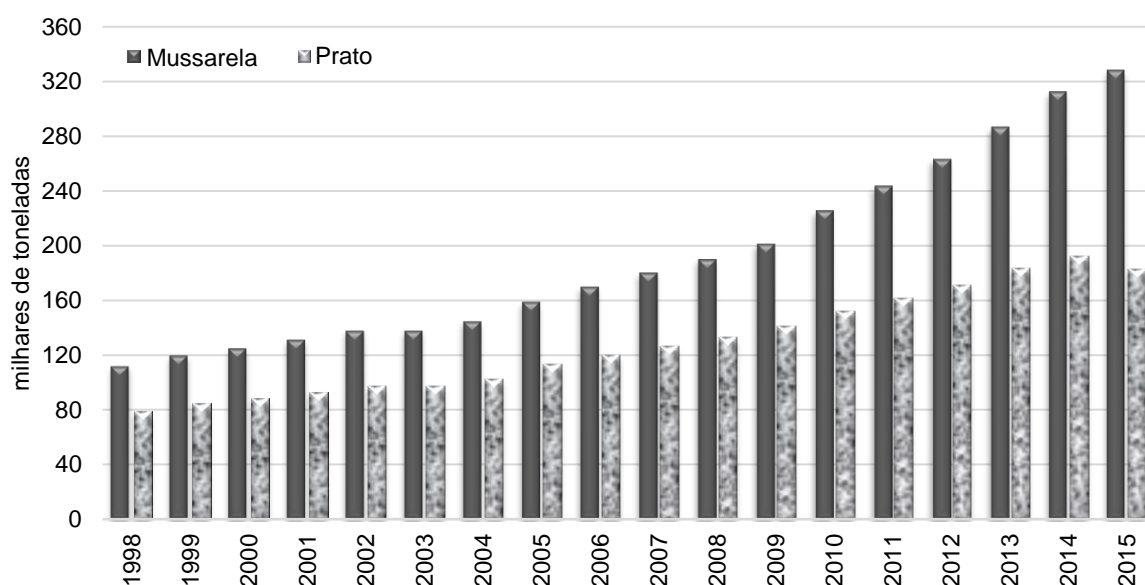


Figura 3. Produção nacional de queijos Mussarela e Prato de 1998 a 2015.

Fonte: Desk Research Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ em empresas com SIF.

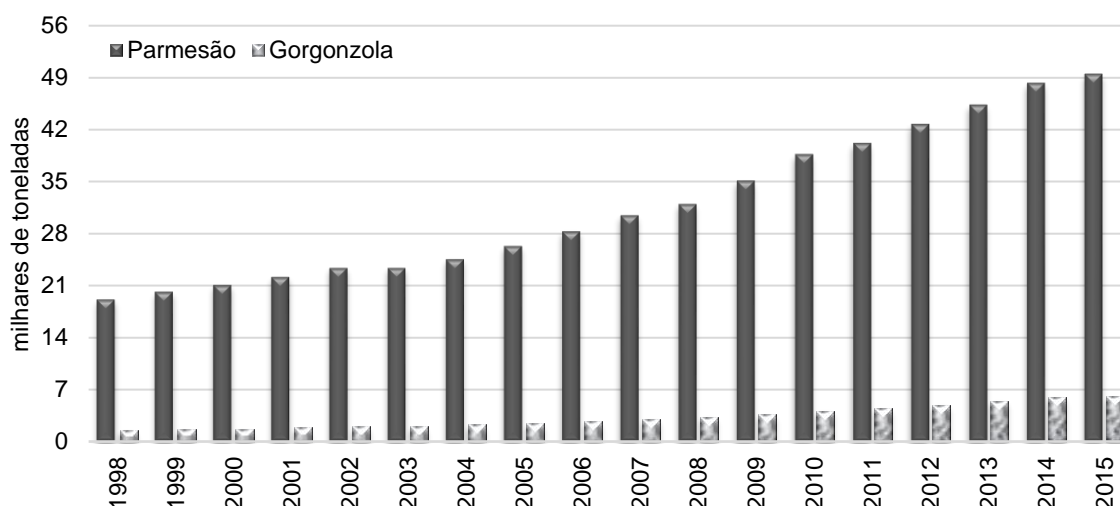


Figura 4. Produção nacional de queijos Parmesão (ralado, forma e fração) e Gorgonzola de 1998 a 2015.

Fonte: Desk Research Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ em empresas com SIF.

O consumo per capita de leite e de produtos de origem animal é determinado por fatores econômicos (como nível de renda e preços relativos), demográficos (como urbanização), além de fatores culturais e sociais. Em geral, estes tipos de produtos

possuem alta elasticidade em relação à renda, especialmente em níveis de baixa renda (GEROSA & SKOET, 2013). Segundo Oliveira et al. (2006), a elasticidade-renda de produtos lácteos é maior que a média dos alimentos, o que impacta positivamente no aumento do consumo de queijos com o aumento do poder aquisitivo da população. Entre 2005 e 2009, 31,5 milhões de pessoas migraram das classes D/E para a classe C devido a uma melhor distribuição da renda, novos empregos, entre outros, o que impactou de forma significativa no poder de compra da população (PINHA et al., 2010). O consumo per capita de queijos no Brasil em 2013 foi menor que 5,0 kg e em 2015 foi de 5,4 kg por ano, maior que o consumo no México, porém metade do consumo nos Estados Unidos (Figura 5). A expectativa baseada em previsões de mercado é que aumente para 8 kg per capita em 2017 (CARVALHO et al., 2015; ROCHA, 2016). Apesar da projeção otimista, o consumo per capita brasileiro ainda tem muito espaço para crescer, se comparado aos principais países consumidores de queijo no mundo: Estados Unidos, França, Itália, Alemanha, com mais de 15 kg/habitante/ano (FIL, 2013) e a Grécia, maior consumidor, com mais de 25 kg/habitante/ano (FILHO & POMBO, 2010).

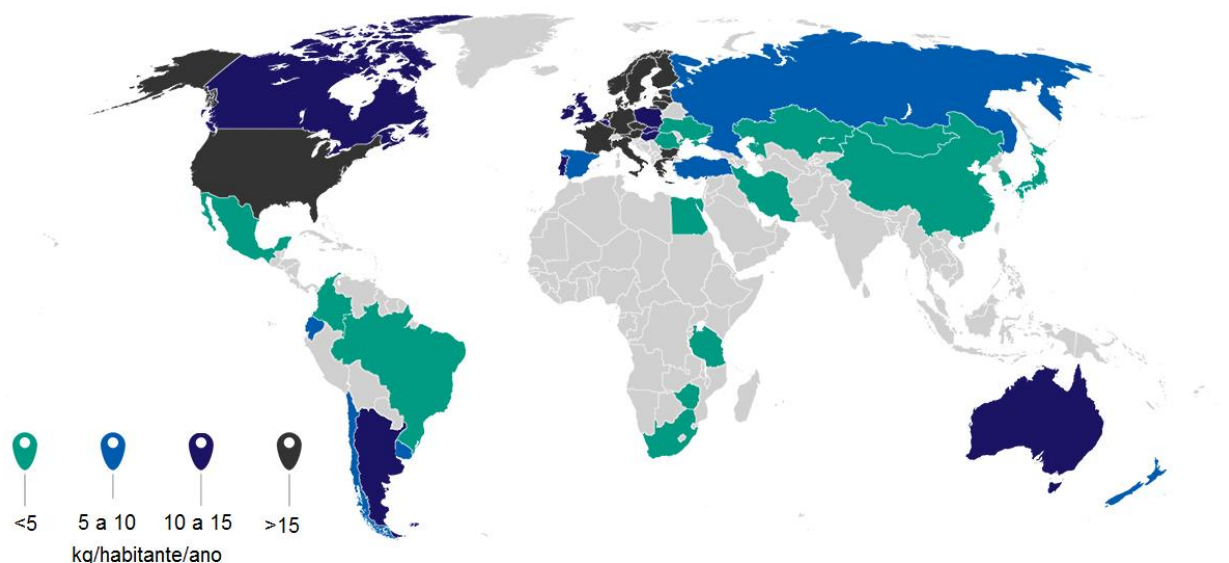


Figura 5. Consumo mundial de queijos em 2013, em kg/habitante/ano.

Fonte: FIL – Federação Internacional de Laticínios (2017).

2. Definições e classificações

Conforme a Portaria nº 146 de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é definido como “o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou

totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL, 1996). Queijo é um nome genérico para um grupo de produtos lácteos fermentados produzidos de formas diferentes em todo o mundo, com diferentes texturas e aromas, compreendendo mais de mil variedades (FOX, 2011).

Os critérios de classificação de queijos podem ser: tipo de agente coagulante (coalho ou ácido); textura/umidade (muito duro, duro, semi-duro, semi-macio, macio); fresco ou maturado; tipo de microbiota (bactérias e/ou fungos filamentosos que atuam internamente ou na superfície de queijos, bactérias propiônicas, etc), espécie de origem do leite, etc (FOX et al., 2017). Uma classificação que envolve várias características dos queijos está representada na Figura 6.

Uma das formas de categorizar os queijos mercadologicamente é inseri-los em uma das seguintes categorias: queijos comuns ou convencionais (produzidos em larga escala industrialmente e apresentam certa padronização em relação às características sensoriais), queijos finos ou especiais (produzidos normalmente em escala menor com diferenciação de preço e atributos que visam assemelhar com queijos europeus mais consumidos) e queijos artesanais (ligados à tradição e cultura regionais, apresentam atributos sensoriais específicos e característicos, produzidos em baixa escala normalmente por mão de obra familiar em propriedades rurais) (CHALITA, 2012).

A classificação comercial utilizada pela ABIQ para estimativa da produção nacional em estabelecimentos com SIF separa os queijos em três grandes grupos: grandes *commodities* (Mussarela, Prato e requeijão culinário), *commodities* intermediárias (queijos fundidos, processados, frescos, Minas padrão, coalho e parmesão ralado) e especiais (queijos com mofos brancos e azuis, amarelos especiais, suíços, duros, semi-duros e de massa filada). Para fins de cálculos de importação e exportação, o ALICEWEB (Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços) também classifica os queijos como a ABIQ, porém com diferenças nas variedades de queijos que pertencem a cada classe, sendo: grandes *commodities* (Mussarela, massa semidura e massa macia), *commodities* intermediárias (queijos fundidos, frescos, ralados e de massa dura) e especiais (queijos mofados e demais queijos) (ZOCCAL, 2016).

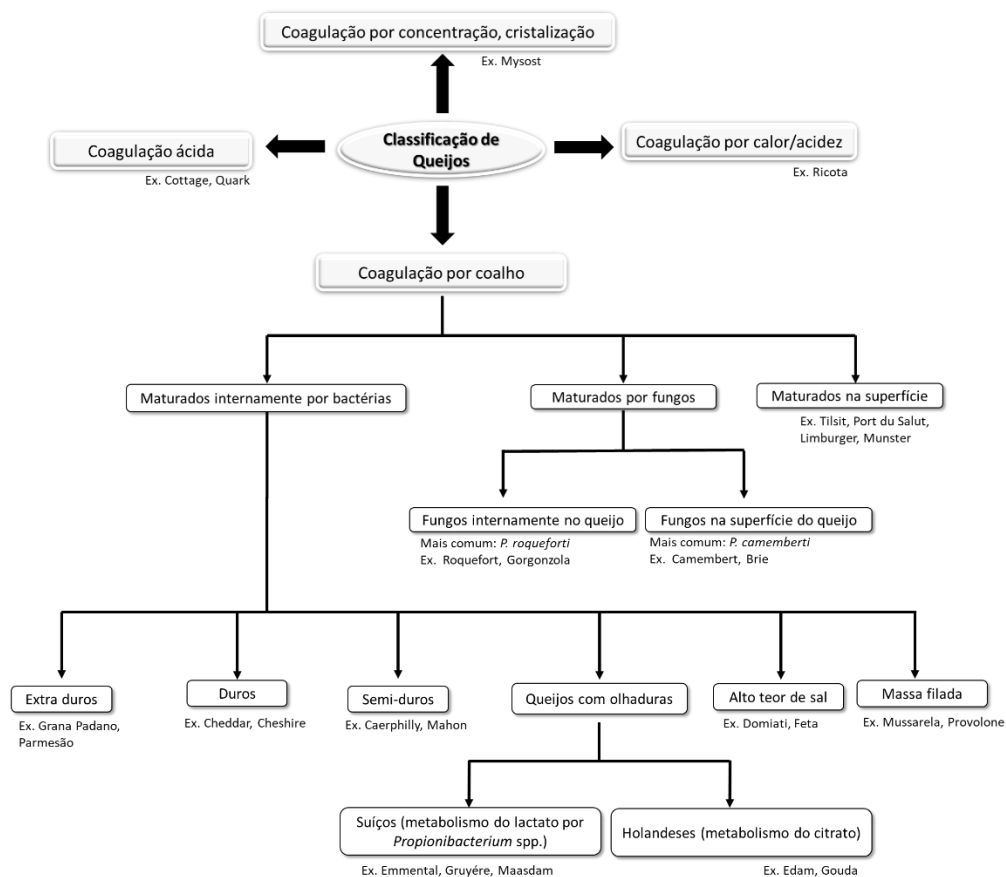


Figura 6. Classificação dos queijos em grupos de acordo com o tipo de coagulação, principais agentes coagulantes e tipo de tecnologia.

Fonte: adaptado de FOX et al. (2017).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) dos Queijos (BRASIL, 1996) classifica os queijos produzidos no Brasil quanto ao seu teor percentual de umidade e gordura no extrato seco (GES) conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação geral de queijos em função do percentual de gordura no extrato seco e de umidade, conforme Portaria nº 146 /1996 do MAPA

% Gordura no extrato seco	Classificação
mínimo 60,0%	Queijo extra gordo ou duplo creme
45,0 – 59,9%	Queijo gordo
25,0 – 44,9%	Queijo semigordo
10,0 – 24,9%	Queijo magro
máximo 10,0%	Queijo desnatado
% Umidade	Classificação
máximo 35,9%	Queijo de baixa umidade
36,0-45,9%	Queijo de média umidade
46,0-54,9%	Queijo de alta umidade
mínimo 55,0%	Queijo de muita alta umidade

Fonte: BRASIL (1996).

3. Produção de queijos de coagulação enzimática

A produção de queijos é essencialmente um processo de desidratação, no qual a gordura e a caseína (fração proteica) do leite são concentradas entre seis e doze vezes, conforme a variedade. O leite pode ser pasteurizado ou não, e isto depende da variedade do queijo e da legislação local (FOX & McSWEENEY, 2004). A transformação do leite em massa coagulada para produção de queijo passa tradicionalmente por cinco etapas: coagulação, acidificação, sinérese (saída de soro), enformagem e salga (PAULA et al., 2009).

A coagulação do leite pode ser realizada por ação de enzimas ou ácidos orgânicos. A coagulação ácida é obtida por abaixamento do pH do leite até 4,6 por fermentação da lactose a ácido láctico por uma cultura *starter* ou por meio de adição direta de ácidos orgânicos (FOX et al., 2015). O abaixamento do pH a valores próximos do ponto isoelétrico e consequente redução do potencial zeta das micelas de caseína permite que o impedimento eletrostático entre estas enfraqueça, facilitando a agregação (SILVA, 2012). A coagulação enzimática do leite envolve modificação das micelas de caseína por proteólise limitada conduzida por proteases presentes no coalho, seguida de agregação induzida pelo cálcio das micelas modificadas (FOX et al., 2015).

O coalho normalmente utilizado na fabricação de queijos é obtido do quarto estômago do bovino adulto ou de bezerras e é composto principalmente de duas proteinases, a quimosina e a pepsina. A quimosina (EC.3.4.23.4) é uma enzima de interesse para a indústria queijeira, dada a sua especificidade pela ligação entre os aminoácidos 105-106 da κ -caseína. A pepsina é uma enzima menos específica, mais proteolítica, que está muito relacionada ao gosto amargo em queijos (PAULA et al., 2009). A quimosina, pela sua ação proteolítica, ocasiona também a perda de glicopeptídeos hidrófilos, com cargas negativas e diminui os impedimentos estérico e eletrostático à formação de agregados micelares (SILVA, 2012). Na Figura 7 tem-se, passo a passo, as principais etapas de produção de queijos coagulados enzimaticamente.

4. Proteólise em queijos durante a maturação

A maturação ou a cura de queijos depende da composição da massa, particularmente do conteúdo de água, da microbiota e de condições externas, como temperatura e umidade nas salas de maturação (BELITZ et al., 2009).

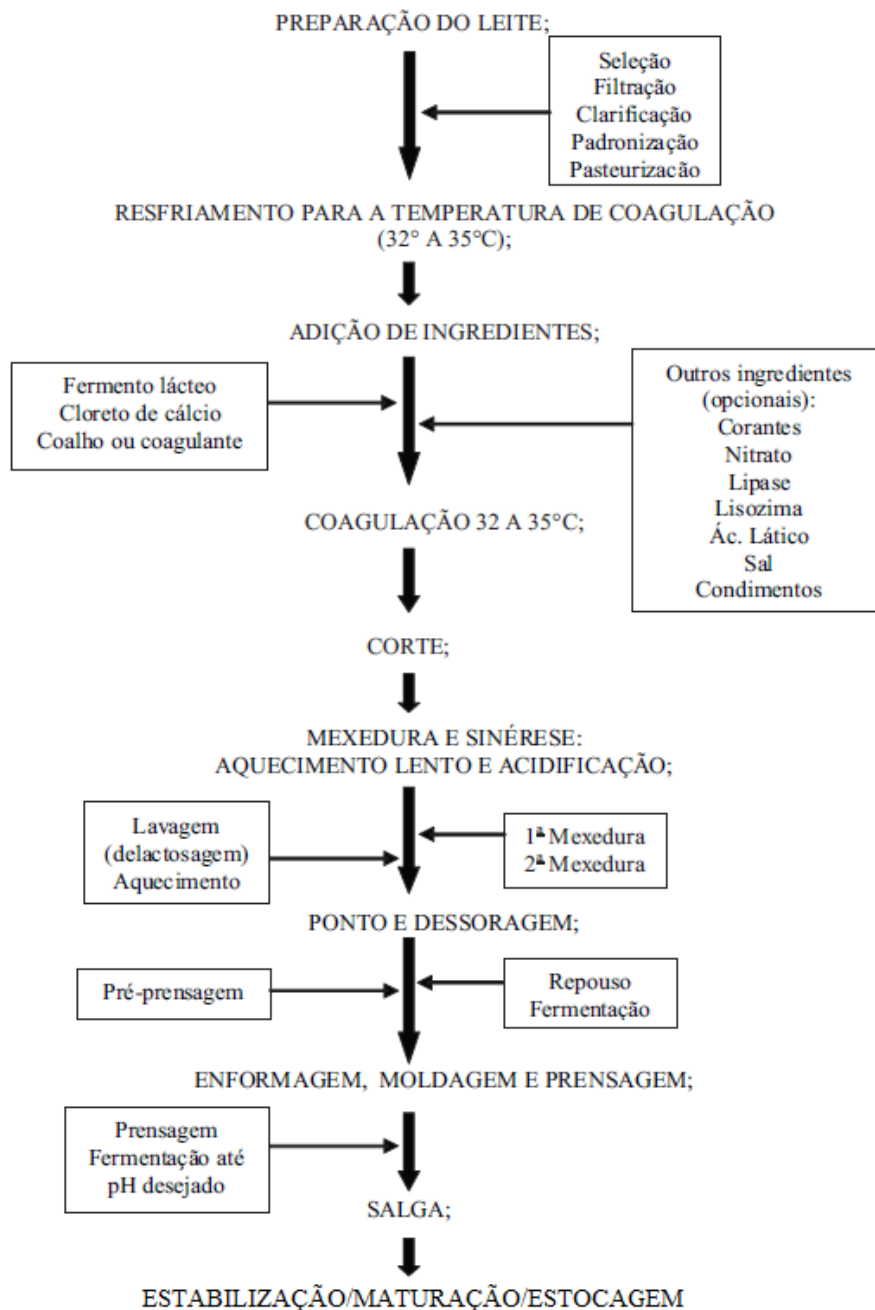


Figura 7. Etapas básicas de produção de queijo coagulado enzimaticamente.

Fonte: adaptado de PAULA et al. (2009).

Durante a maturação dos queijos ocorrem mudanças bioquímicas e microbiológicas que resultam no desenvolvimento de sabor, aroma e textura característicos de cada variedade (McSWEENEY, 2011). As mudanças bioquímicas na maturação podem ser divididas em dois grandes grupos de eventos: mudanças primárias e secundárias. Nas mudanças primárias as caseínas são convertidas em peptídeos e aminoácidos; os triacilgliceróis são hidrolisados a ácidos graxos; e o ácido láctico e os outros produtos de fermentação são formados pela degradação da lactose. Nas mudanças secundárias, ocorre a conversão dos produtos finais que resultaram das mudanças primárias:

aminoácidos são transformados em aminas, ácidos orgânicos, compostos sulfurados e dióxido de carbono; cetonas, lactonas, aldeídos e álcoois secundários resultam da degradação de ácidos graxos; ácido láctico é convertido em ácidos orgânicos e dióxido de carbono. Diversas interações entre as diferentes rotas metabólicas podem ocorrer (EL SODA, 1995).

A proteólise é o evento bioquímico mais complexo que ocorre durante a maturação de queijos e é fortemente influenciada pelo conteúdo de água e sal do queijo. A hidrólise de proteínas em aminoácidos ocorre com a formação de peptídeos como produtos intermediários e a extensão e padrão da proteólise (concentrações relativas de peptídeos e aminoácidos) variam consideravelmente entre as variedades de queijos devido a diferenças nas tecnologias de produção e de maturação (McSWEENEY, 2004). Aminoácidos são precursores de compostos responsáveis pelo aroma em queijos (YVON & RIJNEN, 2001).

A proteólise também afeta a textura do queijo (BELITZ et al., 2009). A proteólise faz com que a textura do queijo fique mais macia devido à hidrólise da matriz caseínica e também pelo decréscimo da atividade de água devido às mudanças nas ligações com a água, provocadas pelos novos grupos carboxílicos e amínicos gerados na hidrólise (SOUSA et al., 2001).

Foi demonstrado que a solubilidade proteica difere ao longo da maturação, indicando que os produtos da proteólise primária aumentam nos primeiros meses de maturação e tem potencial para serem degradados nos últimos meses (IVENS et al., 2017). Embora seja possível que a proteólise que ocorre em queijos durante a produção e maturação diminua a solubilidade das proteínas, a estrutura nativa das caseínas é altamente linear sugerindo que a proteólise pode não diminuir dramaticamente sua solubilidade. Estudos indicam que resíduos solúveis e detectáveis variam com o processo de maturação do queijo (IVENS et al., 2017).

Outro grupo de substâncias formadas nos queijos durante a maturação são as aminas bioativas (VALE & GLÓRIA, 1998). Estas são compostos nitrogenados básicos formados principalmente pela descarboxilação de aminoácidos ou pela aminação de aldeídos e cetonas; são bases orgânicas com baixa massa molecular (GLÓRIA, 2006). Esses compostos podem ser produzidos durante a estocagem ou processamento de produtos por bactérias dos **gêneros** *Bacillus*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Lactobacillus* (como *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus delbrueckii*). As aminas bioativas de vários alimentos têm sido amplamente estudadas devido a suas

propriedades funcionais, entretanto, em concentrações elevadas, podem apresentar efeitos adversos à saúde humana (EFSA, 2011).

A proteólise de um queijo pode ser medida em termos de extensão e profundidade (CHAVES et al., 1999; TEICHMANN et al., 2003; ARENAS et al., 2014; UBALDO et al., 2015; BARBOSA et al., 2016). A extensão da proteólise está relacionada com a hidrólise do paracaseinato de cálcio ao longo do tempo, principalmente devido à ação de quimosina residual, cuja atividade é influenciada pelo pH e, conseqüentemente, pela acidez. Este parâmetro é calculado pela razão entre o percentual de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e o nitrogênio total, sendo composto principalmente por peptídeos de massa molecular média e baixa, proteose-peptonas e aminoácidos (WOLFSCHOON POMBO & LIMA, 1989; BANSAL et al., 2010).

A profundidade da proteólise é dada pelo quociente entre o percentual de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético - TCA a 12% (m/v) e o teor de nitrogênio total do queijo. Este parâmetro demonstra o quanto do nitrogênio total está presente principalmente na forma de peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos livres. Essa proteólise é realizada principalmente por bactérias do fermento e contaminantes, e interfere de forma importante no sabor do queijo ao final de sua maturação (WOLFSCHOON POMBO & LIMA, 1989; BANSAL et al., 2010). Não é possível prever o limiar de precipitação induzido por TCA, seja em relação ao número de resíduos ou à massa molecular de peptídeos, uma vez que isso depende das características dessas moléculas, principalmente o grau de fosforilação. O tamanho dos peptídeos solúveis em TCA 12% varia em média entre 2 a 20 resíduos de aminoácidos (ADDEO et al., 1994).

Durante a maturação, a proteólise é catalisada por enzimas do coagulante (quimosina, pepsina, proteases microbianas ou de plantas); proteases presentes no leite (plasmina e possivelmente catepsina D e outras enzimas de células somáticas); enzimas das bactérias *starter*, *non-starter* ou de culturas secundárias utilizadas na fabricação de queijos (*Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, *Propionibacterium* sp., *Brevibacterium linens* entre outras); proteases exógenas ou peptidases ou ambas, adicionadas para acelerar a maturação (SOUSA et al., 2001). Na Figura 8 tem-se a evolução da proteólise no queijo e os principais agentes proteolíticos envolvidos em cada etapa do processo. Bactérias *non-starter* não são comuns no início da maturação de queijos feitos de leite pasteurizado, porém com o tempo (a partir de 2 meses de maturação) observa-se uma diminuição da população da microbiota *starter* e um aumento da *non-starter*. Estas são as principais responsáveis por degradar peptídeos e outros produtos da proteólise primária em aminoácidos livres e peptídeos menores (FOX et al., 2015).

A plasmina (E.C. 3.4.21.7) é uma protease naturalmente presente no leite associada às micelas de caseína (WALSTRA & JENNESS, 1984). A plasmina preferencialmente hidrolisa β -caseína em peptídeos menores durante a proteólise primária, porém, em torno de 50% da quantidade inicial de β -caseína permanece após 6 meses de maturação por essa fração ser altamente hidrofóbica e possuir baixa atividade de água (FOX et al., 2015). A plasmina é altamente hidrolítica para α_{s2} -caseína e exibe baixa atividade em α_{s1} -caseína, entretanto não apresenta efeito hidrolítico aparente em κ -caseína (IVENS et al., 2017). A plasmina resiste totalmente à pasteurização (WALSTRA & JENNESS, 1984) e sua atividade é mais significativa em variedades de queijos que são cozidos em temperaturas mais altas. Nessas variedades, a plasmina resiste à temperatura de cozimento ($\approx 55\text{ }^{\circ}\text{C}$), enquanto a maior parte da atividade da quimosina é perdida. Além disso, ocorre também a ativação do plasminogênio, provavelmente devido à inativação térmica dos inibidores dos ativadores de plasminogênio (McSWEENEY, 2004). Na Figura 9 está apresentado o sistema plasmina/plasminogênio do leite.

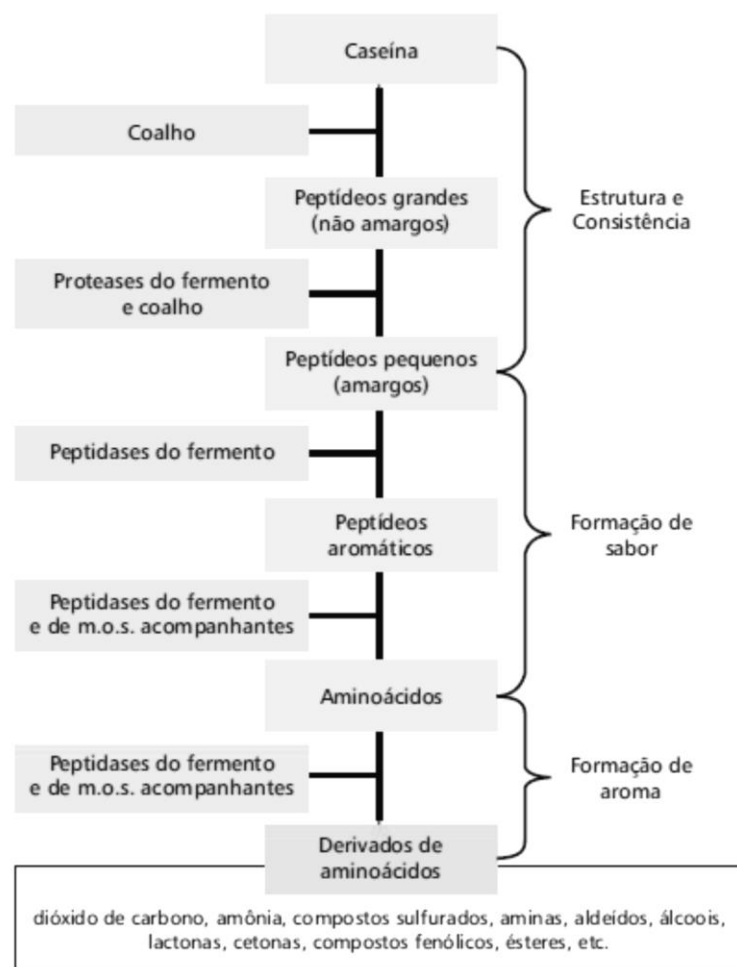


Figura 8. Evolução da proteólise em queijos.

Fonte: HA-LA BIOTEC INFORMATIVO (2006).

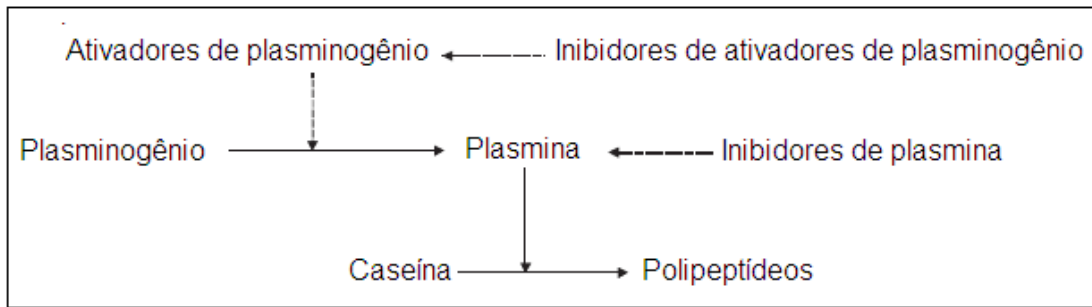


Figura 9. Sistema plasmina/plasminogênio do leite.

Fonte: McSWEENEY (2004).

A maior parte da atividade do coagulante adicionado ao leite é perdida no soro. Apenas de 10 a 15% da atividade de quimosina permanece na coalhada e isso depende de fatores que incluem tipo de coagulante, fração de diferentes enzimas em misturas, temperatura de cozimento, variedade do queijo e umidade do produto final (SOUSA et al., 2001). α_{S1} -caseína é hidrolisada por quimosina residual em muitos sítios durante os primeiros estágios da maturação, enquanto a β -caseína é altamente resistente (BØRSTING et al., 2012). A atividade de quimosina diminui com o tempo e a taxa de atividade é dependente de diversos fatores, como a variedade do queijo e outras características bioquímicas como teores de umidade, e de sal, pH, e as temperaturas durante a produção e a maturação. A fração remanescente de κ -caseína é muito resistente à proteólise nos primeiros estágios de maturação e não foi documentada degradação de para- κ -caseína por quimosina durante a maturação de queijos (IVENS et al., 2017). Peptídeos maiores solúveis em pH 4,6 são tipicamente derivados da ação da quimosina enquanto os fragmentos insolúveis neste valor de pH são tipicamente γ -caseína derivada da ação de plasmina na β -caseína (FOX et al., 2015).

Todas as proteases, incluindo as do coalho e as de origem bacteriana, são capazes de produzir peptídeos amargos a partir da caseína e cerca de vinte deles foram isolados da degradação das caseínas por ação de proteases diversas. O gosto amargo origina-se de peptídeos amargos que têm como característica comum hidrofobicidade ou alta solubilidade em solventes orgânicos (FURTADO, 1991). Em solução, quimosina é capaz de hidrolisar β -caseína em sete sítios, muitos dos quais localizados próximo à hidrofóbica ponta C-terminal desta fração caseínica (ex. Leu192-Tyr193), que pode levar à produção de peptídeos de cadeia curta, hidrofóbicos e de gosto amargo (McSWEENEY, 2011).

4.1 Textura em queijos

Os queijos foram um dos primeiros alimentos a serem analisados reologicamente por métodos fundamentais, testes mecânicos em que, ao se aplicar determinada força sobre um material homogêneo, podem ser mensuradas propriedades físicas inerentes a este material (FOEGEDING & DRAKE, 2007; TUNICK, 2010). A textura é um termo subjetivo que descreve percepção sensorial, enquanto a reologia é o estudo de fluxo e deformação de um elemento sob uma força aplicada, sendo assim um método de quantificar a textura (JACK & PATERSON, 1992; FOEGEDING & DRAKE, 2007; EVERETT & AUTY, 2008). Mesmo que a relação entre esses dois conceitos não seja sempre satisfatória, a reologia fornece de forma indireta e objetiva dados importantes que estão relacionados com as interações entre os componentes estruturais do queijo, e permite o estabelecimento de mecanismos que expliquem suas propriedades funcionais (EVERETT & AUTY, 2008).

A TPA - *Texture Profile Analyses* - é capaz de simular compressões consecutivas em um pedaço de queijo durante a mastigação, a qual envolve várias compressões entre os dentes molares. O perfil de força/tempo gerado permite a determinação de propriedades mecânicas como dureza, coesividade, gomosidade, adesividade e mastigabilidade, que correspondem a parâmetros sensoriais de mesmo nome (GUNASEKARAN & AK, 2003). Uma típica curva força/tempo de um teste de compressão em duas etapas para queijos está apresentada na Figura 10 e a Tabela 2 lista os principais parâmetros de textura obtidos em uma TPA com suas características.

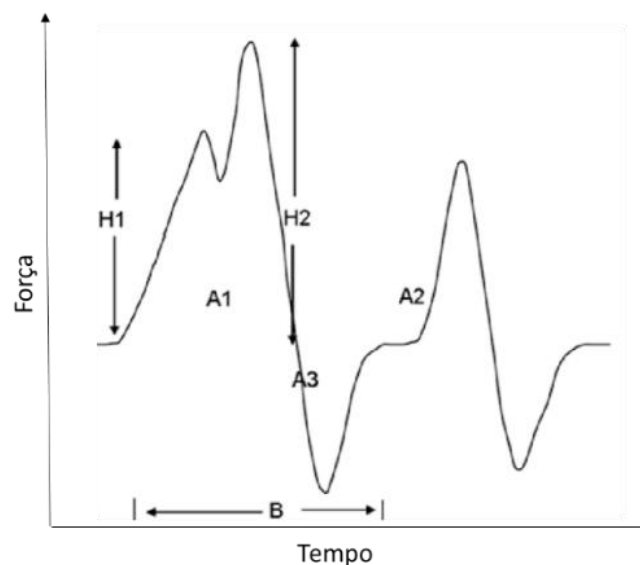


Figura 10. Curva típica força/tempo de um teste de compressão em duas etapas para queijos.

Fonte: adaptado de FOX et al. (2017).

Tabela 2. Parâmetros de textura, definição, representação na curva e unidades

Parâmetros de Textura	Definição	Representação na curva	Unidade
Fraturabilidade	Característica de uma substância que pode ser facilmente quebrada em duas partes.	Altura do primeiro pico na primeira compressão (H1 na Figura 10)	Newton, Pascal
Dureza	Resistência a uma dada deformação. Força necessária para comprimir uma amostra de queijo.	Altura do segundo pico na primeira compressão (H2 na Figura 10)	Newton, Pascal
Elasticidade	Habilidade de uma substância de retornar à sua forma inicial após ser submetida à pressão.	Altura que a amostra recupera entre o final da primeira compressão e o início da segunda compressão.	cm, mm
Adesividade	Esforço envolvido na supressão de forças que mantém duas superfícies em contato. Força requerida para retirar a amostra do palato enquanto mastigada.	Área do pico negativo formado quando a sonda é retirada da amostra após a primeira compressão, devido à adesão do queijo que retarda sua retração. Área A3 na Figura 10.	Joule
Coesividade	Quantidade de deformação sofrida por um material antes da ruptura ao ser mordido completamente usando molares. A medida na qual a massa mastigada se mantém unida na boca.	Razão entre as áreas da primeira e segunda compressão. A2/A1 na Figura 10.	Adimensional
Gomosidade	Energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido até o ponto de engoli-la.	Produto da dureza multiplicada pela coesividade.	Newton, Pascal
Mastigabilidade	Quantidade de trabalho necessário para mastigar uma amostra sólida até o ponto de engoli-la.	Produto da multiplicação entre dureza, coesividade e elasticidade.	Joule

Fontes: adaptado de GUNASEKARAN e AK (2003); FOEGEDING e DRAKE, (2007); ROHM e JAROS, (2011); FOX et al. (2017).

A textura de queijos pode também ser avaliada por análise sensorial, em especial a análise descritiva quantitativa (ADQ), em que um painel treinado de provadores descreve a textura de queijos com base em atributos pré-definidos. Esta abordagem possui as desvantagens de ser onerosa, demorada, menos precisa e sujeita a fadiga sensorial dos provadores, enquanto as técnicas instrumentais são mais confiáveis, reproduzíveis, rápidas e menos dispendiosas, embora incapazes de determinar precisamente a aceitação dos consumidores. Dessa forma, é interessante que haja uma boa correlação entre a análise sensorial e instrumental, para que possa ser feita uma inferência entre a

aceitação do consumidor e as propriedades físicas medidas pelo texturômetro (JACK & PATERSON, 1992; FOEGEDING & DRAKE, 2007; FOX et al., 2017)

Dureza, coesividade e adesividade foram analisadas em *cream cheese*, tanto por ADQ quanto por TPA e boas correlações foram encontradas para dureza e adesividade (KEALY, 2006). De uma forma geral, resultados obtidos em equipamentos tipo 'Instron' apresentam boas correlações com medidas sensoriais para mastigabilidade, dureza e elasticidade (JACK & PATERSON, 1992). Em queijos macios, correlações significativas foram encontradas entre a avaliação sensorial e o método instrumental de penetração e compressão uniaxial para firmeza e força (HENNEQUIN & HARDY, 1993). Em queijos *Parmigiano Reggiano*, a elasticidade, deformidade e firmeza (sensoriais) apresentaram correspondência com as variáveis reológicas módulo de elasticidade, força e tensão na fratura e fraturabilidade (NOËL et al., 1996). Em trabalho realizado com o queijo Pecorino di Farindola com diferentes tipos de coalho, tanto a análise de textura instrumental como sensorial foram capazes de distinguir os queijos pelo tipo de coalho utilizado (SUZZI et al., 2015).

As propriedades reológicas dos queijos estão relacionadas a várias características: composição (teores de umidade, gordura e proteína); microestrutura, que representa a distribuição espacial dos componentes (caseínas, minerais, gordura, umidade e solutos dissolvidos como lactose, ácido láctico, sais solúveis e peptídeos) em nível de escala micrométrica e atrações intra- e inter-moleculares; macroestrutura, a qual representa o arranjo e as atrações entre os diferentes macro componentes (partículas da coalhada, bolsas de gás, veias e casca) que determinam a presença de heterogeneidades como rachaduras e fissuras; estado físico-químico dos componentes, que é a razão de gordura sólida/líquida afetada pela temperatura, nível de agregação, hidratação e hidrólise protéica. (FOX et al., 2017).

A matriz protéica é o principal componente estrutural que controla a reologia de queijos e, portanto, a concentração de proteína, os níveis de hidratação e a hidrólise são cruciais nas características de textura que este queijo vai apresentar (DELGADO et al., 2010; FOX et al., 2017). Hennequin e Hardy (1993) analisaram queijos macios e concluíram que para este tipo de queijos, pH e teores de extrato seco, gordura e cálcio foram os principais aspectos que explicaram as propriedades de textura do produto final. Gordura, umidade, nitrogênio solúvel em TCA 12%, pH e proteólise demonstraram ter correlação com a textura de queijos maturados. O papel da acidez na textura é importante, uma vez que baixa acidez diminui a interação intermolecular na matriz protéica por repulsão de cargas, enquanto o contrário pode ser observado quando a

acidez é maior. A textura é o produto das interações entre todos os componentes do queijo (JACK & PATERSON, 1992).

5. Algumas variedades de queijos produzidos no Brasil

5.1 Queijo Prato

O queijo Prato é um queijo de massa semicozida que começou a ser fabricado primeiramente no Brasil, na década de 1920, por imigrantes dinamarqueses, que procuraram produzir um queijo similar aos queijos Danbo dinamarquês e Gouda holandês (FURTADO & NETO, 1994). Ao longo dos últimos 80 anos, o queijo Prato vem passando por inúmeras modificações, seja em sua tecnologia de fabricação ou na maneira como é consumido. Por ter se tornado um dos queijos mais fabricados no Brasil, foi inevitável o uso de equipamentos modernos e diferentes métodos de fabricação e maturação, o que fez com que se distanciasse das características típicas de textura e sabor dos queijos elaborados pelos pioneiros dinamarqueses (FURTADO & AMORIM, 2000). Atualmente o queijo Prato é bem aceito devido à sua qualidade sensorial e pelo fato de que os consumidores o encontram com facilidade e em embalagens práticas, convenientes e de tamanho adequado (BASTOS et al., 2013).

As características do queijo Prato conforme seu Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) estão indicadas na Tabela 3. A denominação Prato compreende ainda outros tipos, tais como o lanche ou *sandwich*, de forma retangular, o cobocó, de forma cilíndrica e o esférico ou bola (ALBUQUERQUE, 2002).

5.2 Queijo Mussarela

A Mussarela é uma variedade não maturada da família dos queijos *Pasta-filata*, originária do sul da Itália. Era originalmente produzida com leite de búfala, porém o leite de vaca é atualmente o mais utilizado para sua fabricação em todo o mundo (JANA & MANDAL, 2011). Queijos de massa filada como a Mussarela são caracterizados por possuir textura maleável, macia, fibrosa e fatiável, qualidades essas que são oriundas da etapa de filagem. Nesta etapa a massa fermentada é submetida a um tratamento térmico que lhe confere uma plasticidade particular e o queijo apresenta então uma estrutura fibrosa com fibras orientadas pelo esticamento da massa (FOX & McSWEENEY, 2004).

Tabela 3. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação do queijo Prato conforme RTIQ

Queijo Prato	
Classificação	- Queijo gordo, de média umidade.
Forma e peso	<ul style="list-style-type: none"> - Forma: Paralelepípedo de seção transversal, retangular, cilíndrico ou esférico, de acordo com a variedade correspondente: <ul style="list-style-type: none"> • Queijo Prato (lanche ou <i>sandwich</i>): paralelepípedo de seção transversal retangular • Queijo Prato (cobocó): cilíndrico • Queijo Prato (esférico ou bola): esférico - Peso: de 0,4 a 5 kg, de acordo com a variedade correspondente.
Características sensoriais	<ul style="list-style-type: none"> - Consistência: semidura, elástica. - Textura: compacta, lisa, fechada, com alguns olhos pequenos arredondados e/ou algumas olhaduras mecânicas. - Cor: amarelado ou amarelo-palha - Sabor: característico. - Odor: característico. - Crosta: não possui, ou com crosta fina, lisa, sem trincas. - Olhaduras: algumas olhaduras pequenas, bem distribuídas, ou sem olhaduras.
Maturação	- Tempo necessário para conseguir as características específicas (pelo menos 25 dias).

Fonte: BRASIL (1997a).

A qualidade da Mussarela depende de suas propriedades físico-químicas e é influenciada pela cultura *starter* utilizada na sua fabricação, podendo ser tanto mesofílica quanto termofílica, dependendo das características desejadas no produto final (CHAVES et al., 1999). Na Tabela 4 estão descritas as características da Mussarela feita no Brasil, conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade – RTIQ (BRASIL, 1997b).

O termo *pizza cheese* tornou-se comum nos Estados Unidos na década de 1960 e é utilizado para designar o queijo tipo Mussarela preparado especialmente para utilização como ingrediente na confecção de pizzas (FURTADO, 1997). As propriedades funcionais de um queijo são aquelas ligadas à sua funcionalidade, isto é, às suas características desejadas para o uso que se pretende, estão relacionadas à sua capacidade de atender aos requisitos exigidos para sua utilização como ingrediente em determinada preparação alimentar (GUINEE et al., 2000). Neste contexto as propriedades funcionais da Mussarela a ser utilizada como ingrediente de pizzas incluem o escurecimento não enzimático (*browning*) (formação localizada de manchas escuras, cuja coloração varia do amarelo ao marrom-escuro, sobre o queijo derretido na pizza); formação de bolhas quando aquecido; derretimento e separação limitada de gordura (COSTA & FURTADO,

2002a, 2002b, 2002c; KINDSTEDT et al., 2010). Variações nas condições de produção, e temperatura e tempo de estocagem podem influenciar as propriedades funcionais da Mussarela (CHAVES et al., 1999).

Tabela 4. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação da Mussarela conforme RTIQ

Queijo Mussarela	
Classificação	- Queijo de média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo ou semigordo (umidade máxima 60,0 g/100 g e matéria gorda no extrato seco mínimo 35,0 g/100 g).
Forma e peso	- Variáveis.
Características sensoriais	<ul style="list-style-type: none"> - Consistência: semidura e semi suave, suave, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação. - Textura: fibrosa, elástica e fechada. - Cor: branco e amarelado, uniforme, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação. - Sabor: láctico, pouco desenvolvido a ligeiramente picante, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação. - Odor: láctico pouco perceptível. - Crosta: não possui. - Olhadura: não possui. Eventualmente poderá apresentar aberturas irregulares (olhos mecânicos).
Maturação	- Mínimo 24 horas de estabilização.

Fonte: BRASIL (1997b).

5.3 Queijo Gorgonzola

O queijo Gorgonzola é um queijo feito a partir de leite de vacas, de origem italiana, especificamente na região da Lombardia (LOURENÇO NETO, 1984; ALBUQUERQUE & CASTRO, 1995). É maturado pelo crescimento da cultura secundária de *Penicillium roqueforti*, que cresce internamente nas olhaduras mecânicas do queijo ou nas perfurações realizadas após a salga. A forte ação proteolítica e lipolítica do fungo leva ao desenvolvimento de sabor e aroma pronunciados durante a maturação do queijo, que ocorre entre 60 e 120 dias em câmaras com temperatura e umidade relativa do ar controladas (4 a 6 °C, umidade relativa de 85 a 90%). Após 12 a 20 dias de fabricação os queijos são perfurados para promover penetração de oxigênio no seu interior, indispensável para o crescimento do *Penicillium* (FURTADO, 1991; GOBBETTI et al., 1997). A lipólise e a proteólise são eventos importantes na maturação de queijos azuis (FOX, 2011).

Na Tabela 5 estão indicadas as características do queijo Gorgonzola conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para queijos azuis, definidos como: “produto obtido da coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, e mediante um processo de fabricação que utiliza fungos específicos (*Penicillium roqueforti*), complementados ou não pela ação de fungos e/ou leveduras subsidiárias, encarregadas de conferir ao produto características típicas durante os processos de elaboração e maturação”.

Tabela 5. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação dos queijos azuis conforme RTIQ

Queijos Azuis	
Classificação	- Queijo gordo, de média a alta umidade.
Forma e peso	- Formato: cilíndrico. Peso: 2 a 13 kg.
Características sensoriais	<ul style="list-style-type: none"> - Consistência: semidura, quebradiça ou semidura pastosa. - Textura: aberta, com desenvolvimento de mofos distribuídos de maneira razoavelmente uniforme. - Cor: branco a branco-amarelado uniforme, com veias características de cor verde, verde-azulado ou verde-acinzentado. - Sabor: picante, salgado, característico. - Odor: característico acentuado. - Casca: rugosa, frágil, sem trinca irregular. Pode apresentar untuosidade superficial, de cor ligeiramente cinza e/ou incipiente desenvolvimento de fungos e/ou leveduras subsidiárias. - Olhos: não possui. Poderá apresentar alguns poucos olhos pequenos e disseminados e/ou algumas aberturas (olhos mecânicos).
Maturação	-Tempo necessário para atingir suas características específicas: pelo menos 35 dias a uma temperatura inferior a 15 °C.

Fonte: BRASIL (2007).

5.4 Queijo Parmesão

O queijo Parmesão é um queijo duro de baixa umidade produzido industrialmente em todo o mundo a partir de leite pasteurizado de vaca. Sua origem é italiana, especificamente no Vale do Pó no norte da Itália, sendo que os queijos *Parmigiano Reggiano* e *Grana Padano* são os principais representantes, apesar de serem produzidos de forma diferenciada do Parmesão industrial (utilizam leite cru desnatado naturalmente como matéria prima, são cozidos em temperaturas mais altas, e são maturados por mais tempo). Estes queijos italianos possuem designação de origem controlada e suas denominações são mantidas por dois *Consorti di Tutela*, sendo que o

do *Grana Padano* tem sede em Desenzano e o do *Parmigiano Reggiano* em Reggia Emilia (FURTADO, 2011; FOX et al., 2017).

Diferentemente dos queijos nos quais tem origem, o Parmesão brasileiro pode ser adicionado de ingredientes como o cloreto de cálcio, fermentos, creme de leite e concentrado de proteínas lácteas, além de poder ser envolto em filmes alimentares (BRASIL, 1997c). As características do queijo Parmesão brasileiro estão listadas na Tabela 6. O queijo Parmesão fabricado na maioria das indústrias brasileiras não tem padrão de qualidade definido e se distanciou muito do queijo original italiano, resultado do emprego de leite cru de qualidade inferior, sendo um produto muitas vezes destinado à produção de queijo ralado e que não é maturado por completo (PAULA et al., 2008).

Tabela 6. Classificação, forma, peso, características sensoriais e de maturação do queijo Parmesão conforme RTIQ

Queijo Parmesão	
Classificação	- Baixa umidade e semigordos a gordos (mínimo de 32g/100 g GES).
Forma e peso	- Formato: cilindros de faces planas, de perfil ligeiramente convexo. - Peso: 4 a 8 kg.
Características sensoriais	- Consistência: dura - Textura: compacta, quebradiça e granulosa - Cor: branca amarelada e ligeiramente amarelada - Sabor: salgado, levemente picante. - Odor: característico. - Crosta: lisa, consistente, bem formada, recoberta com revestimentos apropriados, aderidos ou não - Olhos: não possui, poderá apresentar alguns olhos pequenos e algumas olhaduras mecânicas.
Maturação	- Mínimo de 6 meses.

Fonte: BRASIL (1997c).

6. Aminoácidos em queijos

Pequenos peptídeos e aminoácidos livres em queijos contribuem diretamente para o *flavor* do produto final e os aminoácidos servem como substratos para uma grande variedade de complexas reações de formação de compostos de aroma (McSWEENEY, 2004; WALSTRA et al., 2006; FOX et al., 2015). Aminoácidos e alguns peptídeos de baixa massa molecular conferem sabor agradável aos queijos e interferem no seu gosto, visto que alguns aminoácidos possuem gosto doce, ácido ou amargo. Compostos oriundos do catabolismo de aminoácidos também fazem parte do aroma final do queijo incluindo aminas, ácidos, carbonilas, amônia e compostos sulfurados. As aminas são

particularmente importantes na caracterização de queijos maturados na superfície (McSWEENEY, 2011).

O sabor do queijo está concentrado na fração solúvel em água (peptídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, aminas, cloreto de sódio) enquanto o aroma está presente principalmente na fração volátil (FOX et al., 2015). Dos aminoácidos liberados, o ácido glutâmico é de especial importância para o sabor do queijo por estar relacionado ao gosto umami (FOX & McSWEENEY, 2004). Três grupos de gostos distintos agrupam alguns aminoácidos: amargos (leucina, lisina e fenilalanina), amargos/doces (prolina e valina), e salgado/umami (ácidos glutâmico e aspártico) (KABELOVÁ et al., 2009).

A formação de aroma em queijos ocorre durante a maturação e é um processo complexo e de especial interesse por estar implicada na caracterização intrínseca de cada queijo e também na presença de *off-flavors*, determinando assim a escolha do consumidor. Bioquimicamente a formação de aroma em queijos durante a maturação envolve três rotas catabólicas majoritárias, a saber: lipólise, glicólise e proteólise, sendo esta última de especial importância e complexidade (URBACH, 1995; YVON & RIJNEN, 2001). Somente a presença de aminoácidos livres não garante a formação de aroma em queijos, mas a sua conversão em compostos de *flavor* característico por microrganismos é o fator limitante, como pode ser visto na Figura 11 (YVON & RIJNEN, 2001 & ZULJAN et al., 2016).

A formação de compostos com propriedades aromáticas a partir de aminoácidos por microrganismos presentes em queijos envolve numerosas reações enzimáticas. As reações de transaminação (principal rota de degradação de aminoácidos por bactérias lácticas, gera α -cetoácidos que são degradados em compostos de aroma em mais um ou dois passos) e eliminação (observada principalmente para metionina e leva à formação de compostos sulfurados) são identificadas como fundamentais por iniciarem as rotas que levarão à formação dos compostos finais de degradação, portanto, o controle dessas reações pode ser usado para intensificar ou diversificar a formação de aroma em queijos. Esse controle pode ser feito pela adição de culturas secundárias com capacidade de aumentar a formação de um aroma específico, adição de intermediários da reação desejada, como o α -ceto-glutarato (receptor de nitrogênio na primeira etapa da transaminação), ou uso de culturas modificadas geneticamente com ausência ou baixa atividade de genes codificadores de enzimas formadoras de *off-flavor*, por exemplo (YVON & RIJNEN, 2001).

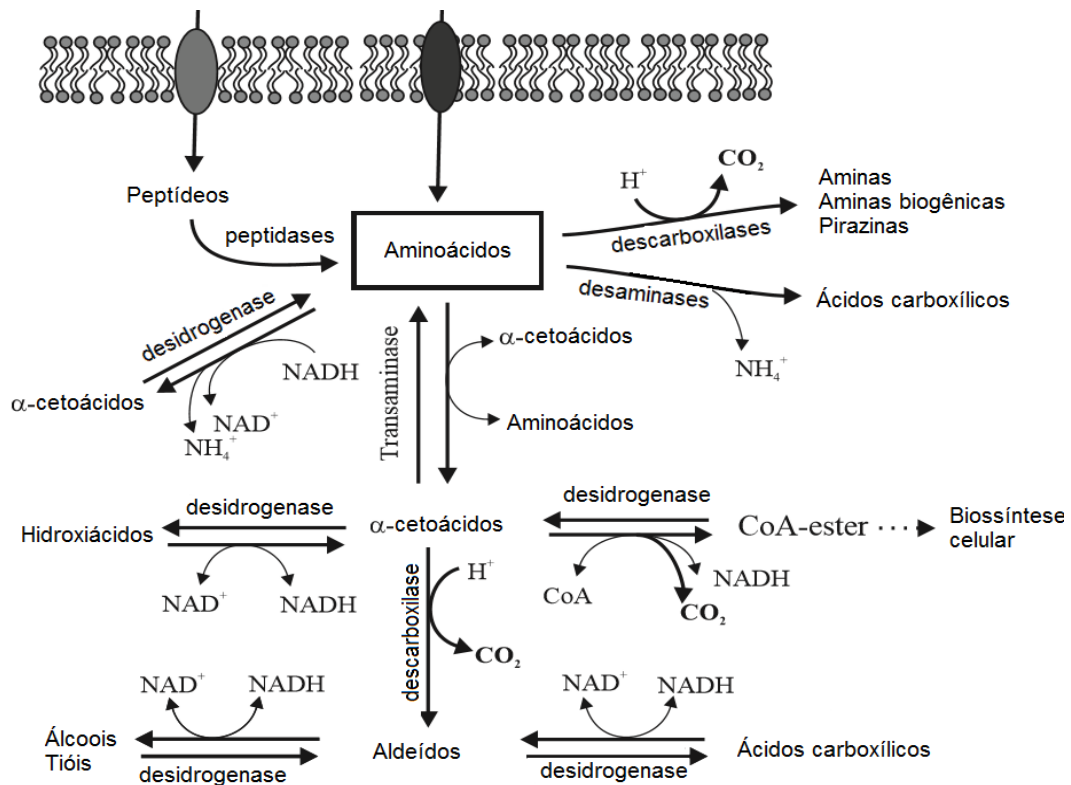


Figura 11. Visão geral das reações do catabolismo de aminoácidos relevantes para a formação de compostos de aroma em queijos.

Fonte: adaptado de ZULJAN et al. (2016).

Neste contexto, os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), ramificados (lisina, isoleucina e valina) e a metionina são os principais precursores dos compostos responsáveis pelo aroma em queijos (McSWEENEY, 2004; YVON & RIJNEN, 2001; ZULJAN et al., 2016). Os principais componentes aromáticos provenientes do catabolismo de aminoácidos são aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos e tióis, como metional, metanotiol, dissulfeto de dimetila (DMDS) e trissulfeto de dimetila (DMTS) (que tem como precursor a metionina); ácido isovalérico e 3-metil-butanal (oriundos da degradação da leucina); ácido isobutírico e etilbutirato (derivados da valina); fenilacetaldeído, 2 fenil-etanol, acetato de fenetila (derivados da fenilalanina); *p*-cresol, fenol, indol e escatol (derivados do catabolismo de aminoácidos aromáticos) (YVON & RIJNEN, 2001).

Algumas aminas liberadas por descarboxilação de aminoácidos contribuem para o *flavor* do queijo, como metilamina, etilamina, n-propilamina, isopropilamina, n-butilamina, 1-metilpropil amina, n-amilamina, isoamilamina, n-hexilamina, etanolamina, dimetilamina, dietilamina, dipropilamina e dibutilamina (comuns em Camembert) (ZULJAN et al., 2016). Provadores treinados detectaram que feniletilamina tem sabor de peixe enquanto as diaminas putrescina e cadaverina em meio aquoso possuem forte

sabor pútrido, com *thresholds* baixos, 2,2 mg/100 g e 19,0 mg/100 g, respectivamente (GLÓRIA, 2006).

O aroma de queijos não pode ser produzido sem bactérias *starter* (URBACH, 1995). Muitos microrganismos são capazes de catabolizar aminoácidos em queijos e essa capacidade depende da estirpe. Como exemplos podem ser citadas: bactérias lácticas (*Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus* e *L. casei*, *Lactococcus lactis* var. *maltigenes*), propionibactéria, *B. linens*, *Geotrichum candidum* e bactérias corineformes (YVON & RIJNEN, 2001). Em queijos maturados, nos quais a microbiota *starter* é inativada rapidamente, a velocidade de lise e liberação das enzimas influencia na produção de aminoácidos livres. O coalho é o principal responsável pela formação de peptídeos grandes, médios e pequenos, mas, sem interação com outras enzimas, é capaz de produzir apenas metionina, histidina, glicina, serina e ácido glutâmico a níveis quantificáveis (URBACH, 1995).

As leveduras produzem compostos de aroma como etanol, aldeídos e ésteres e degradam aminoácidos à amônia e o correspondente cetoácido, posteriormente o metabolismo resulta em compostos como álcoois, ésteres, metilcetonas e compostos de carbonila. *Geotrichum candidum* produz mais compostos aromáticos a partir de metionina que outras leveduras como *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis*. Os fungos *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* possuem endopeptidases e exopeptidases que contribuem ativamente para a proteólise em queijos, fazendo com que, em queijos maturados por fungos, a maturação comece na superfície. Possuem peptidases que liberam aminoácidos livres e assim possuem a propriedade de diminuir o amargor. Esses aminoácidos são então catabolisados com a produção de amônia e outros compostos voláteis (CHAMBA & IRLINGER, 2004).

Além da importância para a caracterização do produto final, a determinação de aminoácidos associados a doenças e síndromes como fenilcetonúria (fenilalanina e tirosina) e a síndrome do “restaurante chinês” (glutamato) são importantes para controle e prevenção de sintomas em indivíduos afetados (MORSELLI & GARATTINI, 1970; HOSKINS, 1985).

Cada variedade de queijo tem seu próprio perfil de aminoácidos livres, resultante do sistema enzimático e da degradação e interconversão de aminoácidos. A tecnologia de fabricação, incluindo culturas adicionadas e condições de maturação, bem como o leite de espécies diferentes (vaca, ovelha, búfala ou cabra), tem efeito direto no perfil de aminoácidos livres e, conseqüentemente, nas características finais de queijos (SOUSA et al., 2001; PINO et al., 2009; NIRO et al., 2017).

Na Tabela 7 estão descritos os teores de aminoácidos livres em mg/100 g em queijos obtidos na literatura. Os aminoácidos mais comumente encontrados nas diferentes variedades de queijo foram ácido glutâmico, histidina, prolina, valina, lisina, leucina e fenilalanina. Emmental, Gouda e Cabrales, todos queijos maturados, foram os que apresentaram maiores teores de aminoácidos livres totais, enquanto o Burgos, um queijo fresco, apresentou o menor teor total de aminoácidos livres entre os queijos relacionados. Dados sobre o perfil e a quantidade de aminoácidos livres nos queijos pesquisados neste trabalho, durante a maturação nas condições realizadas, não foram encontrados na literatura.

A presença em queijos do aminoácido não protéico ácido gama-aminobutírico – GABA – foi pesquisada em alguns trabalhos (GOROSTIZA et al., 2004; FIECHTER et al., 2013; REDRUELLO et al., 2013; POVEDA et al., 2016; NIRO et al., 2017). Este aminoácido é um composto bioativo que possui várias funções fisiológicas e apresenta efeitos positivos em muitas desordens metabólicas, sendo uma das mais importantes, o efeito hipotensivo. A formação deste se dá a partir da descarboxilação do L-glutamato pela enzima ácido glutâmico descarboxilase, na presença de piridoxal fosfato. Essa enzima é encontrada em bactérias do ácido lático e, portanto, a presença de GABA em produtos fermentados tais como queijos pode ser esperada (DIANA et al., 2014a). A ornitina também é um aminoácido não proteico cuja presença em queijos foi estudada por alguns autores (REDRUELLO et al., 2013; DIANA et al., 2014b; POVEDA et al., 2016). Além de possuir propriedades bioativas, é precursor direto da amina putrescina, que, por sua vez, é precursora das poliaminas espermidina e espermina (DIANA et al., 2014b; BENKERROUM, 2016).

Tabela 7. Tipos e teores de aminoácidos livres em diversas variedades de queijos

Variedade de queijo	Aminoácidos livres (mg/100 g)												Ref.
	Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Gln	NH ₄ ⁺	His	Thr	Arg	Ala	Orn	
Queijo regional espanhol (cabra)	3,3-41,2	2,0-138,9*	*	0,7-22,3	1,9-175,4	1,7-145,0	8,6-85,1	2,6-54,6	1,2-51,2	0,2-37,7	0,9-22,3	1,1-42,3	[1]
Queijo massa ácida/cozida	1,7-35,1	0,9-18,8	nd-38,4	6,8-25,3	7,3-97,0	0,6-53,2	-	1,5-35,9	1,1-29,9	0,7-18,4	2,2-28,9	0,8-29,5	[2]
Queijo (China)	-	-	-	-	-	-	-	5,7±1,3	-	6,3±1,7	-	2,9±0,2	[3]
Toma Piemontese	-	-	-	-	-	-	-	30,4±2,0	-	-	-	-	[4]
Pecorino Sardo	-	-	-	-	-	-	-	35,1±2,1	-	-	-	-	[4]
Queijos do mercado (Rep. Tcheca)	190-1170	20-590	-	20-530	480-4200	-	-	10-560	90-520	80-660	100-490	-	[5]
Emmental	3,46	73,67	19,95	49,55	412,41	136,49	61,95	103,02	79,81	38,32	43,92	21,94	[6]
Gouda	205,91	213,54	196,07	178,67	1179,25	137,66	132,83	249,79	179,16	12,72	70,56	175,77	[6]
Manchego	11,58	19,13	28,93	14,64	99,31	33,47	19,08	16,76	13,10	4,70	nd	29,74	[6]
Burgos	0,66	1,26	0,53	1,50	9,56	1,31	2,92	3,57	1,43	2,61	nd	0,53	[6]
Cheddar	3,73	22,42	16,43	16,49	126,02	44,72	33,48	29,22	23,15	11,32	nd	24,91	[6]
Cabrales	662,97	136,41	12,95	261,17	1597,39	28,21	429,12	382,13	193,09	59,58	45,88	552,73	[6]
Prato artesanal (7 dias)**	22,1±7,6	11,6±4,2	13,2±8,6	5,2±1,5	39,7±18	14,6±12	-	4,4±1,7	9,98±4,0	12,7±8,2	15,6±5,6	-	[7]
Prato artesanal (45 dias)**	116±58,3	25,4±4,2	54,2±31,7	25,1±8,5	282±168	72,0±55	-	14,0±7,1	55,2±26,1	25,9±5,9	64,1±29,5	-	[7]
Caciocavallo (30 dias)**	11,8	7,0	17,1	6,0	13,4	2,6	-	nd	6,5	0,8	28,5	76,0	[8]

Tabela 7. continua

Variedade de queijo	Aminoácidos livres (mg/100 g)											Total AA	Ref.
	Pro	Cys	Tyr	Val	Met	Lys	Ile	Leu	Phe	GABA	Trp		
Queijo regional espanhol (cabra)	12,5-186,0	0,2-14,6	0,5-54,7	4,1-141,4	2,4-62,2	5,3-172,4	1,9-96,9	11,9-188,1	2,7-48,5	2,6-62,0	nd	76,2-1720,2	[1]
Queijo massa ácida/cozida	2,0-28,4	-	0,8-31,9	1,2-55,7	0,6-38,9	1,6-143,8	0,6-40,8	1,4-105,6	1,3-80,2	nd-11,2	0,8-28,6	51,0-839,9	[2]
Queijo (China)	-	-	12,0±2,9	-	-	19,1±3,6	-	-	19,3±3,6	-	1,4±0,1	67,6	[3]
Toma Piemontese	-	-	nd	-	-	45,7±2,4	-	-	-	-	nd	-	[4]
Pecorino Sardo	-	-	nd	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	[4]
Queijos do mercado (Rep. Tcheca)	260-2180	-	30-470	10-1240	10-440	210-1590	30-710	210-1460	110-970	-	-	2300-15950	[5]
Emmental	224,96	9,81	111,07	178,18	58,79	254,08	121,60	300,66	131,16	2,58	16,13	2391,58	[6]
Gouda	303,02	30,90	284,83	543,81	214,86	625,99	473,82	893,73	389,52	4,12	29,00	6592,69	[6]
Manchego	40,53	10,06	57,80	66,89	21,04	47,80	24,79	133,28	68,06	0,52	7,35	749,47	[6]
Burgos	0,46	nd	7,07	1,29	0,30	1,17	0,92	1,05	1,65	nd	1,64	38,51	[6]
Cheddar	68,10	4,12	35,69	61,43	21,68	79,60	34,24	126,59	88,95	4,78	3,13	846,72	[6]
Cabrales	110,52	83,24	194,96	892,57	354,37	870,71	614,71	1089,32	552,73	476,0	105,59	8921,01	[6]
Prato artesanal (7 dias)**	13,2±8,4	21,0±1,0	7,2±4,3	14,2±7,1	4,8±2,5	23,9±12,1	5,5±3,1	39,1±23,7	25,2±13,4	80,1±47,7	31,4±25,1	415±183	[7]
Prato artesanal (45 dias)**	40,9±25,3	54,5±3,3	19,0±10,3	70,7±31,7	32,2±15,2	147±68,8	37,7±18,7	212±109	98,2±39	336±239	151±84,4	1933±791	[7]
Caciocavallo (30 dias)**	-	-	nd	30,7	6,9	33,1	11,4	53,7	46,4	33,6	-	385,5	[8]

Legenda: Asp/ácido aspártico, Ser/serina, Asn/asparagina, Gly/glicina, Glu/ácido glutâmico, Gln/glutamina, NH₄⁺/íon amônio, His/histidina, Thr/treonina, Arg/arginina, Ala/alanina, Orn/ornitina, Cys/cistina, Tyr/tirosina, Val/valina, Met/metionina, Lys/lisina, Ile/isoleucina, Leu/leucina, Phe/fenilalanina, GABA/ácido gama-aminobutírico, Trp/triptofano, AA/aminoácidos. nd: não detectado. - : não determinado.

*Asn e Ser foram quantificadas juntamente nesta referência. **Resultados em mg/100 g de extrato seco. Queijo Prato artesanal feito a partir de leite cru.

Fontes: [1] POVEDA et al. (2016); [2] FIECHTER et al. (2013); [3] HE et al. (2016); [4] MAZZUCCO et al. (2010); [5] KABELOVÁ et al. (2009); [6] REDRUELLO et al. (2013); [7] GOROSTIZA et al. (2004); [8] NIRO et al. (2017).

7. Aminas bioativas em queijos *

* Tópico publicado em MOREIRA, G.M.M.; CUSTÓDIO, F.B.; GLÓRIA, M.B.A. **Informe Agropecuário**, v. 36, n. 284, p. 14–18, 2015 (ANEXO I).

Aminas são compostos nitrogenados de caráter básico, nos quais um, dois ou três átomos de hidrogênio na amônia são substituídos por grupos alquila ou arila (SHALABY, 1996). Aminas bioativas ou biologicamente ativas são aquelas aminas que possuem funções metabólicas e fisiológicas nos organismos vivos, incluindo funções cruciais em células eucarióticas, e por serem produzidas por rotas metabólicas usuais de animais, plantas e microrganismos, estão presentes também nos alimentos (GLÓRIA, 2006; ALVAREZ & MORENO-ARRIBAS, 2014).

As aminas bioativas podem ser classificadas quanto ao número de grupos amino, quanto ao tipo de estrutura, funções fisiológicas ou biossíntese, sendo esta última classificação a mais adotada. Dessa forma, quanto à rota biossintética, as aminas bioativas podem ser classificadas em poliaminas (espermidina e espermina) e aminas biogênicas (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, cadaverina) (GLÓRIA, 2006).

As poliaminas consistem em espermidina e espermina, sendo a putrescina o intermediário obrigatório em sua biossíntese (KALAČ, 2014). Essas aminas são fatores essenciais na proliferação e diferenciação celular (GLÓRIA, 2006; KALAČ, 2014). Desta forma, elas são amplamente encontradas em alimentos de origem vegetal e animal, incluindo leite e derivados. Por serem fatores de crescimento, desempenham papel relevante na síntese de proteínas e, portanto, no crescimento dos microrganismos presentes no queijo (ÖNAL, 2007). Estudos têm demonstrado que as poliaminas podem prevenir danos mediados pelo oxigênio e que tem função antioxidante em células gastrointestinais (THORNTON & OSBORNE, 2012).

As aminas biogênicas são derivadas da descarboxilação de aminoácidos pela ação de enzimas, chamadas aminoácido descarboxilases, que estão presentes em culturas iniciadoras ou contaminantes (ALVAREZ & MORENO-ARRIBAS, 2014). Na Figura 12 estão demonstradas rotas metabólicas para a formação de algumas aminas biogênicas.

As aminas biogênicas são relevantes do ponto de vista sanitário e toxicológico, podendo indicar a qualidade da matéria prima e as condições higiênico-sanitárias prevalentes na produção de alimentos. Algumas aminas, em concentrações elevadas, podem causar efeito adverso à saúde humana. As aminas biogênicas estão envolvidas como agentes causadores em vários casos de intoxicação e também são capazes de iniciar várias reações farmacológicas por suas ações vasoativas ou neuroativas (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2006; EFSA, 2011).

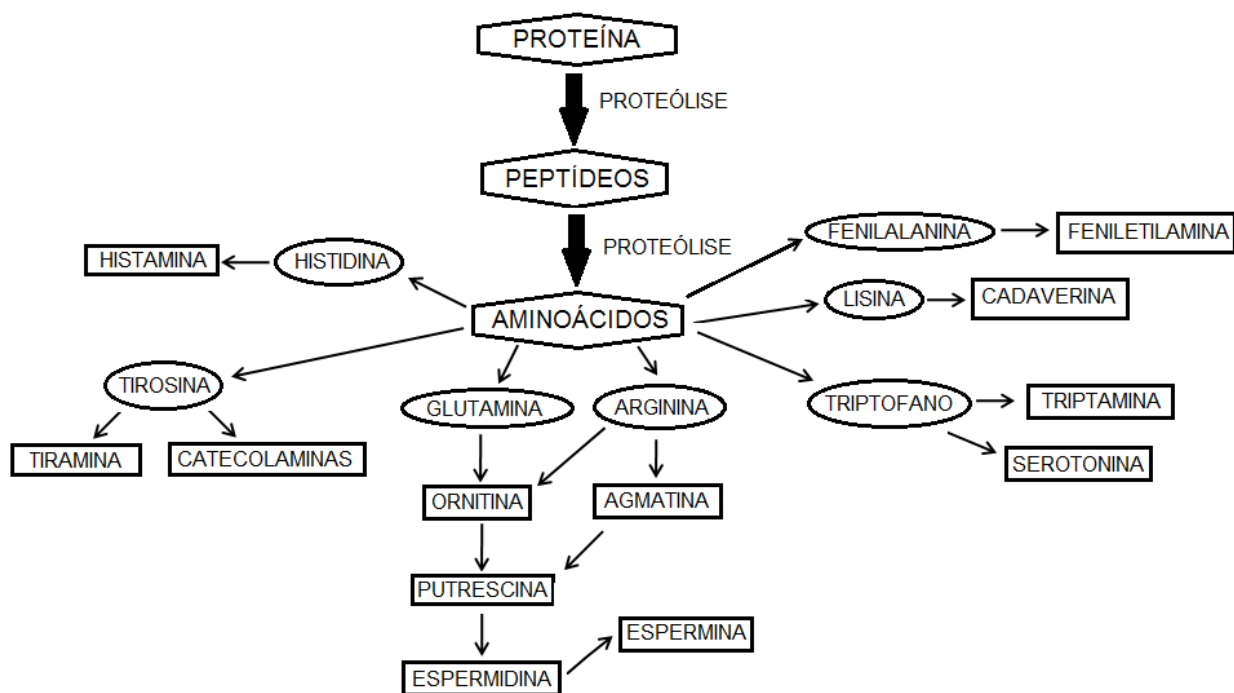


Figura 12. Rotas de síntese de algumas aminas bioativas.

Fonte: adaptado de BENKERROUM (2016), GLÓRIA, (2006) e HALÁSZ et al. (1994).

Os queijos são ambiente ideal para a formação dessas aminas devido à presença de aminoácidos livres, bactérias capazes de promover a descarboxilação destes e outros fatores como pH, concentração salina, atividade de água, temperatura e tempo de estocagem/maturação, densidade bacteriana e a presença do cofator piridoxal fosfato (VALE & GLÓRIA, 1998; ROIG-SAGUÉS et al., 2002; LINARES et al., 2012; LOIZZO et al., 2013). Portanto torna-se fundamental conhecer essas substâncias e estudar cada vez mais sua presença em queijos comercializados no Brasil.

7.1 Formação de aminas bioativas em queijos

Algumas aminas bioativas são constituintes endógenos naturais das células e, conseqüentemente, das matérias primas alimentares. Seus níveis podem variar durante a produção, dependendo da variedade, maturidade e das condições ambientais a que o alimento é exposto. O perfil e o conteúdo de aminas bioativas podem mudar nos alimentos com relação ao seu valor inicial durante o processamento e a estocagem, podendo também ser influenciado pelas condições higiênico-sanitárias prevalentes (HALÁSZ et al., 1994; LOIZZO et al., 2013).

A concentração e os tipos de aminas bioativas presentes em queijos é muito variável e depende de: espécie que produz o leite (vaca, cabra, ovelha ou búfala), tratamentos térmicos aplicados ao leite destinado à fabricação do queijo, cultura lática utilizada, seção

do queijo (centro ou casca), condições de maturação, processamento pós-maturação, tipo de embalagem, tempo e temperatura de estocagem e microbiota responsável pela fabricação (LOIZZO et al., 2013; GUARCELLO et al., 2015) além das condições de higiene e da presença de microrganismos contaminantes (PACHLOVÁ et al., 2012).

Os aminoácidos liberados pela proteólise de queijos são os precursores para formação de aminas biogênicas por enzimas dos microrganismos contaminantes ou adicionados propositalmente como coadjuvantes de produção, durante a maturação ou estocagem (VALE & GLÓRIA, 1998; ROIG-SAGUÉS et al., 2002; CUSTÓDIO et al., 2007; LINARES et al., 2012). Assim, cada variedade de queijo tem seu próprio perfil de aminas biogênicas e aminoácidos livres, resultantes das reações específicas de degradação, interconversão e síntese (POLO et al., 1985).

A formação das aminas biogênicas pode ocorrer durante o processamento ou a estocagem de produtos por ação de inúmeras espécies de microrganismos capazes de produzir enzimas descarboxilantes. Dentre os microrganismos encontrados em queijos, os formadores de tiramina são, na maioria, as bactérias Gram positivas (enterococos e algumas bactérias láticas) e os formadores de histamina são principalmente enterobactérias, mas também algumas bactérias láticas e clostrídios (ROIG-SAGUÉS et al., 2002). Enterobactérias são formadoras de cadaverina, pela habilidade de descarboxilar a lisina. Desta forma, já foi relatada a formação de aminas por bactérias das famílias *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Hafnia alvei* ao lado de espécies de *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Clostridium sporogenes*, *C. perfringens*, *Lactobacillus* (como *L. buchneri* e *L. delbrueckii*), *Leuconostoc* e *Lactococcus*, das quais especial atenção deve ser dada àquelas utilizadas como culturas *starter* (ÖNER et al., 2006; ÖNAL, 2007; LINARES et al., 2012; LOIZZO et al., 2013). *L. bulgaricus*, *L. casei* e *L. acidophilus* podem favorecer a formação de histamina (STRATTON et al., 1991) enquanto *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus casei* possuem a capacidade de produzir tiramina (VOIGT et al., 1974).

7.2 Toxicidade de aminas bioativas

Atualmente a demanda por alimentos saudáveis está aumentando, pois cresceu a conscientização e o conhecimento da população sobre os conceitos de qualidade e segurança de alimentos. Dessa forma, o estudo sobre componentes alimentares que causam riscos à saúde humana tem sido promovido e limites de tolerância são estabelecidos em diversos países (GOMES et al., 2014). Quando se trata de aminas

biogênicas, no Brasil apenas pescados produtores de aminas (como as espécies das Famílias Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryphaenidae, Scomberesocidae e Pomatomidae) possuem limite máximo estabelecido, sendo 100 mg/kg para histamina na média amostral, não devendo ultrapassar 200 mg/kg por amostra individual (BRASIL, 1997d; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2017).

A falta de controle governamental, em especial sobre o comércio varejista, entrepostos e indústrias e a falta de conhecimento a respeito dessa perigosa intoxicação, tanto pela população como pelos agentes de saúde, podem contribuir para que os alimentos que contenham aminas biogênicas constituam um potencial risco à saúde do consumidor (GOMES et al., 2014). O queijo está entre os alimentos mais comumente associados à intoxicação por aminas biogênicas (RENES et al., 2014).

Sob condições normais, as aminas em quantidades habitualmente presentes nos alimentos são rapidamente biotransformadas no organismo por conjugação ou mediante reações enzimáticas de oxidação. Neste contexto, monoamino- e diamino-oxidases desempenham papel importante na degradação de aminas no corpo humano (HALÁSZ et al., 1994).

O limite de toxicidade exato para as aminas biogênicas em humanos é de difícil determinação, pois depende da eficiência dos mecanismos de desintoxicação de cada pessoa e da presença de substâncias potencializadoras no próprio alimento (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2006; EFSA, 2011). O nível de 1.000 mg/kg de aminas totais em alimentos é considerado perigoso para a saúde (SILLA SANTOS, 1996) embora este número seja diferente considerando cada amina individualmente, devido a diferenças na toxicidade de cada uma. Nenhum efeito adverso à saúde foi detectado em pessoas que consumiram até 50 mg de histamina ou 600 mg de tiramina por refeição, porém essas quantidades são bem menores para pessoas intolerantes à histamina (neste caso o consumo seguro deve se limitar a níveis abaixo dos detectáveis para essas substâncias) ou que fazem uso de medicamentos inibidores de monoamino-oxidase - IMAO (até 6 mg de tiramina deve ser considerado o consumo máximo por refeição para esses indivíduos) (EFSA, 2011).

As intoxicações alimentares mais frequentes causadas por aminas biogênicas envolvem a histamina. A intoxicação por histamina é conhecida como tal ou por *scombroid fish poisoning* uma vez que este problema está associado ao consumo de peixes da Família Scombridae, como o atum, o bonito, a cavala, dentre outros (Clupeidae). Quantidades maiores que 100 mg de histamina por quilo de alimento são consideradas tóxicas (EFSA, 2011).

Histamina é uma amina bioativa presente em grande quantidade nos mastócitos e basófilos, onde é encontrada em grânulos especiais. Os efeitos desta substância aparecem quando liberada na corrente sanguínea (por reações como a alérgica ou após absorção pela mucosa intestinal quando proveniente de alimentos), onde se liga a receptores nas membranas celulares encontradas no sistema cardiovascular e várias glândulas secretoras. Dessa forma a histamina pode estimular diretamente o coração como resultado do seu efeito na liberação de adrenalina e noradrenalina, excita músculos lisos do útero, intestino, e trato respiratório; estimula neurônios motores e sensoriais e controla a secreção gástrica de ácido. Sendo assim os sintomas de uma reação toxicológica devido à histamina são diversos, incluindo erupção cutânea, urticária, edema, inflamação localizada, náuseas, vômitos, diarreia, cólicas abdominais, hipotensão, dor de cabeça, palpitação. Em casos mais graves, a histamina pode levar a broncoespasmos, asfixia e insuficiência respiratória (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2006; EFSA, 2011).

O sistema de detoxificação da histamina é composto por duas enzimas, diamino-oxidase e histamina-N-metil transferase, que convertem histamina em produtos não tóxicos. O catabolismo da histamina é inibido por administração oral simultânea de outras aminas como putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermina e espermidina, potencializando sua toxicidade (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2006; EFSA, 2011).

A tiramina é o segundo tipo de amina envolvida em intoxicações alimentares. Atua aumentando a pressão sanguínea por aumento da força da contração cardíaca. Em concentrações elevadas, pode causar dor de cabeça, enxaqueca, febre, vômito e aumento da glicemia (GLÓRIA, 2006; EFSA, 2011). O aumento de pressão causado pela tiramina presente em alimentos pode desencadear uma crise hipertensiva. A inibição da degradação da tiramina pelos medicamentos que são inibidores de monoamino-oxidases aumenta o risco da ocorrência de crises hipertensivas (SHALABY, 1996; EFSA, 2011). A intoxicação causada por altos teores de tiramina em queijos normalmente é denominada de *cheese reaction* ou “síndrome do queijo” e níveis entre 100 e 800 mg/kg de alimento tem sido sugeridos como causadores de toxicidade (EFSA, 2011).

Monoamino-oxidases (MAO) são enzimas que catalisam uma reação de deaminação oxidativa, sendo de dois tipos: MAO-A (que age sobre a serotonina e a noradrenalina) e a MAO-B (que age sobre a dopamina e a feniletilamina). Fármacos inibidores de monoamino-oxidases (IMAO) são utilizados para melhoria de sintomas depressivos e podem ser reversíveis ou irreversíveis, sendo estes últimos mais eficazes. Entre os IMAO

podem ser citados: iproniazida, clorgilina, selegilina e a lazabemida (ANDRADE & FERRAZ, 1997). Indivíduos que estão em tratamento com IMAO precisam evitar alimentos que contenham quantidades consideráveis de aminas biogênicas, principalmente tiramina, triptamina e feniletilamina, pois efeitos adversos graves podem ocorrer (GLÓRIA, 2006; EFSA, 2011).

A triptamina é responsável pela liberação de catecolaminas e da substância vasoconstritora 5-hidroxitriptamina (serotonina) dos terminais nervosos (BAKER et al., 1987). Feniletilamina está relacionada, junto a tiramina e triptamina, em casos de enxaqueca (GLÓRIA, 2006).

As aminas putrescina, espermidina e espermina são protonadas em pH fisiológico, o que faz com que possam reagir com inúmeras moléculas carregadas negativamente, como ácidos nucléicos, proteínas e sítios aniônicos de membranas (KALAČ, 2014). Devido à diversidade funcional das poliaminas no metabolismo e crescimento celular, estas substâncias são requeridas em grandes quantidades nos tecidos em rápido crescimento (KALAČ, 2014) e, portanto, há a possibilidade de que essas substâncias tenham papel importante no crescimento de tumores (BAKER et al., 1987), devendo, portanto, ser evitadas por indivíduos portadores de neoplasias.

Na presença de calor, as aminas putrescina e cadaverina podem ser convertidas a pirrolidina e piperidina, respectivamente, que, na presença de nitrito, formam nitrosaminas carcinogênicas. Sendo o nitrito um constituinte normal da saliva humana, tem sido sugerido que nitrosaminas podem ser formadas no trato gastrointestinal (BAKER et al., 1987).

7.3 Presença de aminas bioativas em queijos

Muitos estudos têm sido conduzidos para determinar o conteúdo de aminas em queijos (Tabela 8), indicando a presença, principalmente, de histamina, tiramina, triptamina, putrescina, cadaverina e feniletilamina (VALE & GLÓRIA, 1998; ÖNER et al., 2006; ANDIÇ et al., 2011; BRITO et al., 2014). Foram encontradas também com menor frequência e em menores quantidades, espermidina, espermina, agmatina e serotonina (VALE & GLÓRIA, 1998). Geralmente, o conteúdo de aminas no leite é baixo, sendo espermina, putrescina, espermidina e agmatina as mais prevalentes, mas em baixas concentrações (SANTOS et al., 2003; GLÓRIA, 2006). No queijo, espermina e espermidina estão presentes em baixos teores e as demais aminas biogênicas são encontradas em teores variados dependendo da variedade de queijo e das condições do processamento e da estocagem.

Conforme indicado na Tabela 8, os teores e tipos de aminas encontrados variam com a variedade de queijo e também entre amostras de uma mesma variedade. Tanto os queijos brasileiros como os de outros países tem sido alvo de pesquisas sobre seus teores de aminas e os fatores que afetam a sua presença. Queijos não maturados ou com curto tempo de maturação, como Minas e Prato apresentaram baixos teores de aminas biogênicas. Em queijos de longa maturação, aminas como a histamina e a tiramina foram encontradas em teores elevados, capazes de causar efeitos tóxicos, principalmente em pacientes em tratamento com medicamentos inibidores da MAO.

Vale e Glória (1998) avaliaram 92 amostras de 10 variedades de queijos produzidos no Brasil com relação ao teor de aminas bioativas. Espermina foi a amina mais encontrada nos queijos pesquisados (93%), porém em baixa quantidade (menor que 2,6 mg/100 g de queijo). Histamina foi encontrada em níveis capazes de provocar reação toxicológica em 11% dos queijos Gouda e 8% dos queijos Mussarela. A 2-feniletilamina apresentou alta prevalência, porém em níveis abaixo do mínimo para reações toxicológicas. Os maiores teores totais de aminas biogênicas foram encontrados nos queijos Provolone, Gouda e ralado.

A correlação positiva encontrada por Vale e Glória (1998) entre algumas aminas sugere que sua formação é influenciada pelos mesmos mecanismos e condições. Índices de qualidade também foram avaliados e os resultados sugeriram que a formação de aminas foi influenciada pela acidez em diversos tipos de queijos.

Os fatores que interferem na formação de aminas bioativas durante a maturação de queijos têm sido estudados com o intuito de tentar reduzir os teores das aminas. O efeito do tratamento térmico do leite no acúmulo de aminas biogênicas em diferentes queijos foi descrito por Novella-Rodríguez et al. (2004). Estes autores observaram que o queijo obtido com leite pasteurizado apresentou menor formação de aminas biogênicas durante a maturação, devido à redução da contagem microbiana, comparado ao queijo obtido com leite cru. Gaya et al. (2005) observaram a formação de aminas biogênicas apenas no queijo obtido com leite cru e o teor de aminoácidos livres foi superior neste queijo. Martuscelli et al. (2005) não observaram diferença nos teores totais de aminas em queijos obtidos com leite cru e pasteurizado, no entanto o teor de histamina foi significativamente superior no queijo obtido com leite cru. A higiene na obtenção do leite para produção de queijos é fundamental, uma vez que as aminas são termoresistentes, permanecendo no leite mesmo após tratamento térmico (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Tabela 8. Teores de aminas bioativas encontradas em diversos queijos

Queijos	Teores (mg/100 g)										Ref.
	HIM	TIM	TRM	FEM	SRT	PUT	CAD	EPM	EPD	AGM	
Minas	nd-2,50	nd	nd -0,72	nd -0,64	nd -0,31	nd-2,64	nd-0,30	0,07-2,58	nd-2,10	nd-0,04	[1]
Gorgonzola	0,45-2,99	nd-1,07	nd-2,80	0,07-1,03	nd-1,81	0,17-0,80	nd-0,65	0,07-0,55	0,13-3,23	nd-1,79	[1]
Prato	nd-6,15	nd-1,75	nd-0,90	nd-1,19	nd-0,57	nd-3,53	nd-3,39	0,07-0,90	nd-2,69	nd-0,35	[1]
Tilsit	nd-4,82	nd-0,64	nd-0,48	0,07-1,03	nd-0,52	nd-3,39	0,07-1,83	0,07-2,55	0,07-1,08	nd-0,08	[1]
Gouda	nd-19,65	nd-2,47	nd-4,09	nd-1,92	nd-3,04	nd-17,37	nd-3,51	nd-1,13	nd-1,35	nd-1,34	[1]
Mussarela	nd-11,33	nd-1,56	nd-0,35	nd-0,26	nd-0,47	nd-1,37	nd-2,34	0,07-1,31	nd-1,06	nd-0,13	[1]
	-	-	-	<7,70	-	nd	<51,40	3,4±0,1	nd	-	[2]
Provolone	nd-6,04	nd-0,44	nd-1,08	nd-1,40	nd-1,40	nd-8,17	nd-111,0	0,07-0,97	nd-2,38	nd-0,18	[1]
Parmesão	nd-0,87	nd-1,00	nd	nd-0,04	nd-0,23	nd-1,36	nd-0,25	0,07-0,09	nd-0,15	nd	[1]
Parmesão ralado	0,11-8,69	0,12-5,20	nd-0,34	nd-1,98	nd-1,96	0,08-6,30	0,07-13,42	0,07-0,80	nd-1,23	nd-1,41	[1]
Queijo ralado	0,13-8,80	nd-21,25	nd	nd-1,71	nd-1,27	0,32-2,76	0,30-4,17	0,07-0,08	nd-0,36	nd-0,07	[1]
Queijo Iraniano*	nd-244,29	nd-20,23	-	-	-	nd-67,30	8,86-82,09	-	-	-	[3]
Otlu Peynir	nd-68,15	1,8-112,55	nd-17,26	nd-10,00	-	nd-84,70	nd-184,45	-	-	-	[4]
Parmesão maturado	nd-5,77	nd-11,67	-	nd-5,11	-	nd-8,29	nd-3,07	nd-2,69	nd-3,15	nd-0,48	[5]
Kashar	nd-0,45	0-4,79	7,97-14,44	nd	-	0,01-17,43	nd-0,13	-	-	-	[6]
Toma Piemontese	nd-6,7	3,1-17,8	nd	nd	-	-	-	-	-	-	[7]
Queijo Tcheco maturado	nd	6,38-10,14	-	-	-	4,88-7,01	1,18-7,26	1,15-9,79	-	-	[8]
Cheddar maturado **	4,44±1,86	6,22±2,77	0,027±0,0	0,68±0,19	-	0,14±0,072	0,41±0,2	nd	nd	-	[9]

Legenda: HIM/Histamina, TIM/Tiramina, FEM/2-Feniletilamina, TRM/Triptamina, SRT/Serotonina, CAD/Cadaverina, PUT/Putrescina, AGM/Agmatina, EPM/Espermina, EPD/Espermidina. nd: não detectado. - : não determinado.

* os valores encontrados para este queijo estão em mg/kg de massa seca, e não por 100 g de queijo como para as outras referências.

** valores médios seguidos do desvio padrão. A tiramina é a *p*-tiramina.

FONTES: [1] VALE e GLÓRIA (1998); [2] AVELAR et al. (2005); [3] ALIAKBARLU et al. (2011); [4] ANDIÇ et al. (2010); [5] SPIZZIRRI et al. (2013); [6] ANDIÇ et al. (2011); [7] ARLORIO et al. (2003); [8] BUŇKOVÁ et al. (2013); [9] BAKER et al. (1987).

Em estudo realizado com leite adicionado de cultura láctica em temperaturas de incubação de 20 e 32 °C durante 24 horas, comprovou-se que os teores das aminas cadaverina, espermidina, tiramina e histamina aumentavam com o tempo e temperatura de incubação. Estes resultados sugerem que, para evitar a formação ou minimizar os teores de aminas formados, deve-se manter a temperatura no menor valor possível (SANTOS et al., 2003). Neste mesmo trabalho, os autores observaram que as culturas iniciadoras são capazes de afetar os tipos e os teores de aminas. Desta forma, estas devem ser selecionadas quanto à produção de aminas. A importância da temperatura de armazenamento do queijo também foi investigada por Pinho et al. (2001), que observaram maior formação de aminas biogênicas e aminoácidos livres nos queijos armazenados a temperatura ambiente (25 °C) comparados aos armazenados a 4 °C.

Aliakbarlu et al. (2011) avaliaram diferentes condições de salga e maturação em queijos brancos iranianos na produção das aminas histamina, putrescina, cadaverina e tiramina. A maior quantidade total encontrada foi de 267,55 mg/kg em queijos salgados em salmoura a 13% de cloreto de sódio (NaCl), com 25 dias de maturação a 14 °C, sendo a histamina encontrada em maior quantidade (244,29 mg/kg). Individualmente, putrescina foi encontrada em seu maior teor (67,30 mg/kg) nos queijos salgados em salmoura a 16% de NaCl, com 75 dias de maturação a 9 °C. Porém, não foi detectada quando a salmoura passou para 13% de NaCl aos 50 dias de maturação. Cadaverina foi a amina mais frequente tendo sido detectada em todos os 16 queijos analisados e seu maior valor (82,09 mg/kg) foi encontrado aos 25 dias de maturação, tendo sido utilizada salmoura a 10% de NaCl na salga e temperatura de 9 °C para estocagem dos queijos. A tiramina foi encontrada em apenas seis queijos (de um total de doze) e em baixos teores (média de 7,73 mg/kg).

O queijo Gouda chileno apresentou concentração total de aminas biogênicas entre 47,9 e 150 mg/kg, sendo que estes não causam riscos ao consumo humano (BRITO et al., 2014). Os autores demonstraram que o teor de aminas biogênicas nos queijos aumentou com o aumento de atividade de água, da concentração de aminoácidos livres e também da contagem de enterobactérias nos queijos.

Em estudo realizado com o queijo turco Otlu Peynir (*Herby cheese*), aminas biogênicas foram detectadas em quantidades maiores que 1000 mg/kg em 10 das 30 amostras analisadas. Uma grande variação no teor de aminas biogênicas foi encontrada nos queijos, o que foi correlacionado a diferenças na intensidade do processo de maturação (ANDIÇ et al., 2010). Outro queijo turco, o Kashar, também foi pesquisado quanto ao seu perfil de aminas biogênicas. Putrescina, triptamina e tiramina foram as

principais amins encontradas neste queijo. O período de estocagem teve efeito significativo para todas as amins pesquisadas com exceção da cadaverina para queijo em embalagem sem vácuo. Baixas temperaturas de estocagem (4 °C) e embalagem à vácuo no queijo Kashar limitaram a formação de feniletilamina, cadaverina e histamina (ANDIÇ et al., 2011).

Estes estudos demonstraram que é possível controlar a formação de amins biogênicas, principalmente tiramina e histamina, com boas práticas de fabricação, utilizando matéria-prima de boa qualidade, realizando o tratamento térmico do leite, utilizando culturas iniciadoras selecionadas (não produtoras ou com baixa produção de amins biogênicas) e controle do tempo e temperatura durante a maturação e armazenamento (PINHO et al., 2001; SANTOS et al., 2003; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2004; GAYA et al., 2005; MARTUSCELLI et al., 2005; ALIAKBARLU et al., 2011; ANDIÇ et al., 2011).

7.4 Determinação de amins em queijos

Os estudos de ocorrência de amins bioativas, bem como os de controle de sua formação em alimentos não seriam possíveis sem o suporte dos métodos analíticos. Os métodos mais utilizados para determinação de amins em queijos são métodos cromatográficos. Praticamente todas as técnicas envolvem três etapas: extração, purificação e determinação analítica (LOIZZO et al., 2013). A extração das amins em queijos por diversos solventes foi estudada por Custódio et al. (2007), que avaliaram a eficiência dos ácidos clorídrico, tricloroacético, perclórico, sulfosalicílico e acético, além de tampão borato, metanol e etanol na extração de amins em queijo Parmesão ralado, tendo sido o ácido clorídrico o preferido pelos autores por apresentar uma boa recuperação e também vantagens analíticas.

A separação das amins é normalmente realizada por cromatografia líquida de fase reversa – HPLC e UHPLC. A grande maioria dos métodos empregam detectores fluorimétricos com derivação pré ou pós-coluna. Os agentes de derivação mais utilizados são *o*-ftalaldeído, cloreto de dansila, cloreto de dabsila, 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimida (AQC), entre outros (ÖNAL et al., 2013).

Outros métodos podem ser utilizados em que as amins biogênicas são indiretamente detectadas pela presença de microrganismos capazes de produzir essas substâncias na amostra. Para detecção desses microrganismos é feita uma caracterização dos genes que codificam a produção da enzima aminoacil-descarboxilase

por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) nas estirpes presentes no alimento. Existe uma alta correlação entre a presença do gene produtor da enzima citada e a produção de aminas biogênicas. Essa estratégia tem sido utilizada com sucesso em queijos e tem a vantagem de prever o potencial de produção de aminas biogênicas, antes mesmo que elas sejam detectadas no produto (LOIZZO et al., 2013).

8. Métodos analíticos para a determinação simultânea de aminoácidos livres e aminas bioativas

Aminoácidos são precursores da formação de aminas, dessa forma, métodos analíticos que analisem as duas classes de compostos são interessantes por proverem informação sobre a qualidade nutricional e higiênica dos produtos, além de possibilitar o monitoramento de processos-chave para a sua formação, como por exemplo a maturação de queijos (FIECHTER et al., 2013).

Aminoácidos livres e aminas bioativas são difíceis de analisar simultaneamente devido à diversidade estrutural (esqueletos alifáticos, aromáticos e heterocíclicos, presença de grupos com diferentes valores de pK). Para a determinação simultânea dessas duas classes de compostos, alguns problemas podem ocorrer, com relação à separação adequada e tempo de retenção, principalmente em análise de alimentos e matrizes biológicas complexas (HE et al., 2016).

Atualmente a grande maioria das determinações de aminas e aminoácidos é feita por cromatografia líquida de fase reversa, seja por HPLC convencional ou mais recentemente UHPLC (em que as colunas são empacotadas com partículas menores que 2 μm), que aumentam a eficiência da separação cromatográfica por ser mais seletivo, ter melhor resolução de picos e ser mais rápido que os cromatógrafos tradicionais (FIECHTER et al., 2013; SENTELLAS et al., 2016). Outros métodos como a eletroforese capilar também têm sido aplicados para separação destes compostos (ADIMCILAR et al., 2017). A eletroforese capilar é simples, rápida e confiável, porém usualmente apresenta baixa detectabilidade quando comparada com outros métodos (PAPAGEORGIU et al., 2018)

A heterogeneidade química complica a separação e é um desafio para a escolha de um detector adequado (MAZZUCCO et al., 2010; TUBEROSO et al., 2015). Os detectores mais utilizados são os fluorimétrico, UV, e arranjo de diodos – PDA (REDRUELLO et al., 2013; HU et al., 2014; SIROCCHI et al., 2014). O uso do espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo líquido está cada vez sendo mais utilizado por eliminar a etapa de derivação química, necessária quando se usa os

detectores fluorimétrico e UV, para adição de grupos cromóforos aos compostos, porém efeito matriz tem sido observado (GOSETTI et al., 2007; SIROCCHI et al., 2014). Outras opções têm sido testadas como um detector de condutividade sem contato capacitivamente acoplado (C⁴D) para eletroforese capilar, utilizado para determinação de aminas biogênicas em produtos lácteos (ADIMCILAR et al., 2017) e o detector evaporativo de espalhamento de luz – ELS acoplado a HPLC para análise de aminas em queijos (RESTUCCIA et al., 2011).

Previamente à separação cromatográfica, é necessária a extração das aminas e aminoácidos da matriz alimentar de origem, pré-concentração e derivação (PAPAGEORGIOU et al., 2018). Para amostras complexas como produtos fermentados, onde a coexistência de aminas e aminoácidos pode ser prevista, espera-se que ambos sejam retirados juntos na etapa de extração e a derivação ocorra de forma simultânea para as duas classes de compostos aminados, dependendo do agente derivante empregado nesta etapa (FIECHTER et al., 2013).

A derivação química minimiza os problemas relacionados às diferenças químicas dos compostos e escolha de detectores adequados, pois a adição de um grupo funcional às moléculas-alvo pode tornar o método mais sensível e seletivo, diminuindo a interferência endógena (HE et al., 2016). Os reagentes de derivação mais comuns para essa aplicação são: dietil etoximetileno malonato (DEEMM), cloreto de dansila, fenil-isotiocianato (PITC), 6-aminoquinolil-N-hidroxi succinimidil carbamato (AQC), o-ftalaldeído-etanotiol (OPA-ET), 9-fluorenilmethil cloroformato (FMOc) e 4-carbonil cloreto rodamina (CCR) (ALONSO et al., 1994; KORÖS et al., 2008; KABELOVÁ et al., 2009; MAZZUCCO et al., 2010; FIECHTER et al., 2013; REDRUELLO et al., 2013; HE et al., 2016; POVEDA et al., 2016). Algumas técnicas utilizadas na determinação de aminoácidos e aminas estão descritas na Tabela 9.

O agente derivante AQC possui a vantagem de reagir com aminas primárias e secundárias em uma única etapa, além de originar compostos derivados estáveis altamente fluorescentes por vários dias. O excesso de reagente se hidrolisa rapidamente e o produto secundário da reação é fácil de ser identificado por possuir tempo de retenção distinto dos analitos derivados (COHEN, 2001; GRUMBACH et al., 2006). A Figura 13 mostra a reação de derivação de grupos amino pelo AQC.

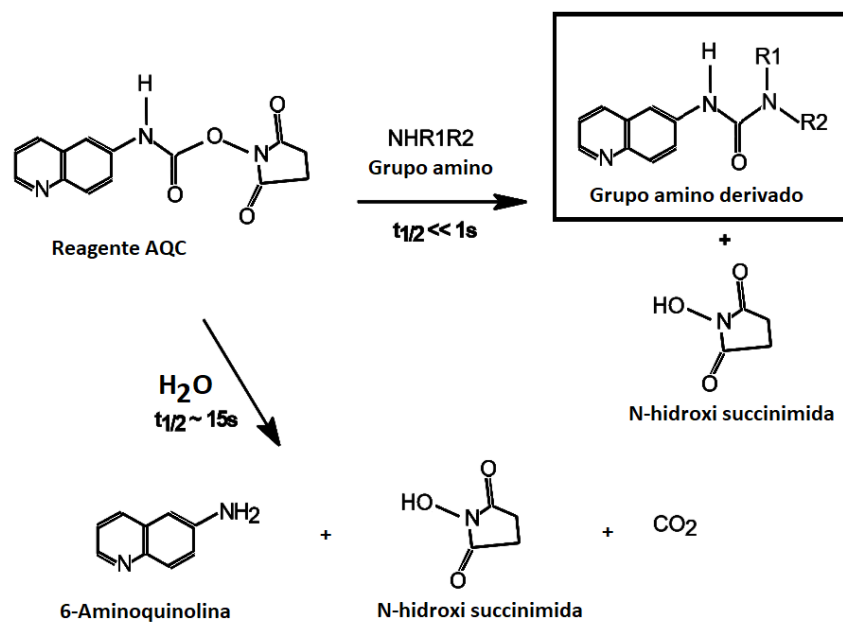


Figura 13. Reação de derivação de grupos amino por 6-aminoquinolil-N-hidroxi succinimidil carbamato (AQC).

Fonte: adaptado de GRUMBACH et al. (2006).

Tabela 9. Resumo de algumas técnicas cromatográficas utilizadas para determinação de aminoácidos livres (AA) e aminas bioativas (AB) em queijos

Amostras	Unidade de medida/analitos	Padrão interno	Preparo da amostra	Derivação	Parâmetros cromatográficos	Detector	Ref
Queijo regional (Espanha) feito a partir de leite de cabra pasteurizado. n=8.	mg/kg em extrato seco. 21 AA 6 AB	Ácido L-2-aminoadípico.	Solução NSpH 4,6, adicionada de padrão interno foi centrifugada em Centriprep Centrifugal Filter Units com <i>cut-off</i> de 3.000 Da (Milipore®).	Pré-coluna com dietil etoximetilenemalonato (DEEMM) em tampão borato pH 9,0 e metanol.	HPLC. Coluna C18 com 5 µm de tamanho de partícula (250 mm x 4,6 mm). Fases móveis: A) tampão acetato 25 mM pH 5,8 com 0,02% de azida sódica; B) mistura 80:20 ACN/metOH. Tempo de corrida 80 minutos.	Arranjo de diodos (PDA) a 280 nm para todos os componentes a exceção do íon amônio, 269 nm.	[1]
Queijos de massa ácida e cozida (Áustria). n=15.	mg/100 g 23 AA 15 AB	L-norvalina	Extração com ácido perclórico 0,6 M (Ultra-Turrax, shaker e centrifugação, 3 extrações). Neutralização NaOH 0,55M.	Pré-coluna com kit comercial Waters AccQ.Fluor® (reagente AQC em tampão borato)	UHPLC. Coluna C18 com 1,7 µm de tamanho de partícula (50 mm x 2,1 mm). Fases móveis: A) tampão acetato 0,1M pH 4,8; B) ACN. Tempo de corrida 12 minutos.	Ultravioleta ajustável (UV) a 249 nm.	[2]
Queijos não especificados (China). n=6.	mg/kg 8 AA 9 AB	1,7 diamino heptano	Homogeneização da amostra em banho ultrassom, acidificação com HCl 0,1 M, centrifugação.	<i>"in situ derivatization ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction"</i> (in situ DUADLLME) com CCR	UHPLC Coluna C18 com 1,8 µm de tamanho de partícula (50 mm x 2,1 mm). Fases móveis: A) ácido fórmico 0,1% em 5% ACN/água; B) ácido fórmico 0,1% em ACN. Tempo de corrida 10 minutos.	Sistema triplo quadrupolo MS/MS	[3]
Toma Piemontese e Pecorino Sardo (Itália)	mg/kg 4 AA 4 AB	-	Extração com HCl 0,1 M (shaker e centrifugação, 1 extração).	Pré-coluna, com cloreto de dansila. Após reação e centrifugação, limpeza em cartucho de extração de fase sólida (SPE)	HPLC Coluna C18e com 5 µm de tamanho de partícula (250 mm x 4 mm). Fases móveis: A) ACN; B) formiato de amônio 9 mM pH 3,4. Tempo de corrida 36 minutos.	Arranjo de diodos (PDA) a 254 nm	[4]

Tabela 9. Continua

Amostras	Unidade de medida/analitos	Padrão interno	Preparo da amostra	Derivação	Parâmetros cromatográficos	Detector	Ref
Queijos variados (República Tcheca). n=25.	g/kg 16 AA	ácido α -aminobutírico	Desproteíntização com HCl, Ultra-Turrax, banho ultrassom, centrífuga. Adição de TCA, banho de gelo e centrífuga.	Pré-coluna com kit comercial Waters AccQ.Fluor® (reagente AQC em tampão borato)	HPLC Coluna C18e com 4 μ m de tamanho de partícula (150 mm x 3,9 mm). Fases móveis: A) Waters AccQ Tag Eluent A®, B) ACN, C) água. Tempo de corrida 53 minutos.	Detector de fluorescência multi λ (λ_{ex} 250 nm e λ_{em} 395 nm)	[5]
Emmental, Gouda, Manchego, Burgos, Cabrales, Cheddar (Espanha)	mg/kg 22 AA 7 AB	Ácido L-2-aminoadípico.	Extração em HCl 0,1 M + 0,2% TDPA (Ultra Turrax, banho de ultrassom, centrífuga). Desproteíntização do sobrenadante por membrana/centrífuga. 2 extrações.	Pré-coluna com dietil etoximetilenalonato (DEEMM) em tampão borato pH 9,0 e metanol.	UHPLC Coluna C18 com 1,7 μ m de tamanho de partícula (100 mm x 2,1 mm). Fases móveis: A) tampão acetato 25 mM pH6,7+0,02%azida sódica; B) metOH, C) ACN. Tempo de corrida 10 minutos.	Arranjo de diodos (PDA) a 280 nm	[6]
Queijos Prato artesanais (Brasil). n=12.	mg/100 g extrato seco 22 AA	-	Extração com ácido perclórico (homogeneização, centrífuga, filtração). Ajuste do pH para 6,0 com KOH, banho de gelo, filtração. Concentração por evaporação à vácuo, ressuspensão em NaHCO ₃ pH 8,5, filtração.	Pré-coluna com PITC. Extrato evaporado até a secagem antes da adição da solução derivante; excesso evaporado em seguida.	HPLC Coluna C18 com 5 μ m de tamanho de partícula (250 mm x 4,6 mm). Fases móveis: A) acetato de sódio.3H ₂ O, trietanolamina, ACN e ácido acético glacial até pH 6,4; B) mistura 60:40 ACN/água. Tempo de corrida 20,5 minutos.	Arranjo de diodos (PDA) a 254 nm	[7]
Queijos azul, defumado e Port Salut (Hungria)	g/100 g 21 AA 9 AB	-	Desproteíntização com ácido perclórico 1 M, seguido de centrifugação e filtração.	Pré-coluna em duas etapas; primeiro com OPA/ET e em seguida com FMOC.	HPLC Coluna Hypersil com 5 μ m de tamanho de partícula (250 mm x 4,6 mm). Fases móveis: A) ACN/acetato de sódio 0,36M/água 10/5/85%; B) metOH/acetato de sódio 0,36M/água 55/8/37%; C) ACN/acetato de sódio 0,36M/água 55/5/40%; D) ACN. Tempo de corrida 62 minutos.	Arranjo de diodos (PDA a 334/262 nm) combinado com detector de fluorescência (λ_{ex} 337 nm e λ_{em} 454 nm)	[8]

Fontes: [1] POVEDA et al. (2016); [2] FIECHTER et al. (2013); [3] HE et al. (2016); [4] MAZZUCCO et al. (2010); [5] KABELOVÁ et al. (2009); [6] REDRUELLO et al. (2013); [7] GOROSTIZA et al. (2004); [8] KŐRÖS et al. (2008).

CAPÍTULO I

PARÂMETROS DE DESEMPENHO EM MÉTODO UHPLC-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES E AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS MUSSARELA, PRATO, PARMESÃO E GORGONZOLA *

* Capítulo publicado em MOREIRA, G.M.M.; SOBRAL, D.; COSTA, R.G.B.; PAULA, J.C.J.; FERNANDES, C.; GLÓRIA, M.B.A. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 72, n. 4, p. 192–204, 2017 (ANEXO II).

1. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo determinar parâmetros de desempenho (linearidade, sensibilidade, faixa de trabalho, seletividade, efeito matriz, precisão, recuperação, limites de detecção e quantificação) para um método de cromatografia líquida de ultra eficiência para determinação simultânea de 19 aminoácidos livres, 10 aminas bioativas e do íon amônio, em quatro variedades de queijos produzidos no Brasil: Mussarela, Prato, Parmesão e Gorgonzola.

2. Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nas análises cromatográficas eram de grau analítico, exceto a acetonitrila, que era de grau cromatográfico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida de Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana de 0,22 µm de tamanho do poro e 47 mm de diâmetro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões de aminas bioativas e aminoácidos utilizados foram: alanina (98%), monohidrocloreto de arginina (98%), ácido aspártico (98%), ácido glutâmico (99%), cistina cristalina (98%), fenilalanina (98%), glicina (99%), monohidrocloreto de histidina monohidratado (98%), isoleucina (98%), monohidrocloreto de lisina (98%), leucina (98%), metionina (98%), prolina (99%), serina (99%), tirosina (98%), treonina (98%), valina (98%), cloridrato de beta-feniletilamina (98%), serotonina creatinina sulfato mono hidratado (100%), cloridrato de tiramina (98%), dicloridrato de cadaverina (98%), dicloridrato de histamina (99%),

dicloridrato de putrescina (98%), sulfato de agmatina (97%), tetracloridrato de espermina (100%), tricloridrato de espermidina (98%) e triptamina (98%), glutamina (99%), asparagina (98%), norvalina (99%), todos adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Cloreto de amônio (100%) foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil). A derivação foi feita utilizando kit Waters AccQ.Fluor[®] contendo tampão borato e o derivante 6-aminoquinolil-N-hidroxi succinimidil carbamato (AQC).

2.1.2 Queijos

Os queijos Mussarela, Prato, Parmesão e Gorgonzola foram produzidos em três repetições no Núcleo Industrial da EPAMIG – Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora, MG, conforme metodologia descrita em Dutra e Munck (2002).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparo de amostras e derivação

A extração das aminas e aminoácidos das amostras de queijos ocorreu conforme descrito em Custódio et al. (2007), usando ácido clorídrico 1 mol/L como reagente extrator, seguido de agitação em agitador orbital Tecnal[®] modelo TE-140 (250 rpm por 10 minutos), centrifugação (11.180 ×g por 21 minutos a 4 °C) e filtragem em papel de filtro qualitativo. Foram realizadas três extrações sucessivas vertendo no mesmo balão volumétrico, sendo adicionado o padrão interno L-norvalina para concentração final *in column* de 25 pmol antes de se completar o volume do balão.

A derivação das aminas e aminoácidos nos extratos ocorreu segundo metodologia descrita em Fiechter et al. (2013). Após neutralização dos extratos com hidróxido de sódio 1 mol/L e centrifugação (16.000 ×g, por 10 minutos a 4 °C), as aminas e aminoácidos foram derivados (derivação pré-coluna) por reação com 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) utilizando o kit Waters AccQ.Fluor[®]. A 5 µL de extrato neutralizado foram adicionados 35 µL de tampão borato AccQ.Fluor[®] e 10 µL de reagente AQC. Após 1 minuto de descanso, o extrato foi aquecido a 55 °C por 10 minutos em banho-maria para completar a reação de derivação. As amostras derivadas foram filtradas em filtros de seringa com 0,22 µm de poro (Whatman[®], GE Healthcare, Reino Unido) para vial *Total Recovery*[®] Waters e analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência.

2.2.2 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica das aminas e aminoácidos derivados foi realizada conforme descrito em Fiechter et al. (2013). Foi utilizado cromatógrafo líquido de ultra eficiência Waters Acquity® Ultra Performance LC (UPLC®) equipado com um detector Acquity® ultravioleta ajustável (UV) (Waters, Milford, MA, EUA). Para a separação utilizou-se coluna de fase reversa Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm). A fase móvel foi constituída de: A) tampão acetato de sódio 0,1 mol/L em água ultrapura com pH ajustado para 4,8 com ácido acético p.a. e B) acetonitrila de grau cromatográfico, ambos filtrados à vácuo em membrana com poro de 0,22 µm (GV Durapore Merck®) e sonicados por 30 minutos. Foi empregado modo de eluição gradiente, conforme apresentado na Tabela I.1. O volume de injeção de amostra foi 2 µL, a vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e o comprimento de onda de detecção foi 249 nm a uma taxa de amostragem de 40 pontos/segundo. O software Waters Empower 2 foi utilizado para controle do UHPLC e aquisição dos dados. A identificação das aminas e aminoácidos foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos dos analitos na amostra em relação aos da solução padrão e também pela adição da substância suspeita à amostra. O cálculo da concentração das aminas e aminoácidos foi feito por interpolação nas respectivas curvas analíticas ($R^2 \geq 0,971$).

Tabela I.1. Gradiente de concentração das soluções de fases móveis empregadas na separação das aminas bioativas e aminoácidos livres nos extratos de queijo

Tempo (minutos)	% A (tampão acetato pH 4,8)	% B (acetonitrila)
inicial	100	0
2,5	100	0
4,0	97	3
9,0	70	30
10,0	70	30
10,5	0	100
11,0	0	100
11,5	100	0

Reequilíbrio às condições iniciais por mais 1,5 min.

Tempo total de corrida: 13 minutos.

Fonte: adaptado de Fiechter et al. (2013).

2.2.3 Desempenho do método

Os experimentos de avaliação do desempenho do método analítico foram conduzidos segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011). Os dados obtidos foram tratados no software estatístico Minitab® versão 14 (State College, PA, EUA).

3. Resultados

3.1 Linearidade, Sensibilidade e Faixa de Trabalho

As quatro variedades de queijos estudadas foram analisadas quanto ao teor de aminoácidos livres e aminas bioativas, no sentido de determinar o queijo com menor concentração de analitos para ser utilizado na determinação da curva padrão na matriz, devido à impossibilidade de se obter uma matriz branca. As análises foram realizadas após 15, 8 e 29 dias de fabricação e 14 dias após perfuração dos queijos Mussarela, Prato, Parmesão e Gorgonzola, respectivamente. O queijo Mussarela foi o que apresentou os menores teores de todos os analitos (menor que 2 pmol *in column*, ponto mínimo da curva de calibração). Dessa forma esta matriz foi escolhida para determinação da curva de calibração em matriz.

Para construção da curva de calibração foram escolhidos seis (6) níveis de concentração (FIECHTER et al., 2013) com concentração final *in column* de 2, 20, 40, 60, 80 e 100 pmol. Norvalina foi usada como padrão interno em concentração constante de 25 pmol *in column*. Considerando a técnica utilizada, as diluições aplicadas e a massa molar de cada analito, os pontos mínimo e máximo da curva em mg analito/100 g queijo estão apresentadas na Tabela I.2. Cada solução foi preparada 3 vezes e injetada 2 vezes aleatoriamente. Os dados obtidos foram tratados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (BRASIL, 2011) sendo que para todos os analitos as equações lineares foram significativas. Os parâmetros das equações das retas de calibração – o intercepto e a inclinação (sensibilidade), bem como o coeficiente de determinação obtido para cada analito, estão também descritos na Tabela I.2.

3.2 Seletividade e efeito matriz

De acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011), a verificação da seletividade do procedimento analítico deve ser realizada por comparação entre a resposta analítica do extrato da matriz, da matriz fortificada e do analito puro em solvente. O método foi seletivo para todos os analitos estudados em todos as quatro variedades de queijo avaliadas, não apresentando deslocamento de pico na matriz em relação ao solvente. Esses resultados foram comprovados por fortificação individual de cada analito em extrato de cada queijo, e um exemplo de cromatograma comparativo entre uma amostra de queijo Parmesão e o *pool* de aminoácidos e aminas em solução está demonstrado na Figura I.1.

Tabela I.2. Mínimo e máximo da faixa de trabalho, intercepto (a) e inclinação (b) da curva analítica e coeficiente de determinação (R^2) para cada analito calculado em extrato de matriz fortificada

Analitos	Faixa trabalho (mg/100 g)		Curva analítica		
	mínimo	máximo	a	b	R^2
Íon Amônio	0,3	17,0	0,134	0,023	0,992
Aminoácidos					
Ácido Aspártico	2,7	133,1	0,072	0,025	0,997
Ácido Glutâmico	2,9	147,1	0,044	0,036	0,998
Alanina	1,8	89,1	0,079	0,034	1,000
Arginina	3,5	174,2	0,057	0,035	0,998
Asparagina	2,6	132,1	-0,058	0,034	0,996
Cistina	4,8	240,3	0,007	0,065	0,998
Fenilalanina	3,3	165,2	0,071	0,043	0,992
Glicina	1,5	75,1	0,096	0,019	0,999
Glutamina	2,9	146,1	0,285	0,043	0,984
Histidina	3,1	155,2	0,024	0,037	0,996
Isoleucina	2,6	131,2	0,027	0,040	1,000
Leucina	2,6	131,2	0,091	0,048	0,995
Lisina	2,9	146,2	0,203	0,057	0,996
Metionina	3,0	149,2	0,018	0,039	0,999
Prolina	2,3	115,1	0,007	0,038	0,999
Serina	2,1	105,1	0,005	0,030	1,000
Tirosina	3,6	181,2	0,030	0,038	0,993
Treonina	2,4	119,1	0,039	0,034	1,000
Valina	2,3	117,2	0,082	0,034	1,000
Aminas					
Agmatina	2,6	130,2	-0,007	0,035	1,000
Cadaverina	2,0	102,2	0,021	0,063	0,993
Espermidina	2,9	145,2	-0,039	0,065	0,971
Espermina	4,0	202,3	-0,066	0,056	0,998
Feniletilamina	2,4	121,2	0,002	0,040	0,996
Histamina	2,2	111,2	-0,003	0,030	0,999
Putrescina	1,8	88,2	0,013	0,067	0,997
Serotonina	3,5	176,2	-0,014	0,036	0,993
Tiramina	2,7	137,2	0,046	0,041	0,996
Triptamina	3,2	160,2	-0,031	0,049	0,997

Apesar de seletivo, o método apresentou efeito matriz por alteração de intensidade de resposta analítica quando quantificado em extrato de queijo em comparação ao *pool* em solvente. Foram elaboradas amostras com 3 níveis de fortificação em extrato de cada queijo e em solvente, em 6 repetições. Para o queijo Gorgonzola, a glicina e a prolina foram os únicos analitos entre os 30 analisados que não apresentaram efeito matriz em

todos os níveis de fortificação avaliados, enquanto todos os outros apresentaram efeito matriz em pelo menos um nível. Não apresentaram efeito matriz em nenhum nível para a Mussarela: histidina, treonina, isoleucina e tiramina; para o queijo Prato: treonina, isoleucina, triptamina e para o Parmesão: histidina, agmatina, fenilalanina e espermina. Dessa forma, o uso da equação calculada em experimento utilizando a matriz como base evita erros de quantificação dos analitos nas amostras.

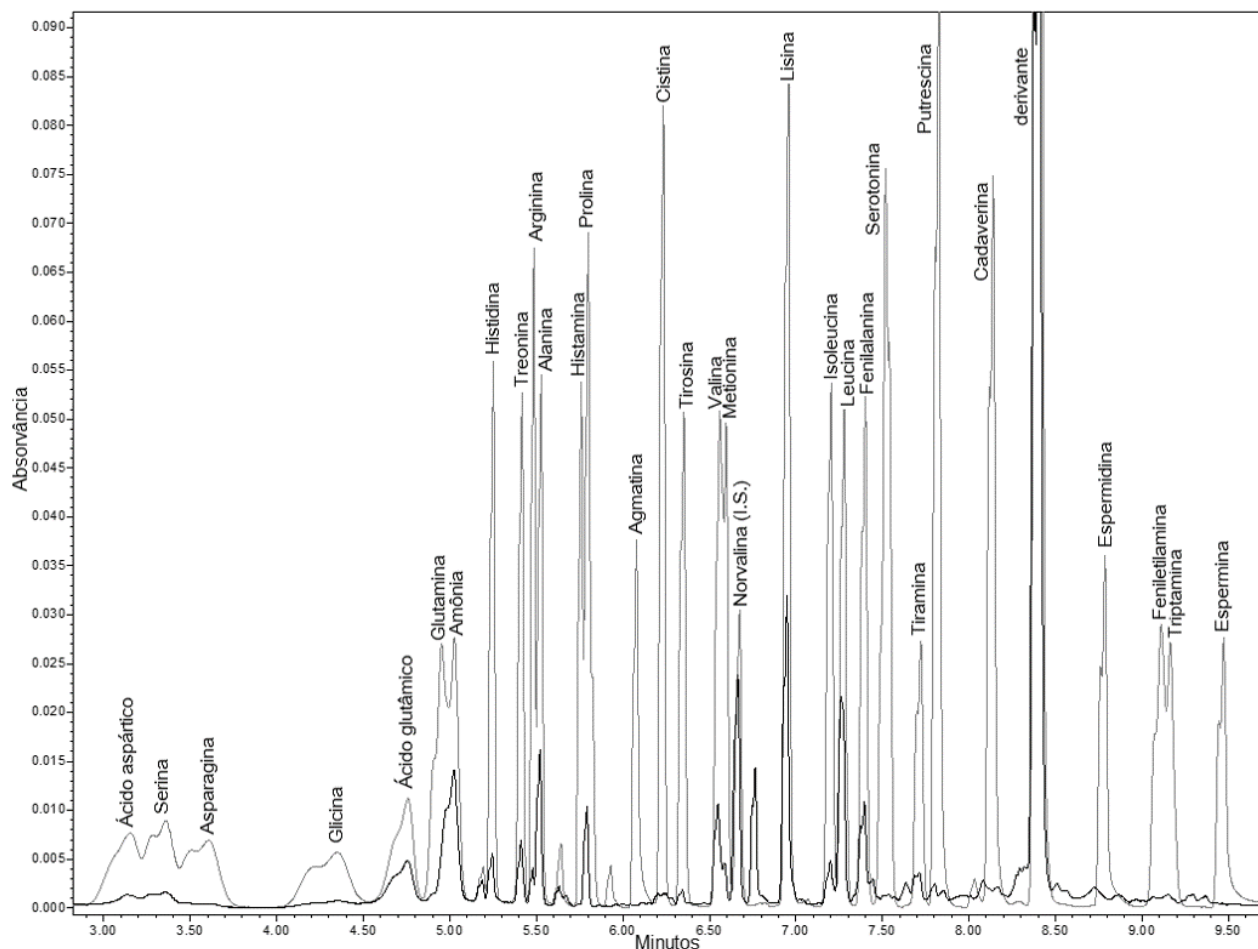


Figura I.1. Cromatograma comparativo de uma amostra de queijo Parmesão após 3 meses de fabricação (picos menores e mais escuros) e um *pool* dos aminoácidos e aminas em solução (picos maiores em sobreposição, mais claros).

3.3 Precisão

A precisão de um método analítico está relacionada com a dispersão dos resultados de ensaios independentes de uma mesma amostra sob condições definidas (BRASIL, 2011). Dessa forma, o experimento foi realizado em seis (6) repetições utilizando os extratos de cada queijo fortificados com o *pool* de aminoácidos e aminas bioativas em 3 níveis de concentração (20, 30 e 40 pmol *in column* para os aminoácidos e amônio, e 26, 40 e 53 pmol *in column* para as aminas), sem variação de analista e dia de análise

(cada queijo teve suas análises realizadas no mesmo dia com as mesmas soluções). O Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011) preconiza coeficiente de variação (CV) de no máximo 7,3% para a precisão do método considerando a faixa de fortificação aplicada, o que foi atingido na grande maioria dos resultados (Tabela I.3). Porém, conforme recomendado pela Diretiva 657/2002 (COMISSÃO EUROPEIA, 2002), todos os coeficientes de variação encontrados estão dentro do esperado e aceitável para concentrações de analitos superiores a 1 mg/kg, que é de 10%.

3.4 Recuperação

A recuperação de aminoácidos, aminas e do íon amônio foi realizada em seis repetições e três níveis de fortificação para cada queijo estudado, a partir da etapa de extração dos analitos nos queijos. Dentre as determinações realizadas, 21,4% obtiveram recuperação acima de 80%, 56,2% entre 70 e 80% e 22,3% menor que 70% (Tabela I.4). O queijo que apresentou melhores percentuais de recuperação foi o Prato. O Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011) e a Diretiva 657/2002 (COMISSÃO EUROPEIA, 2002) recomendam recuperação entre 80 e 110% para concentrações acima de 0,1 mg/kg. A derivação aumenta a quantidade de etapas analíticas, aumentando o risco de perdas e diminuição da recuperação (LOIZZO et al., 2013). Além disso, o experimento de recuperação, quando realizado por fortificação de um *pool* de analitos (e não de analitos isolados), possui a limitação de uma etapa extra de preparo da solução concentrada com todos os analitos a serem testados, apresentando dificuldade de diluição conjunta e erros acumulados na pesagem de todos os compostos.

3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração de um composto que o método é capaz de distinguir de zero confiavelmente, enquanto o limite de quantificação é a menor concentração que o método é capaz de quantificar de forma aceitável (BERNARDES & SOUZA, 2011).

A determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pode ser realizada de diversas formas, segundo vários manuais de validação disponíveis, sendo o método mais utilizado o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral. Apesar disso, técnicas cromatográficas podem apresentar erros quando essa abordagem de medição é utilizada, uma vez que as condições cromatográficas podem afetar o resultado final

Tabela I.3. Coeficientes de variação para as determinações em condições de repetitividade de aminas, aminoácidos e íon amônio em três níveis de concentração para os queijos Gorgonzola, Mussarela, Parmesão e Prato

Analitos	Coeficientes de variação por nível de concentração											
	Gorgonzola			Mussarela			Parmesão			Prato		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Íon Amônio	8,18	8,81	6,08	6,35	3,49	3,10	3,80	3,98	5,07	7,37	8,89	4,79
Aminoácidos												
Ácido Aspártico	5,07	1,52	4,47	9,17	3,46	4,73	1,83	2,69	3,28	3,21	8,49	6,25
Ácido Glutâmico	4,96	7,53	4,83	6,21	4,95	2,81	4,99	3,80	3,38	8,08	6,21	4,19
Alanina	4,43	5,95	2,82	6,35	3,66	1,85	2,07	2,66	1,67	2,59	2,15	3,57
Arginina	1,39	1,84	3,37	8,20	2,56	1,83	1,48	2,19	4,76	2,97	2,53	3,25
Asparagina	4,34	5,39	2,69	6,73	5,97	4,00	2,65	3,55	2,90	4,33	5,22	5,47
Cistina	1,33	2,24	3,34	8,47	1,56	1,64	1,18	2,11	5,56	2,99	2,44	3,27
Fenilalanina	3,27	3,18	2,97	8,18	2,43	1,88	1,34	1,93	6,34	2,61	2,36	3,64
Glicina	7,89	9,85	4,01	9,86	2,90	2,79	2,58	3,56	4,28	6,83	6,55	6,09
Glutamina	9,32	6,29	3,28	7,09	2,67	3,83	-	-	-	7,93	9,78	4,99
Histidina	1,82	2,88	3,40	7,93	4,63	2,92	1,18	1,88	8,74	2,97	5,21	2,77
Isoleucina	3,28	3,68	3,58	4,97	2,30	2,83	1,26	1,81	5,90	2,44	2,40	3,91
Leucina	2,32	2,75	2,64	8,41	2,02	2,08	1,31	1,90	3,19	2,52	2,22	3,29
Lisina	0,93	3,04	4,02	9,56	4,75	2,87	1,38	2,47	3,45	2,38	2,31	5,42
Metionina	4,09	3,84	3,14	1,23	1,51	3,40	2,84	1,92	3,82	6,39	4,42	1,99
Prolina	3,57	3,90	3,84	7,85	1,82	1,58	1,66	2,04	3,36	2,06	1,89	3,09
Serina	4,07	3,41	3,17	5,60	3,13	4,69	3,71	2,55	4,89	4,43	7,07	8,50
Tirosina	1,67	2,34	3,42	7,92	1,50	2,29	1,28	1,88	5,91	3,67	2,34	3,10
Treonina	1,72	3,30	3,21	7,87	2,66	2,05	1,52	2,43	2,74	2,97	3,02	2,79
Valina	4,12	0,91	3,28	2,85	1,28	8,45	3,10	2,13	3,23	4,41	2,49	4,81
Aminas												
Agmatina	7,25	7,02	5,98	9,78	5,05	4,34	1,16	2,80	3,76	1,20	4,19	6,67
Cadaverina	9,84	9,29	0,31	3,12	0,85	7,01	2,29	2,46	1,49	5,80	9,31	2,03
Espermidina	1,17	8,75	10,26	0,28	0,69	5,69	5,12	3,69	9,44	4,20	5,63	7,30
Espermina	2,30	0,91	7,72	7,40	8,83	6,76	3,58	9,59	6,50	4,01	0,36	2,59
Feniletilamina	6,99	6,70	1,64	6,81	8,04	6,78	3,23	2,06	6,53	9,72	9,88	2,56
Histamina	3,84	4,58	2,01	8,20	3,53	1,51	1,19	2,28	5,52	3,56	3,03	3,40
Putrescina	5,22	5,53	3,60	1,73	5,93	7,43	2,95	1,97	1,05	2,33	6,53	1,56
Serotonina	2,91	8,80	2,42	8,25	8,84	4,71	2,47	2,44	8,44	1,10	7,42	1,41
Tiramina	3,99	6,98	7,94	8,50	6,32	6,32	2,04	1,77	6,03	2,38	4,70	1,67
Triptamina	2,10	3,65	5,82	8,90	0,54	8,31	1,82	2,52	6,35	4,92	9,73	2,43

Legenda: (-) não determinado.

(picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, condições de uso e tipo da coluna também causam alterações), além do fato de a curva analítica ser construída com a área

e não somente com o sinal do detector. Dessa forma, recomenda-se o cálculo do LD e LQ com base nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. Assim o LD pode ser expresso como $3,3 \sigma/S$ e o LQ como $10 \sigma /S$, onde σ é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Tabela I.4. Médias das porcentagens de recuperação e desvio padrão para aminas, aminoácidos e íon amônio em queijos Gorgonzola, Mussarela, Parmesão e Prato

Percentual médio de recuperação/queijo				
Analitos	Gorgonzola	Mussarela	Parmesão	Prato
Íon Amônio	71,1±8,5	68,0±5,2	54,6±4,0	79,7±11,5
Aminoácidos				
Ácido Aspártico	98,8±2,0	95,4±3,1	81,6±2,8	100,5±9,6
Ácido Glutâmico	70,3±7,9	75,0±0,8	70,0±1,6	85,8±2,7
Alanina	71,0±8,7	71,3±2,5	65,0±3,8	72,7±6,7
Arginina	64,2±8,6	64,4±5,2	63,6±5,8	70,3±4,0
Cistina	71,1±4,9	73,0±1,1	70,0±4,1	75,8±3,7
Fenilalanina	74,7±4,4	70,8±2,4	70,6±5,6	74,0±5,8
Glicina	65,5±7,4	70,8±2,6	61,5±4,6	74,4±5,7
Histidina	43,1±2,2	54,7±4,2	53,8±4,6	80,4±11,1
Isoleucina	63,3±3,7	72,3±4,4	70,9±4,8	75,2±3,2
Leucina	73,8±5,2	70,3±2,1	70,6±5,8	70,2±2,7
Lisina	63,8±7,9	64,6±5,1	51,7±3,3	74,2±9,7
Metionina	80,6±4,6	77,7±7,0	82,9±0,6	81,6±8,4
Prolina	60,0±8,7	71,8±2,8	61,7±4,2	79,1±4,7
Serina	70,3±6,9	73,2±2,2	72,8±2,0	80,7±2,6
Tirosina	72,4±4,1	70,0±2,2	71,9±7,0	75,9±6,7
Treonina	72,6±9,8	72,7±4,0	70,8±5,2	79,3±6,2
Valina	72,6±4,8	76,2±8,4	73,2±4,3	78,7±9,6
Aminas				
Agmatina	70,1±2,2	83,2±4,1	71,1±2,8	89,8±8,9
Cadaverina	60,5±2,4	71,4±1,0	71,2±2,2	91,4±11,1
Espermidina	59,8±2,6	71,0±0,8	68,1±2,0	84,8±11,2
Espermina	54,7±0,8	79,2±1,7	77,3±1,5	81,2±11,6
Feniletilamina	68,6±6,0	72,6±4,9	64,7±3,7	64,2±3,0
Histamina	70,7±4,1	83,5±2,9	75,7±3,9	100,7±9,5
Putrescina	54,9±2,7	71,2±2,9	70,4±1,9	79,7±11,0
Serotonina	103,1±3,6	109,1±1,8	99,0±5,5	107,5±4,2
Tiramina	74,0±5,4	85,6±3,9	75,9±2,8	89,8±5,3
Triptamina	84,9±2,9	73,0±8,5	98,9±2,2	74,0±7,1

Com exceção do íon amônio, para o qual o ponto mínimo da curva ficou entre o LD e o LQ (Tabela I.5), para todos os outros analitos o menor ponto da curva ficou acima do LQ. Isso mostra que para compostos com concentração variando entre 2 e 100 pmol *in column*, após todo o processamento analítico, o método fornecerá resultados confiáveis de quantificação.

Tabela I.5. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para aminoácidos, aminas e íon amônio, em mg/100 g

Analitos	Valor (mg/100 g)	
	LD	LQ
Íon Amônio	0,24	0,74
Aminoácidos		
Ácido Aspártico	0,81	2,46
Ácido Glutâmico	0,21	0,64
Alanina	0,34	1,02
Arginina	0,22	0,67
Asparagina	0,17	0,52
Cistina	0,23	0,69
Fenilalanina	0,16	0,49
Glicina	0,13	0,38
Glutamina	0,07	0,22
Histidina	0,20	0,59
Isoleucina	0,24	0,72
Leucina	0,24	0,72
Lisina	0,38	1,14
Metionina	0,18	0,54
Prolina	0,21	0,63
Serina	0,43	1,31
Tirosina	0,15	0,45
Treonina	0,27	0,81
Valina	0,25	0,75
Aminas		
Agmatina	0,09	0,26
Cadaverina	0,21	0,63
Espermidina	0,38	1,15
Espermina	0,62	1,88
Feniletilamina	0,16	0,49
Histamina	0,11	0,34
Putrescina	0,15	0,45
Serotonina	0,36	1,09
Tiramina	0,18	0,54
Triptamina	0,15	0,44

4. Conclusão

Foram apresentados parâmetros de desempenho para um método de cromatografia líquida de ultra eficiência para determinação de 19 aminoácidos, 10 aminos bioativas e o íon amônio em queijos Parmesão, Gorgonzola, Prato e Mussarela. Conforme os resultados apresentados, o método é adequado para determinação dessas substâncias nos queijos estudados. Foi observado efeito de matriz para todas as variedades de queijo, o que indica a necessidade de utilizar a matriz para elaboração da curva de calibração, e não em solvente. A recuperação dos compostos nos queijos, apresentou valores superiores a 70% em mais de 76% das determinações, o que pode ser considerado adequado em um método multianalito (30 analitos).

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO GORGONZOLA*

* Capítulo publicado em MOREIRA, G.M.M.; COSTA, R.G.B.; TEODORO, V.A.M.; PAULA, J.C.J.; SOBRAL, D.; FERNANDES, C.; GLÓRIA, M.B.A. Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture of Gorgonzola-type cheese. *LWT - Food Science and Technology* v. 98, p. 583-590, 2018 (ANEXO III).

1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do tempo de maturação no perfil de aminas bioativas livres, aminoácidos livres, proteólise, pH, perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis em queijo Gorgonzola, bem como verificar a existência de correlações que expliquem alterações, caracterizando o queijo ao longo de sua maturação.

2. Material e Métodos

2.1 Produção dos queijos Gorgonzola

Queijos Gorgonzola foram fabricados em três repetições no Núcleo Industrial do Instituto de Laticínios Cândido Tostes - ILCT da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, em Juiz de Fora, MG, conforme metodologia descrita em Dutra e Munck (2002). O leite utilizado nas fabricações foi captado na região de Juiz de Fora entre abril e maio de 2016 e atendeu às especificações de qualidade exigidas na legislação (BRASIL, 2011).

O leite foi pasteurizado (75 °C/15 s), resfriado a 30 - 31 °C e adicionado de cloreto de cálcio (0,02%), fermento láctico mesofílico, cultura adjunta *Penicillium roqueforti* e coagulante em quantidades recomendadas pelos fabricantes. O fermento (R704 - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; e CHN19 - *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*) e o coagulante Chy-max®, foram fornecidos pela Chr. Hansen (Hørsholm, Denmark) e a cultura adjunta PRN (*Penicillium roqueforti*) pela Sacco Brasil (Campinas, SP, Brasil).

Após aproximadamente 60 minutos de repouso, a coalhada foi cortada em cubos de 2 a 3 cm de aresta e deixada em repouso por 5 minutos. Promoveu-se então agitação lenta, por 40 a 60 minutos, até que a consistência ideal ou “ponto da massa” fosse atingido. A massa foi deixada em repouso por 5 minutos e o soro foi completamente drenado. Dividiu-se a massa em vários blocos, que foram virados frequentemente durante cerca de 20 a 30 minutos, e em seguida triturados. À massa triturada foi adicionado e misturado cloreto de sódio (0,4% calculado sobre o volume inicial de leite).

A enformagem foi realizada em formas cilíndricas, que foram viradas a cada 40 minutos por 2 horas. Os queijos foram mantidos a 24 ± 2 °C durante pelo menos 12 h, para completar a fermentação (pH 4,7). A salga foi realizada por aplicação de sal na superfície do queijo por 3 dias. Os queijos foram perfurados uma semana após o dia da produção e foram embalados em filmes de polietileno duas semanas depois. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em incubadoras BOD a 12 ± 2 °C.

Periodicamente, aos 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias, contados a partir do dia da perfuração, foram colhidas amostras e analisadas em duplicata. No primeiro dia (14 dias após a perfuração) foram analisadas amostras para aminoácidos livres, aminas bioativas, teor total de sólidos, gordura em extrato seco, cloretos, atividade da água, pH, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 ($NS_{pH4,6}$), nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% ($NS_{TCA12\%}$), perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis. Durante a maturação, foram determinados aminoácidos livres, aminas bioativas, NT, $NS_{pH4,6}$, $NS_{TCA12\%}$, perfil de textura, pH, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis.

A contagem do tempo de análise a partir da perfuração e não da fabricação para o queijo Gorgonzola foi uma decisão tomada com base no fato de que o queijo ainda não tinha mofo desenvolvido antes de sua perfuração, não apresentando assim atributos de queijo Gorgonzola, o que descaracterizaria o produto e tornaria as análises sem valor para fins de definição e classificação deste queijo, especificamente.

2.2 Reagentes

As análises físico-químicas nos queijos foram realizadas utilizando os seguintes materiais: areia do mar purificada; ácido sulfúrico $d_{20}=1825$ g/L; álcool amílico $d_{20}=811$ g/L; soluções tampão pH 4 e 7; cloreto de potássio 3 mol/L; citrato de sódio 0,5 mol/L; sulfato de potássio p.a.; sulfato de cobre p.a.; ácido clorídrico 1,41 mol/L; ácido

tricloroacético 24% m/v; ácido sulfúrico p.a.; ácido bórico 4% com indicadores; ácido clorídrico 0,05 mol/L; hidróxido de sódio 35% m/v; papel de filtro qualitativo.

Os reagentes utilizados nas análises bioquímicas (aminas e aminoácidos) foram os mesmos citados no Capítulo I.

Para as análises microbiológicas foram utilizados *Lactobacilli* MRS ágar da Neogen® (Lansing, MI, EUA), placas 3M® Petrifilm® Aerobic Count (St. Paul, MN, EUA) e água peptonada Merck® (Darmstadt, Alemanha).

2.3 Análises físico-químicas

O preparo de amostras foi realizado segundo AOAC 970.30 (AOAC, 2012), com cortes de frações proporcionais a todas as partes do queijo, seguido de homogeneização em triturador Blender Plus Tepron®. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do ILCT/EPAMIG em Juiz de Fora, MG. O teor de sólidos totais (% m/m EST) foi obtido por método gravimétrico em estufa a 102 ± 2 °C e o teor de gordura (% m/m Gd) pelo método butirométrico (BRASIL, 2006). Para análise de atividade de água utilizou-se o analisador de atividade de água Aqualab Decagon®, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante. A medida do pH foi feita por meio de leitura em medidor de pH calibrado. O teor de cloretos (expresso em % m/m NaCl) foi obtido por reação com nitrato de prata e titulação “pelo resto” com tiocianato de potássio (PEREIRA et al., 2001). Porcentagens de NT, $NS_{pH4,6}$ e $NS_{TCA12\%}$ foram obtidos pelo método de Kjeldahl, conforme descrito em Pereira et al. (2001). As seguintes fórmulas foram usadas para cálculo de alguns parâmetros:

- % (m/m) Umidade = $100 - \% \text{ EST}$

- % (m/m) Proteína total = $\% \text{ NT} \times 6,38$ (AOAC, 2012)

- Gordura no extrato seco (GES):

$$\% \text{ GES} = \frac{\% \text{ Gd} \times 100}{\% \text{ EST}}$$

- Sal na umidade (S/U):

$$\% \text{ S/U} = \frac{\% \text{ Cloretos} \times 100}{\% \text{ Umidade} + \% \text{ Cloretos}}$$

- Índice de extensão de proteólise:

$$\% \text{ Extensão} = \frac{\% \text{ NS}_{pH4,6} \times 100}{\% \text{ NT}}$$

- Índice de profundidade de proteólise:

$$\% \text{ Profundidade} = \frac{\% \text{ NSTCA}_{12\%} \times 100}{\% \text{ NT}}$$

2.4 Análises bioquímicas

As aminas bioativas e os aminoácidos livres nos queijos foram analisados simultaneamente por cromatografia líquida de ultra eficiência e detecção ultravioleta a 249 nm após derivação com 6-aminoquinolil-N-hidroxi succinimidil carbamato (AQC), conforme descrito no Capítulo I e por Moreira et al. (2017).

2.5 Análises microbiológicas

A contagem de bactérias lácticas (*Lactococcus* e *Lactobacillus*) nos queijos foi feita utilizando metodologia descrita por Silva et al. (2007) por contagem em placas usando ágar MRS, enquanto a contagem de aeróbios mesófilos viáveis foi feita em 3M® Petrifilm® AC plates (AOAC, 2012).

2.6 Perfil de textura

A análise do perfil de textura (TPA) das amostras de queijos foi conduzida conforme Sobral et al. (2016), usando texturômetro CT3 Brookfield (Middleboro, MA, EUA). As velocidades de pré-teste, teste e pós teste foram de 1 mm/s, com distância de compressão de 30% a partir da parte superior da amostra. Foi utilizada sonda cilíndrica (TA 25/1000) de 50,8 mm de diâmetro, célula de carga de 4,5 kg e *trigger point* de 0,05 N. Amostras cúbicas (2 cm³) foram aleatoriamente coletadas em 6 partes do queijo para cada determinação.

A resistência exercida pela amostra foi automaticamente registrada e a dureza (medida em N, em dois ciclos), coesividade (adimensional), elasticidade (mm), índice de elasticidade (adimensional), mastigabilidade (J), gomosidade (N) e adesividade (mJ) foram calculadas usando o programa Brookfield Texture Pro CT V1.4.

2.7 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em três repetições (cada lote de queijo foi produzido em dias diferentes). Os resultados das análises físico-químicas foram sujeitos a testes de

adequação dos resíduos a pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade. ANOVA, teste de Tukey e Regressão foram então aplicados aos dados, sendo que o nível de significância adotado foi de 95%.

Duas técnicas de análise multivariada foram utilizadas para caracterização dos queijos Gorgonzola durante sua maturação: análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). Para a PCA, pH, conteúdos individuais de aminas (putrescina, espermidina, espermina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina, e 2-feniletilamina), íon amônio, conteúdos individuais de aminoácidos (ácido aspártico, serina, asparagina, glicina, ácido glutâmico, glutamina, histidina, treonina, arginina, alanina, prolina, cistina, tirosina, valina, metionina, lisina, leucina, isoleucina e fenilalanina), aminoácidos livres totais, aminas bioativas totais, proteína total, extensão e profundidade de proteólise, parâmetros de textura (dureza em dois ciclos, coesividade, elasticidade, índice de elasticidade, mastigabilidade, gomosidade e adesividade), contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis foram usadas como variáveis ativas para a determinação dos componentes principais, e a variável suplementar (tempo de maturação) foi projetada no plano fatorial. PCA foi conduzida com padronização das variáveis usando matriz de correlação de Pearson.

Duas análises de HCA foram realizadas. O primeiro dendrograma foi obtido por agrupamento das observações, enquanto o segundo por agrupamento das variáveis (utilizando os mesmos parâmetros da PCA). Foi utilizado o método do encadeamento único (*single linkage*) e a similaridade foi medida por correlação de Pearson nos dois casos.

Todas as análises foram conduzidas utilizando o software XLSTAT (versão 2017.7.48738; Addinsoft, Paris, França).

3. Resultados e Discussão

3.1 Características do queijo Gorgonzola aos 14 dias de maturação

As características físico-químicas do queijo Gorgonzola 14 dias após a perfuração do queijo estão descritas na Tabela II.1. Os valores obtidos para GES (53,9%) e umidade (45,6%) estão de acordo com o RTIQ de queijos azuis (BRASIL, 2007), tendo sido classificado como queijo gordo e de média umidade (BRASIL, 1996).

Tabela II.1. Composição média de queijos Gorgonzola aos 14 dias após a perfuração dos queijos

Parâmetros (unidades)	Valores (médias \pm DP) *
pH	5,10 \pm 0,10
Proteína total (% m/m)	22,53 \pm 3,53
Índice de Extensão (%)	14,25 \pm 4,76
Índice de Profundidade (%)	9,98 \pm 1,95
Cloreto de sódio (% m/m)	1,69 \pm 0,14
Atividade de água	0,98 \pm 0,01
GES (%)	53,93 \pm 2,03
Umidade (%m/m)	45,61 \pm 0,19
Sal na umidade (%)	3,58 \pm 0,28

* DP = desvio padrão. n=3 repetições

Valores semelhantes foram observados para teor de umidade em queijos azuis nos estágios iniciais de maturação (FURTADO et al., 1984; GOBBETTI et al., 1997; ZARMPOUTIS et al., 1997; VOIGT et al., 2010) e, também, para GES, proteína total (FURTADO et al., 1984; ZARMPOUTIS et al., 1997; VOIGT et al., 2010), e pH (FURTADO et al., 1984; ZARMPOUTIS et al., 1997; JUNCAL et al., 2005).

Variações maiores foram encontradas para o teor de sal na umidade (S/U) de queijos azuis, considerando os dados da literatura. Queijos azuis com 14 dias de estocagem refrigerada apresentaram S/U de 5,9% (VOIGT et al., 2010), enquanto queijos Gorgonzola após 4 dias de fabricação 3,13% (FURTADO et al., 1984) e 5,6% sem indicação de tempo de maturação (ZARMPOUTIS et al., 1997). Gobbetti et al. (1997) encontraram para Gorgonzola com 10 dias de maturação 5,2% de S/U na superfície e 0,73% na parte interior do queijo. Ao final da maturação o conteúdo de sal na umidade no interior e exterior do queijo se aproximaram: 3,2 e 3,8%, respectivamente, aos 86 dias de fabricação. Esses resultados demonstram que existem variações na tecnologia de fabricação destes queijos, principalmente concernente ao tipo de salga. Todavia, é importante que haja um controle rigoroso nesta etapa, uma vez que o conteúdo de sal na umidade dos queijos pode impactar na proteólise por exercer uma forte influência no crescimento do fungo, e conseqüentemente, pode afetar significativamente as características gerais dos queijos azuis (FURTADO et al., 1984; SERATLIĆ et al., 2011).

Os perfis de aminas bioativas e aminoácidos livres estão demonstrados na Tabela II.2. Aos 14 dias após a perfuração dos queijos Gorgonzola nenhuma amina foi detectada enquanto o teor de íon amônio estava em 21,0 mg/100 g e o total de aminoácidos livres

chegou a 100,7 mg/100 g. Doze aminoácidos foram encontrados, enquanto ácido aspártico, glicina, glutamina, histidina, arginina, cistina e isoleucina não foram. Leucina, lisina e fenilalanina foram os aminoácidos mais prevalentes nesse estágio inicial de maturação, chegando a valores maiores que 10 mg/100 g cada.

Tabela II.2. Aminoácidos livres e amins bioativas em queijos Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias *

Teores de amins bioativas e aminoácidos (mg/100 g) durante maturação (dias) *						
	14	21	28	35	42	49
Íon amônio	21,0±13,3	16,2±3,1	13,7±6,1	19,8±4,2	23,2±1,6	24,0±1,0
Aminoácidos						
Ácido aspártico	nd	nd	3,2±4,2	11,4±4,3	13,3±6,0	20,6±2,2
Ácido glutâmico	6,3±4,7	4,7±2,0	10,0±11,8	24,3±14,9	24,6±14,7	22,8±10,2
Alanina	5,0±2,3	6,4±1,8	8,7±2,8	11,9±3,1	14,4±1,5	16,5±0,3
Asparagina	4,7±1,2	8,4±1,9	9,4±4,6	15,2±2,6	16,5±2,9	21,9±2,4
Fenilalanina	10,6±3,3	20,2±5,4	30,7±8,2	34,2±7,5	45,6±11,8	49,1±9,4
Glicina	nd	1,8±0,7	2,6±0,9	4,3±1,4	6,1±0,9	7,2±0,5
Glutamina	nd	nd	4,6±4,5	11,9±5,8	17,1±4,3	21,1±1,9
Histidina	nd	4,9±1,7	10,1±3,9	9,7±3,4	14,1±2,5	15,2±2,4
Isoleucina	nd	6,1±2,4	8,6±3,0	15,6±5,3	20,3±3,6	23,5±1,7
Leucina	14,2±4,8	34,6±10,4	44,5±13,0	69,3±12,6	83,4±16,0	96,4±9,8
Lisina	11,6±5,3	21,8±6,7	21,3±10,6	43,8±14,1	51,3±6,4	57,6±4,6
Metionina	4,1±0,7	10,2±2,0	15,3±3,7	17,2±5,1	25,6±3,6	25,8±4,1
Prolina	2,4±1,3	5,0±1,5	7,5±3,4	13,9±4,9	18,1±3,3	21,7±0,9
Serina	3,4±1,0	3,0±4,1	nd	nd	nd	nd
Tirosina	8,2±3,1	11,3±6,4	12,6±7,1	8,4±5,3	16,3±12,7	9,8±9,3
Treonina	3,2±1,4	5,9±0,8	7,4±2,9	11,2±2,8	15,1±2,2	16,8±1,8
Valina	6,0±2,0	14,1±3,8	19,4±6,6	32,0±9,9	39,2±5,7	45,8±2,2
Amins						
Agmatina	nd	2,7±1,1	3,2±1,1	2,8±0,7	3,0±0,6	3,4±1,4
Histamina	nd	nd	nd	nd	nd	2,4±1,3
Serotonina	nd	nd	nd	nd	4,1±1,8	3,6±1,5
Triptamina	nd	nd	nd	nd	nd	3,3±0,8
Tiramina	nd	9,6±1,7	12,7±6,6	18,6±8,3	30,0±4,3	33,3±6,9
2-Feniletilamina	nd	nd	nd	2,5±0,9	3,0±0,4	4,1±0,5
Total						
Aminoácidos livres	100,7±44,1 ^c	174,5±50,3 ^{bc}	229,9±91,9 ^{bc}	354,0±104,6 ^{ab}	444,3±87,7 ^a	495,9±32,0 ^a
Amins biogênicas	nd	9,6±1,0 ^c	12,7±6,8 ^c	21,2±9,9 ^{bc}	37,1±6,0 ^{ab}	46,7±9,2 ^a
Amins bioativas	nd	12,3±0,9 ^c	15,8±7,6 ^c	24,0±10,5 ^{bc}	40,2±6,2 ^{ab}	50,2±10,8 ^a

*Tempo contado a partir da data de perfuração dos queijos.

Médias ± desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes em cada linha são significativamente diferentes (Teste de Tukey, P<0,05). nd=não detectado

3.2 Alterações ocorridas durante a maturação do queijo Gorgonzola

3.2.1 pH e proteína total

O conteúdo de proteína total e pH dos queijos Gorgonzola permaneceram constantes ao longo da maturação dos queijos ($P>0,05$) com médias $20,7\pm 1,1$ e $5,06\pm 0,07$ mg/100 g respectivamente (Tabela II.3). Não são esperadas alterações no teor de proteína total, devido à natureza do método de Kjeldahl, que quantifica todo o nitrogênio da amostra e a converte em proteína total multiplicando pelo fator 6,38, mesmo que proteólise tenha ocorrido e a proteína não esteja mais intacta (DZIUBA et al., 2010). Por outro lado, a ausência de alterações observadas no pH do queijo Gorgonzola pode ter ocorrido devido a presença de alguns sais, como o fosfato de cálcio coloidal residual, que exerce influência na capacidade tamponante de queijos, mantendo o pH acima de 5,0. Além disso, a produção de amônia durante a maturação ajuda a evitar a redução do pH de queijos maturados por mofos (LUCY et al., 2003).

Tabela II.3. Médias de pH e proteína total para o queijo Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias *

Tempo de maturação (dias)*	Valores **	
	pH	Proteína (%m/m)
14	$5,10\pm 0,10^a$	$22,53\pm 3,53^a$
21	$4,94\pm 0,00^a$	$21,55\pm 0,72^a$
28	$5,06\pm 0,17^a$	$19,94\pm 0,28^a$
35	$5,11\pm 0,17^a$	$19,94\pm 0,19^a$
42	$5,02\pm 0,18^a$	$20,22\pm 0,61^a$
49	$5,11\pm 0,02^a$	$20,05\pm 2,45^a$

* Tempo contado a partir da data de perfuração dos queijos.

** Valores médios \pm desvio padrão (n=3) na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, $P>0,05$).

Resultados semelhantes de pH e proteína total foram encontrados em outros queijos azuis na literatura. Uma variedade espanhola de queijo azul – Picón Bejes-Tresviso, apresentou pH inicial de 5,13; e 6,87 ao final de 3,5 meses de maturação (PRIETO et al., 1999). É esperado que queijos azuis em geral (não considerando as características individuais de cada variedade) tenham em sua composição 21% de proteína total e pH de 6,5. Este valor varia conforme as variedades, por exemplo, o queijo Blue Stilton apresenta normalmente 24,8% de proteína total e pH de 5,2, enquanto o Roquefort 21,5% de proteína total e pH de 6,4 (FOX et al., 2017).

3.2.2 Índices de proteólise

Os queijos Gorgonzola apresentaram aumento de proteólise durante a maturação (Figura I.1), como é o esperado para queijos azuis, que são inoculados com *P. roqueforti*. Equações de regressão linear foram estimadas para os índices de extensão e profundidade, e seus coeficientes lineares foram similares ($P > 0,05$), o que demonstra que a taxa de aumento para os dois parâmetros foi a mesma. Ao final da maturação (49 dias após perfuração dos queijos), a extensão da proteólise chegou a 30,7% e a profundidade 24,4%.

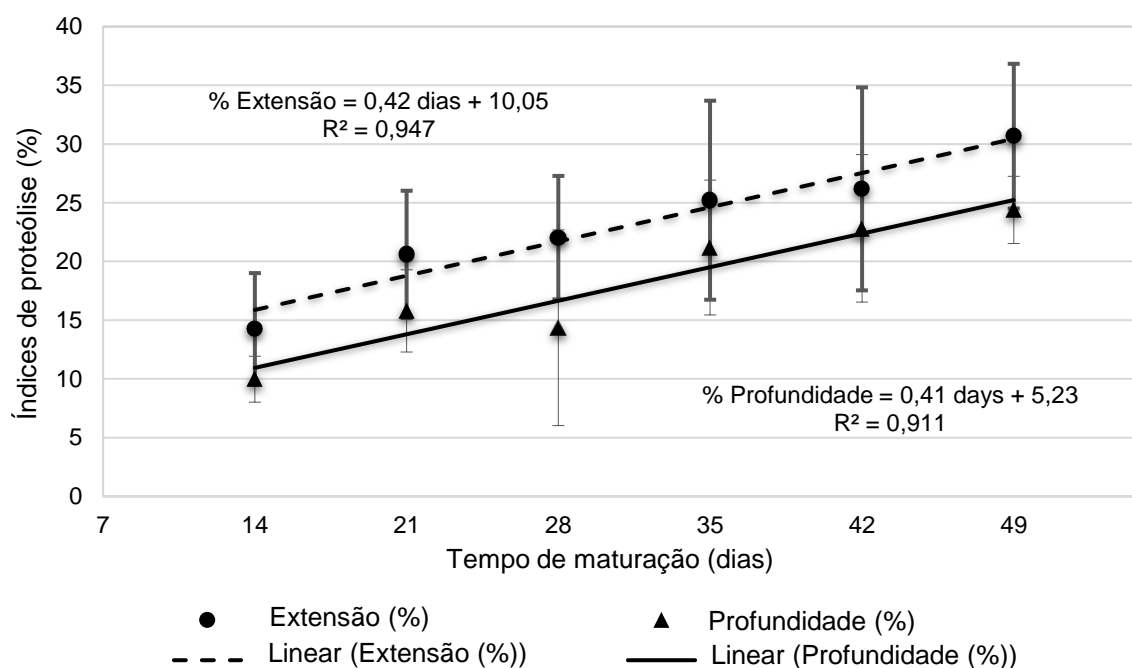


Figura II.1. Regressão linear para os índices de extensão e profundidade do queijo Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias.

Esses resultados são similares aos encontrados na literatura para queijos Gorgonzola com 31 dias de fabricação, que apresentaram profundidade de 21% (JUNCAL et al., 2005); porém proteólise mais pronunciada foi encontrada por Zarpoutis et al. (1997) para Gorgonzola, com 43,4% de extensão e 37,8% de profundidade. Outros queijos azuis podem apresentar proteólise mais intensa que o Gorgonzola, como queijos azuis espanhóis, que obtiveram extensão inicial de 13,5% chegando a 72,7% e profundidade de 6,2% a 49,9% no final de 3,5 meses de maturação (PRIETO et al., 1999). Embora tenham em comum a maturação por *P. roqueforti*, as diversas diferenças nas matérias-primas (como qualidade microbiológica e tipo de leite) e tecnologias de fabricação (como tipo de salga, temperatura e umidade do ar durante a maturação) fazem com que os queijos apresentem diferentes propriedades físico-químicas e padrões de maturação.

3.2.3 Aminoácidos livres e aminas bioativas

Aminoácidos livres e aminas bioativas totais dos queijos Gorgonzola aumentaram durante a maturação, com diferenças significativas ($P > 0,05$) variando de 100,7 a 495,9 mg/100 g para aminoácidos e de 'não detectado' a 50,2 mg/100 g para aminas bioativas, entre 14 e 49 dias de maturação a partir do dia da perfuração dos queijos (Tabela II.2). Estes resultados estão em concordância com o comportamento dos índices de proteólise, que aumentaram durante a maturação, e corroboram com outros estudos que demonstram que a proteólise durante a maturação de queijos impacta na produção e acumulação de aminas (LADERO et al., 2008; LINARES et al., 2012; TORRACCA et al., 2016). As Figuras II.2 e II.3 apresentam a regressão linear para os teores de aminoácidos livres e aminas bioativas totais, respectivamente.

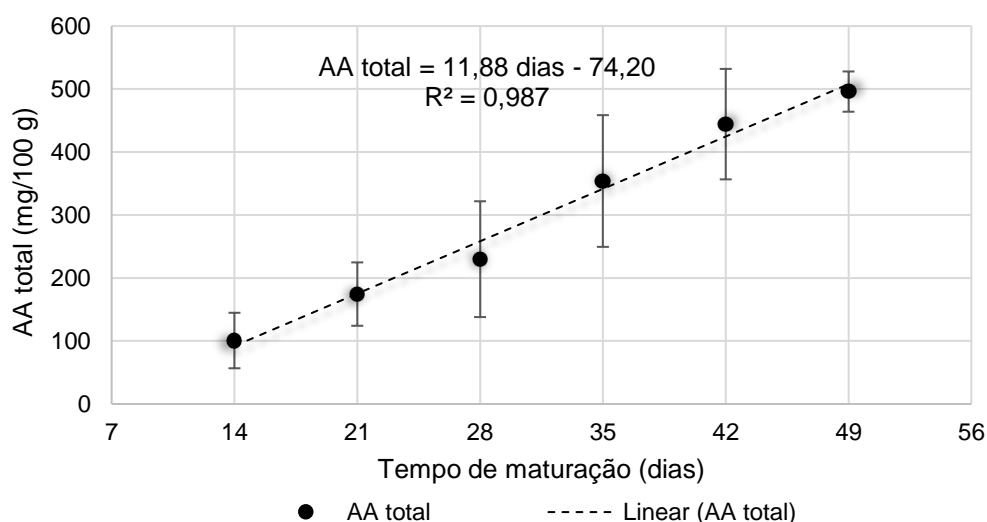


Figura II.2. Regressão linear para o teor de aminoácidos livres totais (AA total) do Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias.

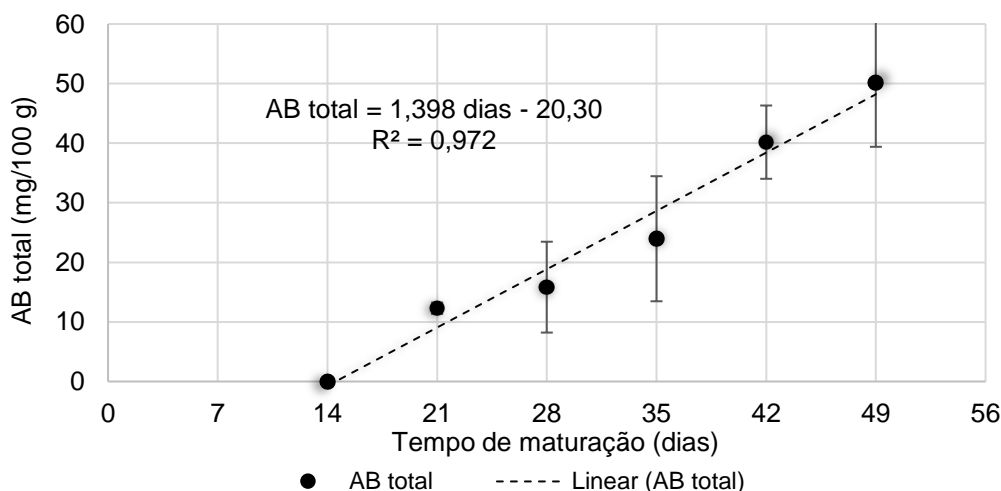


Figura II.3 Regressão linear para o teor de aminas bioativas totais (AB total) do Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias.

Com relação aos aminoácidos livres no queijo Gorgonzola, 17 dos 19 aminoácidos pesquisados foram encontrados pelo menos uma vez durante a maturação, bem como o íon amônio (Figura II.4). Arginina e cistina não foram encontradas, serina e glicina estavam presentes em baixos teores enquanto valina, lisina, leucina e fenilalanina foram as mais abundantes, sendo estes todos aminoácidos essenciais (NELSON; COX, 2008), o que demonstra a qualidade nutricional das proteínas lácteas. Lisina, valina e fenilalanina estão entre os mais importantes aminoácidos precursores da formação de compostos de aroma em queijos (YVON & RIJNEN, 2001). Fenilalanina e lisina também foram aminoácidos prevalentes em queijos azuis analisados por Korös et al. (2008). Dados sobre aminoácidos livres durante a maturação em queijos azuis são raros na literatura.

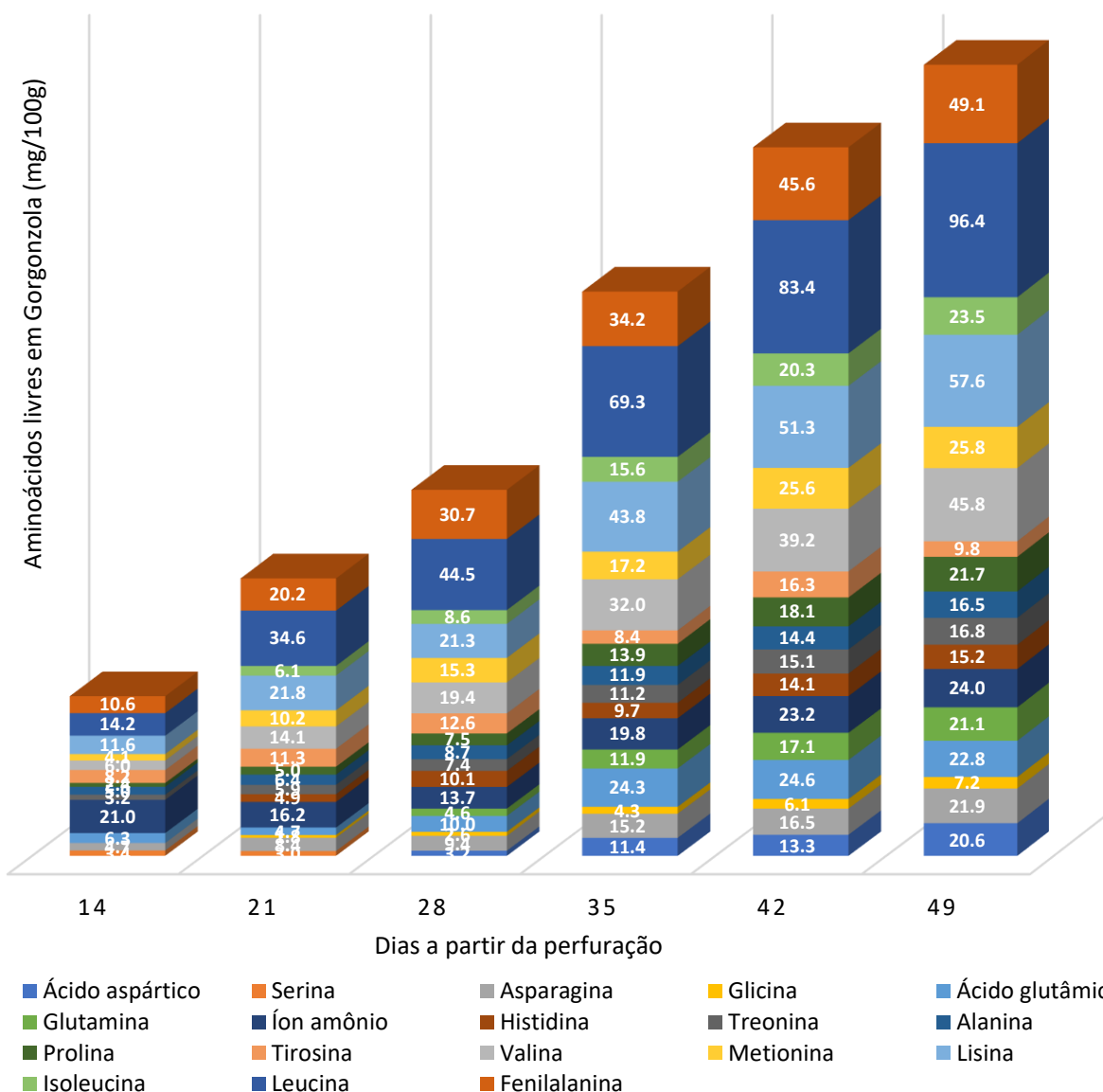


Figura II.4. Aminoácidos livres em queijo Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias.

Glicina, histidina, e isoleucina foram detectadas apenas a partir de 21 dias de maturação do queijo Gorgonzola, enquanto ácido aspártico e glutamina só começaram a se fazer presentes a partir de 28 dias e continuaram a aumentar até o final. Os teores de todos os aminoácidos aumentaram durante a maturação, com exceção da serina e da tirosina. Serina foi detectada apenas nos primeiros dois tempos analisados. Os teores de tirosina não variaram significativamente ($P < 0,05$) ao longo da maturação. Como este aminoácido é precursor da tiramina (HALÁSZ et al., 1994), possivelmente os níveis de tirosina não aumentaram como os outros aminoácidos devido à formação da amina correspondente, que foi a mais abundante e predominante entre as aminas em queijo Gorgonzola neste estudo.

Algumas aminas não estavam presentes originalmente no queijo Gorgonzola, mas começaram a ser formadas ao longo de sua maturação. Agmatina e tiramina foram primeiramente detectadas no 21º dia de maturação, 2-feniletilamina no 35º dia, serotonina no 42º dia e triptamina e histamina apenas no 49º dia. Espermidina, espermina, putrescina, e cadaverina não foram encontradas em nenhum tempo analisado (Figura II.5).

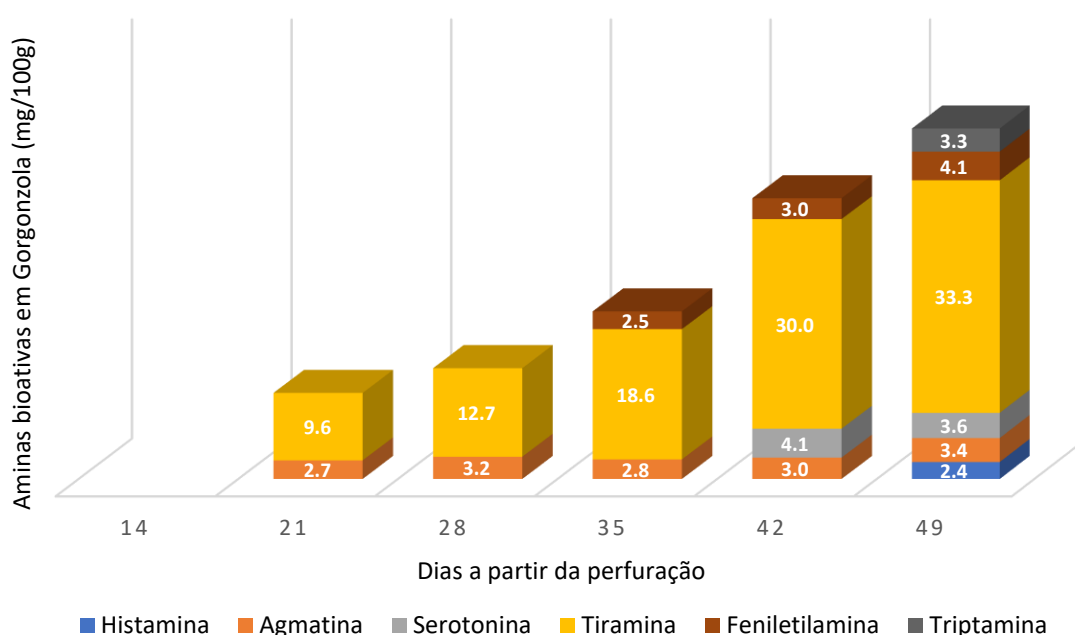


Figura II.5. Aminas bioativas em queijo Gorgonzola durante maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias.

Agmatina foi encontrada em baixos níveis no queijo Gorgonzola (média geral de $3,02 \pm 0,81$ mg/100 g) após 21 dias de maturação. Os efeitos benéficos da agmatina para a saúde humana como neurotransmissor, neuromodulador, estimulante da liberação de

insulina e agente supressor de tumores são bem conhecidos. Apesar disso, altas concentrações de poliaminas (grupo no qual a agmatina se insere) em alimentos pode causar efeitos tóxicos e intensificar o efeito toxicológico da histamina (HALÁSZ et al., 1994; GALGANO et al., 2012).

Serotonina, triptamina e 2-feniletilamina são aminas neuroativas e foram detectadas após o 35º dia de maturação do queijo Gorgonzola. A serotonina é um neurotransmissor envolvido na regulação de funções importantes como o sono, a fome e o humor, enquanto que a triptamina e a 2-feniletilamina podem interferir nas funções da serotonina, inibindo sua absorção ou afetando a sua ligação nos locais receptores (GLÓRIA, 2006).

Quanto aos efeitos adversos à saúde associados às aminas biogênicas, a tiramina e a histamina são as aminas mais preocupantes. A histamina foi detectada apenas no final da maturação em níveis baixos; no entanto, de acordo com a EFSA (2011), a presença de qualquer quantidade de histamina pode causar efeitos adversos para indivíduos sensíveis à mesma. Tiramina também é uma amina capaz de causar efeitos indesejáveis à saúde humana. Foi a amina mais prevalente, atingindo 33,3 mg/100 g aos 49 dias de maturação do Gorgonzola. Considerando o limite de 600 mg de tiramina por pessoa por refeição como limite para nenhum efeito adverso para a saúde em indivíduos saudáveis que não tomam medicamentos inibidores de monoamino oxidase (IMAO), a quantidade encontrada no queijo Gorgonzola não causaria nenhum dano. No entanto, para os indivíduos que tomam drogas clássicas de IMAO, o limite diminui para 6 mg de tiramina por pessoa por refeição (EFSA, 2011) e, portanto, esses indivíduos devem evitar o queijo Gorgonzola. Estudos são necessários para investigar os fatores que induzem a formação e acumulação de histamina e tiramina em queijos Gorgonzola para evitar sua formação.

Queijos azuis do mercado foram analisados quanto às aminas bioativas. Vale e Glória (1998) encontraram, em queijos Gorgonzola, histamina, tiramina e espermidina a níveis até 2,99; 1,07 e 3,23 mg/100 g, respectivamente. A tiramina foi detectada em 67% das amostras analisadas. Novella-Rodríguez et al. (2003) analisaram 20 queijos azuis e observaram que tiramina, cadaverina, putrescina e histamina eram as aminas mais prevalentes. Tiramina esteve presente em níveis elevados – 1.585,4 mg/kg. Em outro trabalho, a tiramina em queijos azuis atingiu 22,8 mg/100 g (LADERO et al., 2010). Com base nesses resultados, apesar das diferenças quanto aos tipos e níveis de aminas bioativas encontradas em queijos azuis, a tiramina está sempre presente em quantidades maiores. Portanto, a tiramina deve ser considerada a amina alvo ao realizar medidas no sentido de controlar a produção e acúmulo de aminas bioativas para

melhorar a qualidade do queijo Gorgonzola e reduzir o risco de intoxicação ao consumir queijos azuis.

3.2.4 Perfil de textura

As propriedades de textura do queijo Gorgonzola ao longo da maturação foram avaliadas pela Análise de Perfil de Textura (Tabela II.4). A coesividade foi o único parâmetro que mudou ao longo do tempo, diminuindo significativamente. Resultados semelhantes foram observados durante a maturação de queijo azul espanhol (DIEZHANDINO et al., 2016).

Tabela II.4. Parâmetros de textura de queijo Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias *

Textura	Parâmetros por tempo de maturação *					
	14	21	28	35	42	49
Dureza (N) (primeira "mordida")	33,1±12,3 ^a	30,9±10,5 ^a	32,5±10,3 ^a	31,6±4,3 ^a	31,5±4,8 ^a	31,2±5,3 ^a
Dureza (N) (segunda "mordida")	28,2±9,8 ^a	24,8±7,1 ^a	25,8±7,1 ^a	25,0±3,5 ^a	24,1±3,4 ^a	23,2±4,1 ^a
Gomosidade (N)	21,5±7,2 ^a	18,7±5,5 ^a	18,8±5,1 ^a	18,1±2,7 ^a	15,8±2,4 ^a	15,3±2,9 ^a
Mastigabilidade (J)	0,11±0,03 ^a	0,09±0,03 ^a	0,09±0,03 ^a	0,09±0,02 ^a	0,07±0,02 ^a	0,07±0,01 ^a
Coesividade	0,66±0,04 ^a	0,62±0,06 ^{ab}	0,58±0,04 ^{abc}	0,57±0,03 ^{abc}	0,50±0,06 ^{bc}	0,48±0,03 ^c
Elasticidade (mm)	4,9±0,2 ^a	4,8±0,3 ^a	4,7±0,3 ^a	4,7±0,2 ^a	4,3±0,4 ^a	4,5±0,2 ^a
Índice de elasticidade	0,82±0,04 ^a	0,81±0,04 ^a	0,79±0,06 ^a	0,79±0,04 ^a	0,72±0,06 ^a	0,75±0,03 ^a
Adesividade (mJ)	0,76±0,22 ^a	1,01±0,06 ^a	0,83±0,26 ^a	0,70±0,30 ^a	0,85±0,13 ^a	1,21±0,51 ^a

* Tempo contado a partir da data de perfuração dos queijos.

Valores médios ± desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma linha com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, $P>0,05$).

A coesividade expressa o grau em que a massa de alimento mastigada se junta na boca (FOEGEDING & DRAKE, 2007). A coesividade teve altas correlações negativas com aminoácidos livres totais (-0,979, $P<0,05$), extensão (-0,948, $P<0,05$) e profundidade de proteólise (-0,930, $P<0,05$), o que sugere que a hidrólise da matriz protéica do queijo afeta a coesividade. À medida que as interações dentro da matriz protéica diminuem, as interações entre proteína e água aumentam e conseqüentemente o queijo se torna menos coeso.

Todos os outros parâmetros de textura - dureza (primeira e segunda "mordida"), gomosidade, mastigabilidade, elasticidade, índice de elasticidade e adesividade - não mudaram significativamente durante a maturação do queijo Gorgonzola ($P > 0,05$).

3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis

A contagem total de bactérias lácticas (BAL) e de mesófilos aeróbios viáveis (MAV) foi realizada durante a maturação dos queijos Gorgonzola (Tabela II.5) e foi observado que não houve alteração com o tempo do log de unidades formadoras de colônia por grama de queijo (UFC/g) para bactérias lácticas ($P < 0,05$) e que uma diminuição do log UFC/g de mesófilos aeróbios viáveis ocorreu somente no último tempo de maturação avaliado. Flórez et al. (2006) encontraram em queijos azuis tipo Cabrales com 3 dias de maturação 9,55 log UFC/g de contagem total de bactérias mesófilas e 8,62 log UFC/g de *Lactobacilli*; com 60 dias estes valores chegaram a 7,75 e 7,05 log UFC/g respectivamente.

Tabela II.5. Contagem média (log UFC/g \pm desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Gorgonzola durante a maturação a 12 ± 2 °C por 49 dias *

Dias de maturação *	Contagem de microrganismos (log UFC/g \pm desvio padrão)	
	BAL	MAV
14	9,42 \pm 0,38 ^a	9,64 \pm 0,21 ^a
21	9,31 \pm 0,42 ^a	9,56 \pm 0,48 ^{ab}
28	9,37 \pm 0,27 ^a	9,54 \pm 0,15 ^{ab}
35	9,34 \pm 0,37 ^a	9,41 \pm 0,24 ^{ab}
42	9,23 \pm 0,41 ^a	9,15 \pm 0,44 ^{ab}
49	8,56 \pm 0,11 ^a	8,44 \pm 0,75 ^b

* Tempo contado a partir da data de perfuração dos queijos.

BAL – bactérias lácticas; MAV – mesófilos aeróbios viáveis.

Valores médios \pm desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, $P > 0,05$).

3.2.6 Análise multivariada

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) resultou em três grupos de análises agrupados por similaridade (Figura II.6). O primeiro grupo incluiu todos os parâmetros de textura (exceção de adesividade), proteína total, BAL, MAV e o aminoácido serina. Este *cluster* é de especial interesse, pois pode ajudar a explicar a manutenção de quase todos os parâmetros de textura significativamente inalterados enquanto ocorre a maturação (e

a proteólise). Na caseína, o fosfato orgânico é esterificado à proteína por meio do grupo hidroxila da serina, e o cálcio se liga ao fosfato formando aglomerados coloidais de fosfato de cálcio, que são muito importantes para manter a estrutura da micela da caseína, juntamente com outras interações (FOX et al., 2015). Como a serina não aparece no perfil de aminoácidos livres durante a maturação (somente nos dois primeiros tempos em níveis baixos), pode ser responsável por manter a estrutura das proteínas e conseqüentemente os parâmetros de textura não sofreram alterações significativas ao longo da maturação. O pH aparece como uma medida isolada no segundo agrupamento, enquanto que os aminoácidos livres, as amins bioativas, a extensão e a profundidade da proteólise e a adesividade estão juntas no terceiro grupo.

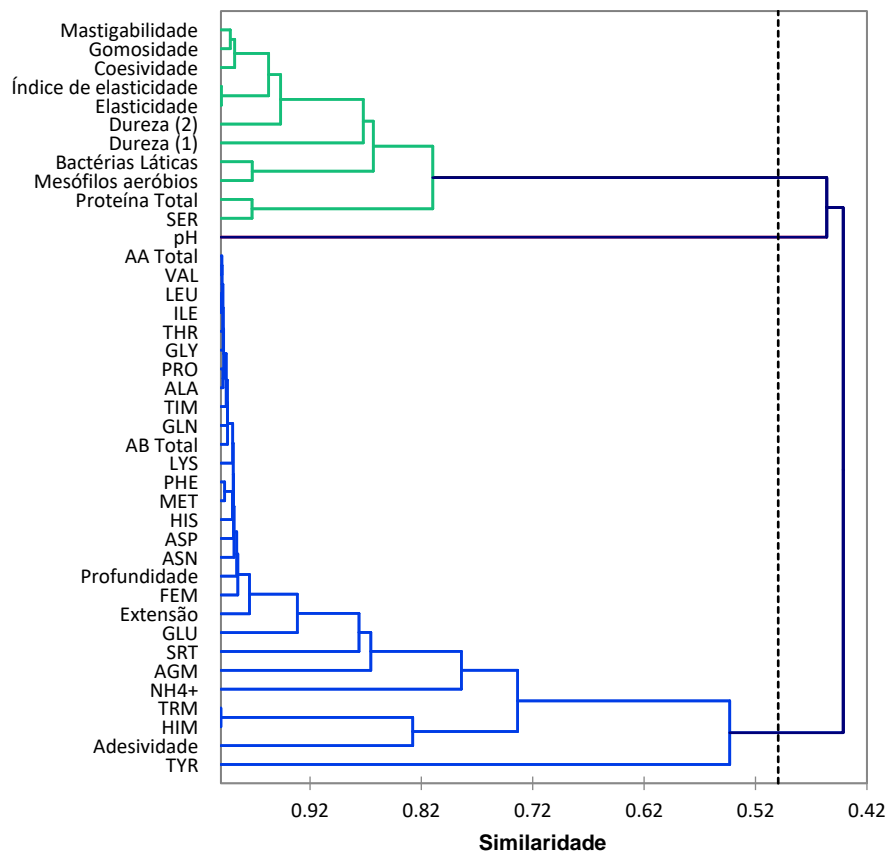


Figura II.6. Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, amins bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a maturação de queijos Gorgonzola a 12 ± 2 °C por 49 dias.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada nos resultados físico-químicos, bioquímicos, microbiológicos e de textura dos queijos Gorgonzola (Figura II.7). Os primeiros dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 86,7% da variância total e permitiu uma boa separação dos tempos de maturação, onde os três primeiros tempos (14, 21 e 28 dias) de maturação ficaram do lado esquerdo do gráfico enquanto

os últimos três tempos (35, 42 e 49 dias) de maturação ficaram do lado direito (Figura II.7.B). PC1 contribuiu com 78,13% da variância total e teve altas correlações (acima de 0,9) com quase todos aminoácidos e aminas, extensão e profundidade de proteólise (correlações positivas) e parâmetros de textura (correlações negativas). PC2 contribuiu com 8,62% da variância total e sua maior correlação positiva foi com o aminoácido tirosina (0,742) enquanto as maiores correlações negativas foram com as aminas histamina e triptamina (-0,661), como pode ser observado na Figura II.7.A. Estas duas aminas só foram encontradas nos queijos no seu último tempo de maturação analisado, o que influenciou o componente principal 2, distanciando este tempo dos demais no gráfico.

A análise multivariada HCA aplicada às observações permitiu o agrupamento por similaridade de três conjuntos relacionados a estágios de maturação do queijo Gorgonzola (Figura II.7.C): o primeiro tempo, 14 dias após a perfuração dos queijos; 21 e 28 dias de maturação agrupados em um segundo grupo; e o final da maturação no terceiro grupo - 35, 42 e 49 dias após a perfuração.

Com base nesses resultados, o tempo de maturação é determinante para a caracterização de queijo Gorgonzola. Os dados apresentados demonstram que a proteólise aumentou com o tempo, enquanto os parâmetros de textura não demonstraram o mesmo comportamento. Possivelmente, a proteólise observada em queijos Gorgonzola não afeta a textura para torná-la mais elástica ou macia (em termos instrumentais), mas potencialmente gera precursores para a formação de sabor característico dessa variedade de queijo.

4. Conclusão

Várias mudanças ocorrem durante a maturação do queijo Gorgonzola. A proteólise (extensão e profundidade), os aminoácidos livres e as aminas bioativas aumentaram ao longo da maturação. Apesar disso, a coesividade e a contagem de aeróbios mesófilos diminuíram, enquanto o pH, a proteína total, a dureza (primeira e segunda "mordida"), gomosidade, mastigação, elasticidade, índice de elasticidade, adesividade e contagem de bactérias lácticas não sofreram alterações. Entre as aminas formadas, a tiramina e a histamina são de interesse para a saúde de indivíduos que fazem uso de medicação IMAO e sensíveis à histamina, respectivamente.

A análise multivariada resumiu as interações e ajudou a explicar alguns dos comportamentos observados. A PCA mostrou que a proteólise, expressa por índices de

extensão e profundidade, e perfil de aminoácidos livres, são bons marcadores para avaliação de maturação de queijos Gorgonzola. O HCA foi útil na interpretação da ligação entre níveis baixos de serina e parâmetros de textura inalterados, uma vez colocados em um mesmo grupo por similaridade de comportamento.

Foi demonstrada a importância de estabelecer parâmetros bioquímicos ao longo da maturação de queijos Gorgonzola. Os dados proporcionaram informações sobre fatores que influenciam a qualidade e as características intrínsecas deste tipo de queijo e podem servir como instrumento de classificação, padronização e decisões sobre melhorias nos processos produtivos.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO MUSSARELA

1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do tempo de maturação no perfil de aminas bioativas livres, aminoácidos livres, proteólise, pH, perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis em queijo Mussarela, bem como verificar a existência de correlações que expliquem alterações, caracterizando o queijo ao longo de sua maturação.

2. Material e Métodos

2.1 Produção dos queijos Mussarela

Queijos Mussarela foram fabricados em três repetições no Núcleo Industrial do Instituto de Laticínios Cândido Tostes - ILCT da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, em Juiz de Fora, MG, conforme descrito em Dutra e Munck (2002). O leite utilizado nas fabricações foi captado na região de Juiz de Fora entre abril e maio de 2016 e atendeu às especificações de qualidade exigidas na legislação (BRASIL, 2011).

O leite foi pasteurizado (75 °C/15 s), resfriado a 30 – 31 °C e adicionado de cloreto de cálcio (0,02%), fermento láctico termofílico e coagulante em quantidades recomendadas pelos fabricantes. O fermento (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) e o coagulante Chy-max[®], foram fornecidos pela Chr. Hansen (Hørsholm, Dinamarca).

Após aproximadamente 40 minutos de repouso, a coalhada foi cortada em cubos de 1 a 1,5 cm de aresta. Promoveu-se então agitação lenta, sendo acelerada aos poucos, até completar 20 minutos. A segunda agitação foi mais vigorosa e acompanhada de aquecimento lento com vapor na camisa do tanque (elevando-se 1 °C a cada 2 – 3 minutos) até atingir 44 °C. Após cerca de 40 minutos a consistência ideal ou “ponto da massa” foi atingido, com textura mais seca e macia.

Depois de obtido o ponto, a massa foi pré-prensada usando-se o dobro de peso em relação à quantidade de massa durante 20 min. Atingido o ponto de filagem (acidez do soro em 0,6% de ácido láctico), a massa foi picada em fatias pequenas e colocada em água a 75 °C (usando-se de 2 a 3 L água/kg de massa), filada e em seguida enformada em formas de 1 kg. A salga foi realizada em salmoura a 10 – 12 °C com 20% de sal por 24 horas e em seguida os queijos foram encaminhados à câmara fria (10 – 12 °C) por mais 24 horas. Após a secagem os queijos foram embalados em embalagem plástica termoencolhível e estocados em câmara fria entre 2 e 4 °C.

Periodicamente, aos 15, 29, 43, 57, 71 e 85 dias de fabricação, foram colhidas amostras e analisadas em duplicata. No primeiro dia (15 dias após a fabricação) foram analisadas amostras para aminoácidos livres, aminas bioativas, teor total de sólidos, gordura em extrato seco, cloretos, atividade da água, pH, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 ($NS_{pH4,6}$), nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% ($NS_{TCA12\%}$), perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis. Durante a maturação, foram determinados aminoácidos livres, aminas bioativas, NT, $NS_{pH4,6}$, $NS_{TCA12\%}$, perfil de textura, pH, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis.

2.2 Reagentes

Os reagentes para análises físico-químicas, bioquímicas (aminas e aminoácidos) e microbiológicas foram os mesmos citados no Capítulo II.

2.3 Análises físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas

Os métodos utilizados para análises físico-químicas, bioquímicas (aminas e aminoácidos) e microbiológicas foram os mesmos descritos no Capítulo II.

2.4 Perfil de textura

A análise do perfil de textura (TPA) das amostras de queijos foi conduzida conforme Sobral et al. (2016), usando texturômetro CT3 Brookfield (Middleboro, MA, EUA). Velocidades de pré-teste, teste e pós teste foi de 1 mm/s, com distância de compressão de 40% a partir da parte superior da amostra. Foi utilizada sonda cilíndrica (TA 4/1000) de 38,1 mm de diâmetro, célula de carga de 4,5 kg e *trigger point* de 0,05 N. Amostras cilíndricas (2 cm de largura, 2,5 cm de profundidade) foram aleatoriamente coletadas em

6 partes do queijo para cada determinação. Os parâmetros de textura analisados foram os mesmos descritos no Capítulo II.

2.5 Análises estatísticas

O delineamento do experimento, bem como as técnicas estatísticas e tratamento dos dados aplicados foram semelhantes aos descritos no Capítulo II.

3. Resultados e Discussão

3.1 Características do queijo Mussarela aos 15 dias de maturação

As características físico-químicas do queijo Mussarela aos 15 dias após sua fabricação estão descritas na Tabela III.1. Os valores obtidos para GES (50,10%) e umidade (45,11%) estão de acordo com o RTIQ de queijos Mussarela (BRASIL, 1997b), tendo sido classificado como queijo gordo e de média umidade (BRASIL, 1996).

Tabela III.1 Composição média de queijos Mussarela aos 15 dias após sua fabricação

Parâmetros (unidades)	Valores (médias \pm DP) *
pH	5,18 \pm 0,15
Proteína total (% m/m)	26,29 \pm 5,33
Índice de Extensão (%)	6,81 \pm 2,30
Índice de Profundidade (%)	3,70 \pm 0,65
Cloreto de sódio (% m/m)	1,49 \pm 0,15
Atividade de água	0,96 \pm 0,00
GES (%)	50,10 \pm 0,34
Umidade (%m/m)	45,11 \pm 1,79
Sal na umidade (%)	3,20 \pm 0,24

* DP = desvio padrão. n=3 repetições.

A Mussarela possui propriedades funcionais importantes relacionadas ao uso que se pretende deste queijo, e as diferenças físico-químicas que ocorrem com o tempo de estocagem e também devido a diferentes tecnologias de produção podem resultar em queijos bem distintos sob a mesma denominação (KINDSTED et al., 2010). Mussarela produzida com coagulante microbiano e temperatura de filagem de 56 °C obteve valores de pH 5,6, umidade 45,4%, sal na umidade 3,61%, GES 48,5% aos 7 dias de fabricação (ROSA et al., 2007). Ubaldo et al. (2015) encontraram teor de umidade de 46,3%, proteína total 19,8%, GES 49,9% e pH 5,42 para Mussarela feita a partir de leite com

contagem média de células somáticas. Estes dois estudos conduzidos no Brasil apresentaram valores similares aos encontrados na Mussarela no presente trabalho. Já um estudo conduzido nos Estados Unidos encontrou para a Mussarela pH 5,39, sal 1,31%, sal na umidade 2,5%, GES 41,5%, umidade 53,2% e proteína 23,1%, o que enquadra a Mussarela em grupos diferentes de umidade e GES em relação ao queijo fabricado neste estudo (DAVE et al., 2003).

Aos 15 dias após a fabricação dos queijos Mussarela nenhuma amina foi detectada (Tabela III.2). Ácido glutâmico, alanina, leucina, lisina, prolina, serina e o íon amônio foram quantificados em baixos teores e o total de aminoácidos livres chegou a 33,3 mg/100 g. Ácido glutâmico foi o aminoácido prevalente neste estágio de maturação e a prolina foi o aminoácido encontrado em menor quantidade, 2,5 mg/100 g. Ubaldo et al. (2015) encontraram apenas espermina entre dez aminas analisadas em queijos Mussarela no primeiro tempo de estocagem analisado. Dados sobre a composição de aminoácidos livres em queijo Mussarela são raros na literatura.

Tabela III.2. Aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos Mussarela durante estocagem refrigerada (2 a 4 °C) por 85 dias

Teores de aminas bioativas e aminoácidos (mg/100 g) durante estocagem (dias)						
	15	29	43	57	71	85
Íon amônio	2,4±0,2	3,1±0,9	3,2±0,4	5,4±1,5	5,8±1,7	5,9±1,5
Aminoácidos						
Ácido glutâmico	7,0±2,7	15,7±5,8	18,1±4,5	23,6±6,6	34,0±5,6	35,2±8,9
Alanina	4,8±1,6	7,6±1,2	7,4±2,7	9,9±4,9	12,2±4,7	13,1±5,2
Asparagina	nd	3,5±0,3	4,3±1,1	5,7±2,5	8,6±1,8	11,1±4,3
Fenilalanina	nd	5,6±1,3	9,4±1,4	14,2±3,0	20,1±2,8	24,0±4,9
Glicina	nd	1,5±0,2	1,6±0,3	2,0±1,1	2,8±0,8	3,3±1,2
Histidina	nd	nd	4,5±1,3	5,5±1,3	6,5±2,4	7,8±2,1
Isoleucina	nd	nd	3,4±1,5	4,3±1,2	6,4±1,5	7,5±1,9
Leucina	4,0±0,5	9,1±1,5	13,9±2,8	18,7±3,5	30,3±2,3	32,3±6,7
Lisina	4,2±0,8	8,5±2,3	13,0±3,7	12,5±3,0	20,9±3,7	20,3±3,9
Metionina	nd	nd	nd	nd	nd	3,1±1,5
Prolina	2,5±0,3	3,7±0,4	4,4±0,5	5,6±0,4	7,3±0,7	8,1±1,3
Serina	4,0±1,3	4,8±1,5	3,7±0,9	5,9±0,9	3,4±1,5	7,2±3,1
Tirosina	nd	nd	nd	3,8±2,6	5,7±3,0	6,8±2,9
Treonina	nd	nd	nd	nd	3,3±0,8	3,8±0,8
Valina	nd	2,8±0,7	4,8±0,9	6,7±2,6	10,8±2,3	11,0±2,4
Amina						
Tiramina	nd	nd	nd	5,9±3,2	4,2±1,8	5,9±1,6
Total						
Aminoácidos livres	33,3±4,0 ^c	75,2±12,7 ^{bc}	103,7±17,4 ^{bc}	135,8±33,2 ^{ab}	203,7±24,9 ^a	217,8±62,9 ^a
Aminas biogênicas	nd	nd	nd	5,9±3,2 ^a	4,2±1,8 ^a	5,9±1,6 ^a

Médias ± desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes em cada linha são significativamente diferentes (Teste de Tukey, P<0,05). nd=não detectado

3.2 Alterações ocorridas durante a estocagem do queijo Mussarela

3.2.1 pH e proteína total

Para o queijo Mussarela os resultados das análises feitas ao longo do armazenamento entre 2 e 4 °C (quinzenalmente entre 15 e 85 dias) forneceram valores médios de pH e proteína sem variação em todo período analisado ($P>0,05$), como observado na Tabela III.3.

O valor médio de pH foi $5,05 \pm 0,11$ e o de proteína total foi $23,34 \pm 1,78$ para os queijos Mussarela. Valores de pH semelhantes foram encontrados em Mussarela de baixa umidade (AYYASH & SHAH, 2011) porém valores maiores foram encontrados em outros trabalhos (VALE & GLÓRIA, 1998; UBALDO et al., 2015). O comportamento do pH durante a estocagem de queijos Mussarela pode variar devido a diferenças na fabricação, capacidade tamponante, teores de umidade e lactato, a razão fosfato de cálcio solúvel/coloidal e inativação térmica da cultura *starter* (SHEEHAN & GUINEE, 2004). Para o teor de proteína total, o queijo *Caciocavallo*, que, semelhante à Mussarela, é de massa filada, apresentou teor inicial de proteína total de 23,6% no início da maturação e 26,9% ao final de 120 dias (NIRO et al., 2017); valores próximos aos encontrados neste estudo. Mussarela com baixos teores de umidade e gordura apresentaram valores maiores de proteína total (AYYASH & SHAH, 2011; FEENEY et al., 2002; SHEEHAN & GUINEE, 2004), o que é esperado visto que a diminuição de um componente acarreta no aumento dos demais em teores percentuais.

Tabela III.3. Médias de pH e proteína total para o queijo Mussarela durante a estocagem refrigerada (2 a 4 °C)

Tempo de armazenamento (dias)	Valores *	
	pH	Proteína (% m/m)
15	$5,18 \pm 0,15^a$	$26,29 \pm 5,33^a$
29	$5,09 \pm 0,16^a$	$24,83 \pm 1,56^a$
43	$5,06 \pm 0,13^a$	$22,16 \pm 0,35^a$
57	$5,11 \pm 0,28^a$	$22,06 \pm 5,51^a$
71	$4,92 \pm 0,12^a$	$22,31 \pm 1,28^a$
85	$4,91 \pm 0,20^a$	$22,41 \pm 2,03^a$

* Valores médios \pm desvio padrão na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, $P>0,05$).

3.2.2 Índices de proteólise

Os queijos Mussarela apresentaram aumento de proteólise durante a estocagem (Figura III.1). Equações de regressão linear para os índices de proteólise foram significativas ($P < 0,05$) e estimadas, apresentando coeficientes de correlação linear maior que 0,9 para a extensão e 0,8 para a profundidade. A extensão variou de 6,8% a 13,4% enquanto a profundidade foi de 3,7% a 7,1% em 85 dias de estocagem.

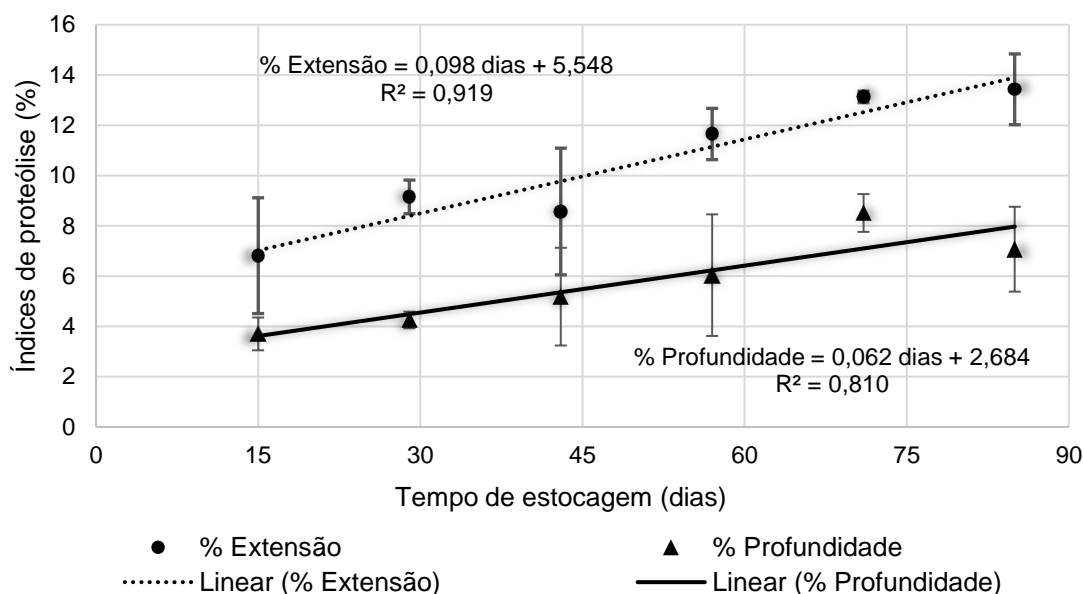


Figura III.1. Regressão linear para os índices de extensão e profundidade de Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C.

Queijo Mussarela apresentou extensão média de proteólise aos 27 dias de estocagem refrigerada de 11% e profundidade média de 4,3% aproximadamente, sendo o queijo produzido com coalho de origem microbiana e temperatura de filagem 56 °C (ROSA et al., 2007). Dave et al. (2003) encontraram profundidade de proteólise em Mussarela com 60 dias menor que 2%. A extensão de proteólise em Mussarela com baixo teor de gordura produzida tradicionalmente com acidificação via fermentação por bactérias *starter* em trabalho conduzido por Sheehan et al. (2004) começou com valores menores que 2% e chegou a pouco mais de 5% com 70 dias de estocagem. Valores semelhantes foram encontrados em Mussarela com baixo teor de gordura, extensão variando de 3 a 8% e profundidade de 1,8 a 3,1%, aproximadamente, em 8 semanas de estocagem (IMM et al., 2003). Esses dados reforçam uma tendência geral de a Mussarela ser um queijo de proteólise menos acentuada em relação a outros queijos (McSWEENEY, 2004).

3.2.3 Aminoácidos livres e aminas bioativas

A Mussarela apresentou formação e acúmulo de aminas bioativas e aminoácidos livres ao longo do tempo, como visto nas Figuras III.2 e III.3. A tiramina foi a única amina encontrada neste queijo, e foi encontrada somente nos últimos três tempos de estocagem refrigerada e em níveis considerados seguros para consumo (Figura III.4). Vale e Glória (1998), em estudo sobre queijos disponíveis no mercado consumidor, encontraram diversas aminas em Mussarela, sendo as mais prevalentes: histamina (valor máximo 11,3 mg/100 g), tiramina (máximo 1,6 mg/100 g), putrescina (máximo 1,4 mg/100 g) e cadaverina (máximo 2,3 mg/100 g). Ubaldo et al. (2015) encontraram tiramina somente em queijos Mussarela feitos com alta contagem de células somáticas (média 0,4 mg/100 g). Entre as dez aminas avaliadas, somente espermina, triptamina, tiramina e serotonina foram encontradas nos queijos Mussarela analisados com diferentes contagens de células somáticas.

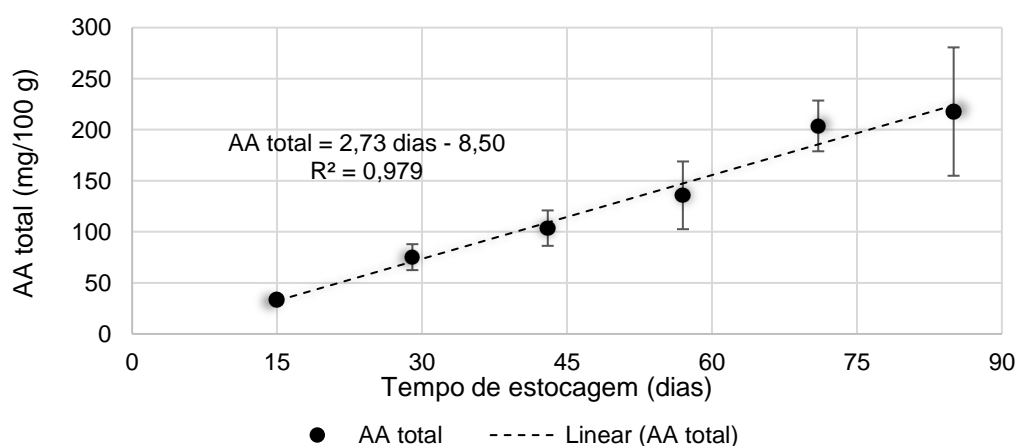


Figura III.2. Regressão linear para o teor de aminoácidos livres totais (AA total) do queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C.

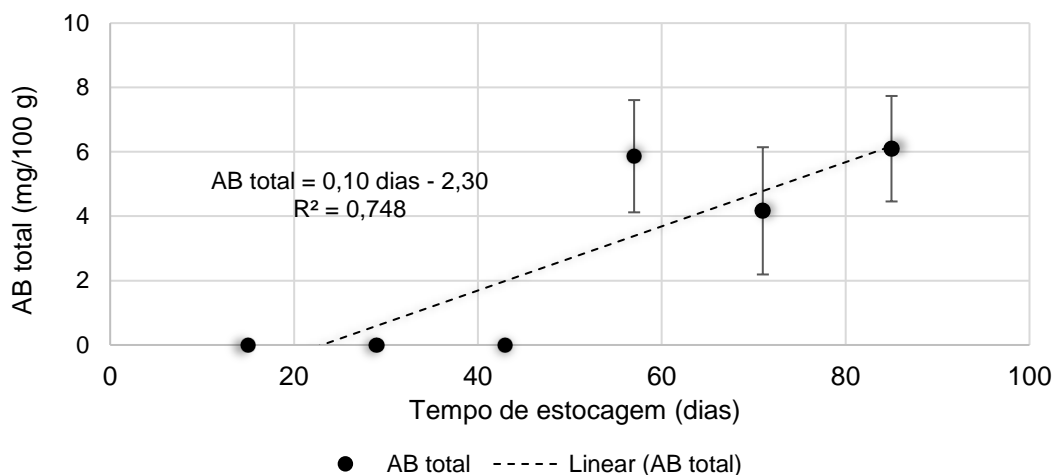


Figura III.3. Regressão linear para o teor de aminas bioativas totais (AB total) do queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C.

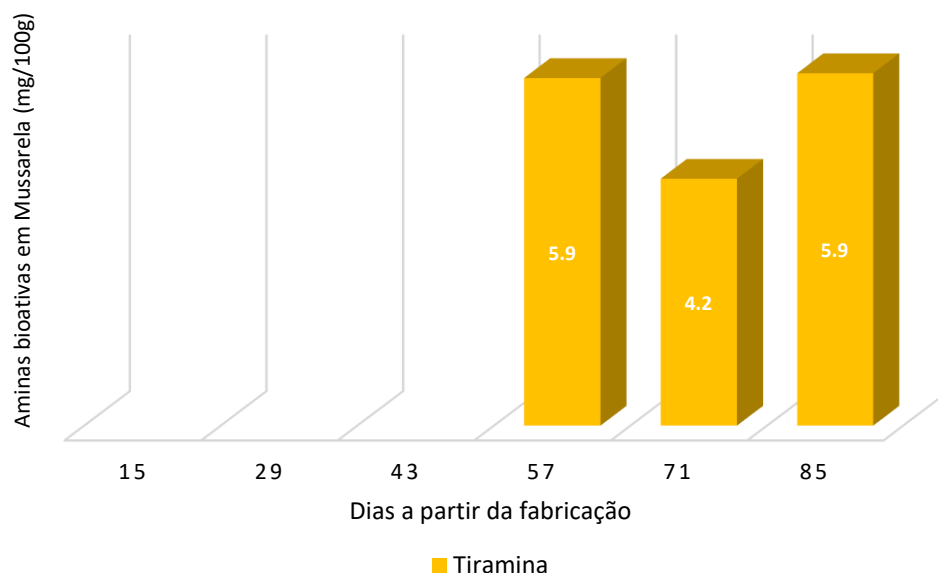


Figura III.4. Aminas bioativas em queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C.

Entre os aminoácidos encontrados no queijo Mussarela (Figura III.5), destacaram-se o ácido glutâmico com média de 35,2 mg/100 g, arginina com 25,1 mg/100 g, lisina com 20,3 mg/100 g, leucina com 32,3 mg/100 g e fenilalanina com 24 mg/100 g, sendo os três últimos aminoácidos essenciais (FENNEMA, 1996). Ácido aspártico e glutamina não foram encontradas em nenhum tempo analisado para a Mussarela e treonina, tirosina e metionina foram encontradas a partir dos últimos tempos de estocagem avaliados.

Os teores de aminoácidos livres totais em Mussarela, que neste trabalho chegou a 213,6 mg/100 g está relacionada às características deste queijo, não somente em relação ao sabor, mas também com as propriedades funcionais, visto que este queijo pode ser consumido em preparações alimentares e não somente da forma direta. Ainda, o escurecimento não enzimático – reação de Maillard é uma propriedade desejada em queijo Mussarela quando aquecida em pizzas, porém se o escurecimento for maior que o ideal pode ser causa de rejeição do consumidor. Os aminoácidos livres, bem como a galactose residual de uma fermentação incompleta, quando aquecidas no queijo durante o preparo do alimento, participam da reação de Maillard, que leva ao escurecimento. O fermento é fundamental no controle desta reação, visto que a presença dos aminoácidos livres e da galactose residual dependem da capacidade das bactérias adicionadas (e contaminantes) de hidrolizar os peptídeos derivados da matriz caseínica e de fermentar ou não a galactose (OBERG et al., 1991; COSTA & FURTADO, 2002c).

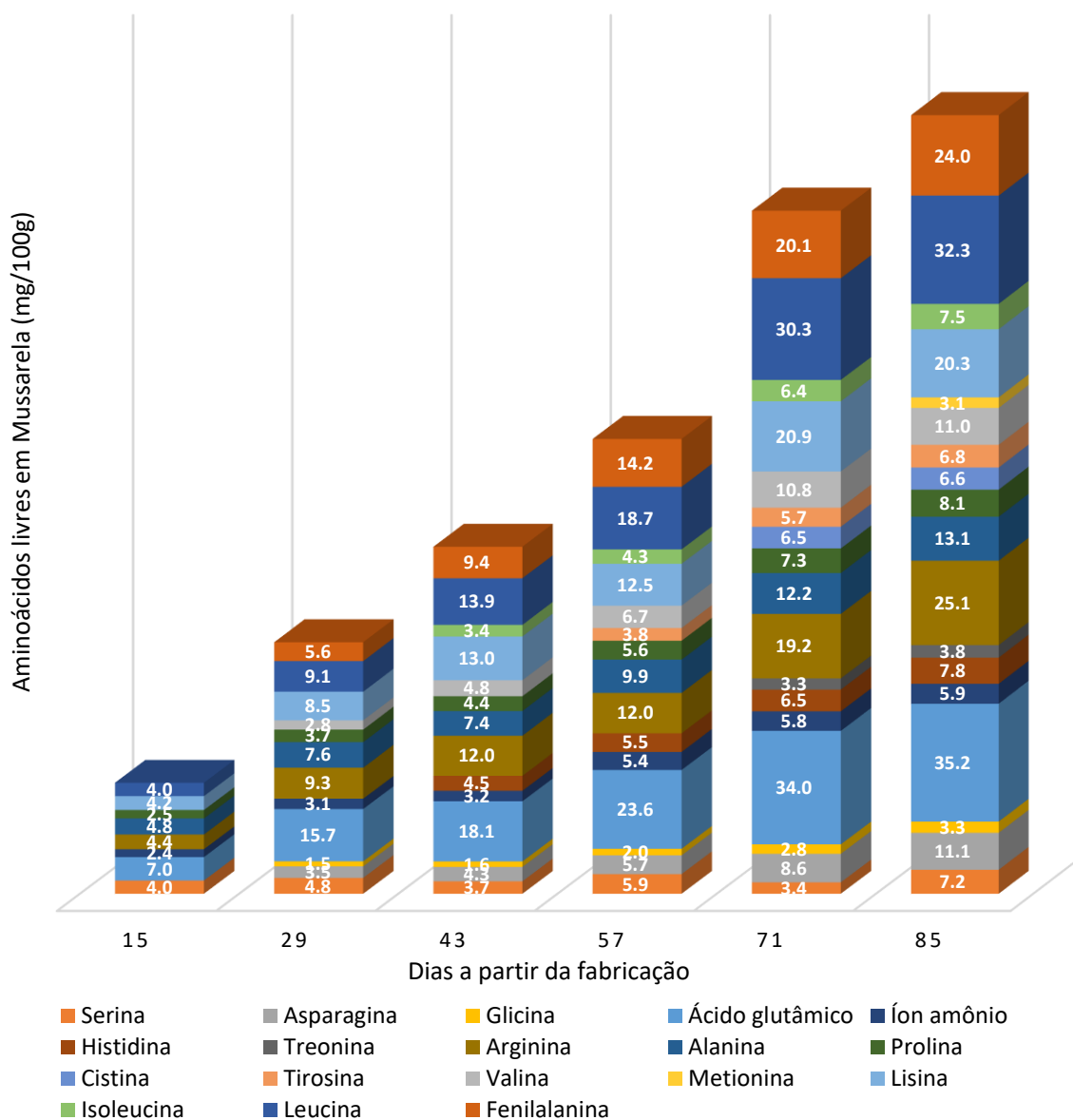


Figura III.5. Aminoácidos livres em queijo Mussarela durante estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C.

Dados de aminoácidos livres em Mussarela são raros na literatura, reforçando a importância do presente estudo. O único trabalho encontrado foi o de Ayyash et al. (2011) que analisaram o total de aminoácidos livres em Mussarela com baixa umidade pelo método cádmio-ninidrina e reportaram os resultados em função da absorvância a 507 nm, sem quantificá-los, o que impossibilita uma comparação dos dados, embora também tenha sido observado um aumento deste parâmetro ao longo do tempo de estocagem dos queijos. Outro queijo de massa filada, o Cacciocavallo, foi analisado quanto aos teores de aminoácidos livres individuais ao longo de sua maturação por 120 dias (NIRO et al., 2017). No primeiro tempo analisado não foram encontrados ácido aspártico, asparagina, glutamina, tirosina, metionina, tirosina e histidina e o teor total de

aminoácidos livres foi 22,8 mg/100 g, chegando a 89,0 mg/100 g no final da maturação, com prevalência de leucina, ornitina, ácido gama-aminobutírico – GABA e fenilalanina.

3.2.4 Perfil de textura

As propriedades de textura do queijo Mussarela ao longo da estocagem foram avaliadas pela Análise de Perfil de Textura (Tabela III.4). Gomosidade e mastigabilidade foram os parâmetros que sofreram alteração ao longo do tempo, diminuindo significativamente e voltando a aumentar no último tempo analisado. Ambos parâmetros estão relacionados com a capacidade de fragmentar o alimento a ponto de engoli-lo, e obtiveram correlação de Pearson alta (maiores que 0,8) e significativa ($P < 0,05$) com proteína total – correlação positiva; e índices de proteólise extensão e profundidade – correlações negativas. Dessa forma, a Mussarela foi ficando mais fácil de ser triturada durante a mastigação a medida que a proteólise aumentou com o tempo. Queijos Mussarela com teor reduzido de umidade e gordura tiveram proteólise e textura avaliados com o tempo de estocagem e também obtiveram altas correlações negativas entre os índices de proteólise e parâmetros de textura (IMM et al., 2003).

Tabela III.4. Parâmetros de textura de queijo Mussarela durante a estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C por 85 dias

Textura	Parâmetros por tempo de estocagem (dias)					
	15	29	43	57	71	85
Dureza (N) (primeira “mordida”)	43,0±4,6 ^a	41,5±7,3 ^a	36,7±5,8 ^a	34,4±9,4 ^a	30,4±8,6 ^a	37,4±3,4 ^a
Dureza (N) (segunda “mordida”)	39,1±5,2 ^a	36,5±6,9 ^a	32,3±3,7 ^a	28,5±5,9 ^a	25,6±4,6 ^a	33,0±2,8 ^a
Gomosidade (N)	32,1±5,2 ^a	27,1±6,6 ^{ab}	24,3±2,3 ^{ab}	20,4±3,9 ^b	18,3±1,6 ^b	25,8±3,7 ^{ab}
Mastigabilidade (J)	0,21±0,04 ^a	0,16±0,05 ^{ab}	0,15±0,02 ^{ab}	0,13±0,02 ^b	0,11±0,01 ^b	0,14±0,02 ^{ab}
Coesividade	0,74±0,04 ^a	0,65±0,05 ^a	0,67±0,05 ^a	0,61±0,11 ^a	0,62±0,11 ^a	0,59±0,14 ^a
Elasticidade (mm)	6,51±0,17 ^a	5,98±0,38 ^a	6,12±0,24 ^a	6,18±0,22 ^a	6,19±0,19 ^a	6,17±0,25 ^a
Índice de elasticidade	0,82±0,02 ^a	0,75±0,05 ^a	0,77±0,03 ^a	0,78±0,03 ^a	0,78±0,02 ^a	0,77±0,03 ^a
Adesividade (mJ)	0,94±0,52 ^a	1,85±0,33 ^a	1,31±0,76 ^a	1,36±0,94 ^a	1,12±0,97 ^a	1,46±0,76 ^a

Valores médios ± desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma linha com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, $P > 0,05$).

3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis

A contagem total de bactérias lácticas (BAL) e de mesófilos aeróbios viáveis (MAV) foi realizada durante a maturação dos queijos Mussarela (Tabela III.5) e foi observado que não houve alteração com o tempo do log de unidades formadoras de colônia por grama de queijo (UFC/g) para os dois grupos analisados ($P>0,05$). Queijos Mussarela de baixa umidade também não apresentaram crescimento significativo de bactérias lácticas ao longo da estocagem refrigerada por 27 dias, embora a contagem tenha sido menor do que a que apresentada no presente trabalho, estando entre 3 e 3,5 UFC/g (AYYASH & SHAH, 2011), possivelmente pela diferença de umidade entre os queijos. As bactérias lácticas são o principal grupo de microrganismos encontrados em queijos Mussarela tradicionais (de leite cru) ou industriais, por serem importantes na fermentação da lactose com consequente acidificação necessária à etapa de filagem, característica dessa categoria de queijos (COPPOLA et al., 2001).

As médias globais para bactérias lácticas e mesófilos aeróbios viáveis foram respectivamente 7,62 e 6,11 log UFC/g, significativamente diferentes entre si ($P<0,05$). Esse comportamento foi observado em outro trabalho conduzido em Mussarela de leite de búfala (SILVA, 2010) e pode ser explicado pelo fato do fermento adicionado ser termofílico e, portanto, não apresentar crescimento adequado no método aplicado à quantificação de microrganismos mesófilos.

Tabela III.5. Contagem média (log UFC/g \pm desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Mussarela durante a estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C por 85 dias

Dias de estocagem	Contagem de microrganismos (log UFC/g \pm desvio padrão)	
	BAL	MAV
15	8,38 \pm 1,53 ^a	5,18 \pm 1,24 ^a
29	7,63 \pm 0,79 ^a	6,07 \pm 1,17 ^a
43	7,96 \pm 0,48 ^a	6,66 \pm 0,33 ^a
57	6,71 \pm 0,87 ^a	6,27 \pm 0,37 ^a
71	7,57 \pm 0,68 ^a	6,90 \pm 1,27 ^a
85	7,47 \pm 0,98 ^a	5,59 \pm 1,21 ^a

BAL – bactérias lácticas; MAV – mesófilos aeróbios viáveis.

Valores médios \pm desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, $P>0,05$).

3.2.6 Análise multivariada

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) resultou em três grupos de análises agrupados por similaridade (Figura III.6). Um grupo incluiu todos os parâmetros de proteólise e mesófilos aeróbios, enquanto todos os parâmetros de textura (com exceção de adesividade que formou um “grupo” isolado), bactérias lácticas e pH formaram outro grupo. Este grupamento sugere que as bactérias mesofílicas presentes nos queijos Mussarela, não *starter* (NSLAB) são aquelas mais relacionadas à proteólise do queijo enquanto o fermento constituído de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* interferiu no pH e conseqüentemente na textura dos queijos estudados. Dessa forma, embora a proteólise seja tradicionalmente ligada às propriedades funcionais da Mussarela, que por sua vez são quantificadas por parâmetros de textura (OOMMEN et al., 2002), no presente trabalho os resultados sugerem que a textura dos queijos está mais relacionada ao pH, que interfere no equilíbrio de cálcio do complexo micelar caseínico e, conseqüentemente, na textura dos produtos finais (JOSHI et al., 2004).

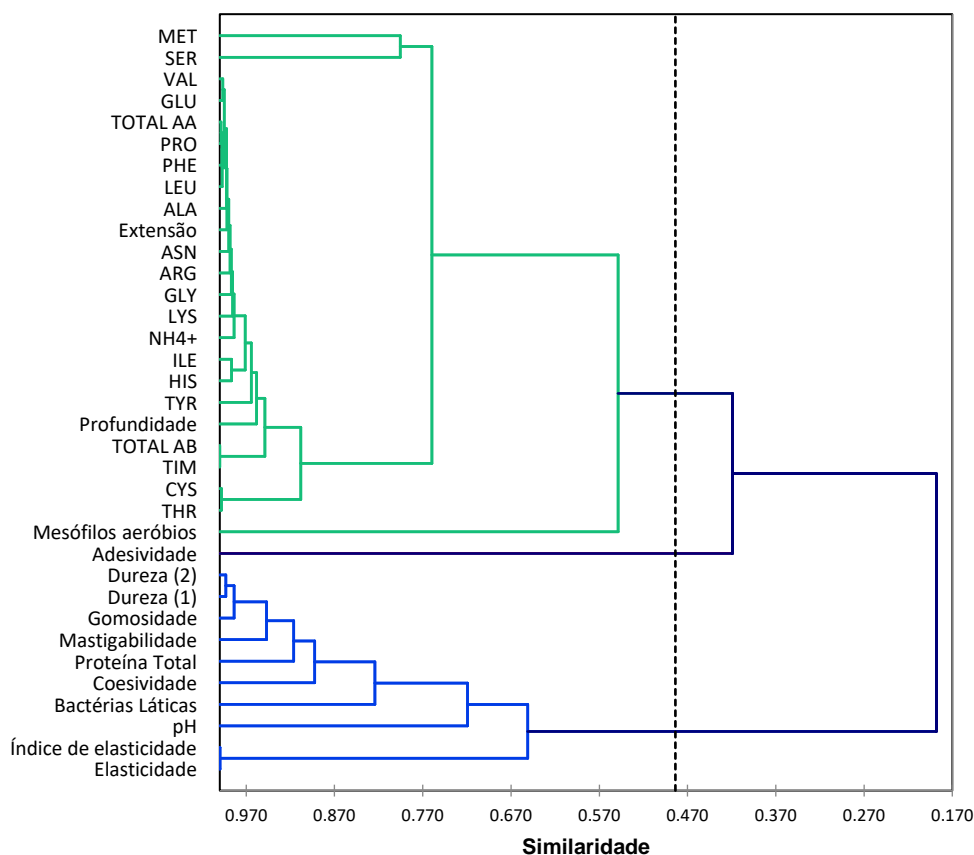


Figura III.6. Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a estocagem refrigerada entre 2 e 4 °C por 85 dias de queijo Mussarela.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada nos resultados físico-químicos, bioquímicos, microbiológicos e de textura dos queijos Mussarela (Figuras III.7.A e III.7.B). Os primeiros dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 83,6% da variância total, sendo que o PC1 foi responsável por 71,9% e o PC2 por 11,7%. Os tempos de maturação ficaram divididos em grupos que, com o auxílio da análise multivariada HCA aplicada às observações (Figura III.7.C), foram reunidos por similaridade em três conjuntos: o primeiro tempo – 15 dias após a fabricação dos queijos; 29 dias; e o terceiro grupo com os tempos finais de estocagem. Este agrupamento respeitou a cronologia do tempo de estocagem, evidenciando a diferenciação do queijo Mussarela em sua composição ao longo do tempo.

O componente principal PC1 apresentou correlações positivas maiores que 0,8 com quase todos os aminoácidos livres individualmente e somados, além dos índices de proteólise, e correlações negativas igualmente altas com alguns parâmetros de textura. O componente principal PC2 no gráfico de *loading* do PCA (Figura III.7.B), separou o primeiro e o último tempo de estocagem dos demais. PC2 teve suas maiores correlações com metionina (-0,649), gomosidade (-0,559), mastigabilidade (-0,429), elasticidade (-0,671), índice de elasticidade (-0,662) e mesófilos aeróbios viáveis (0,805). Gomosidade e mastigabilidade apresentaram aumento significativo no último tempo de análise, comparado a valores iniciais, enquanto a contagem de mesófilos aeróbios, embora não significativamente, apresentou comportamento inverso, diminuindo no final.

Apesar de PC2 ter sido influenciado por mudanças ocorridas no final de estocagem, concernente a parâmetros de textura e microbiológicos, PC1 foi influenciada pelo comportamento global de aumento de proteólise e sua influência na textura do queijo, representando a maior parte da variação nas observações relacionadas ao queijo Mussarela.

4. Conclusão

O queijo Mussarela apresentou alterações durante o tempo de estocagem refrigerada quanto à proteólise e ao perfil de aminoácidos livres, aminas bioativas e textura. Apenas tiramina foi encontrada entre as aminas bioativas pesquisadas, no final do tempo de estocagem avaliado e em níveis seguros para o consumo para indivíduos saudáveis, enquanto entre os aminoácidos livres foram prevalentes o ácido glutâmico, arginina, lisina, leucina e fenilalanina. Destes, o primeiro possui reconhecido gosto umami, enquanto os últimos três são considerados amargos.

Juntos aos demais aminoácidos livres, participam da reação de Maillard, que é importante na caracterização de queijos Mussarela, em sua propriedade funcional de escurecimento, quando aquecida nas preparações alimentares.

A TPA dos queijos Mussarela apresentou gomosidade e mastigabilidade, parâmetros relacionados à capacidade de fragmentar o alimento a ponto de engoli-lo, diminuindo até o penúltimo tempo avaliado, e as correlações altas e positivas com a proteólise do queijo sugerem uma relação, com possível alteração nas características funcionais da Mussarela relativas a maciez e fatiabilidade.

As contagens de bactérias lácticas e mesófilos aeróbios viáveis foram determinantes na Análise Multivariada. Tanto PCA quanto HCA foram úteis na interpretação das mudanças observadas nos queijos durante sua estocagem, visto que foi possível evidenciar que as bactérias lácticas foram importantes nas alterações relacionadas à textura, enquanto os mesófilos aeróbios na proteólise dos queijos, evento mais importante e mais correlacionado ao componente principal mais expressivo obtido na PCA dos queijos Mussarela. Indicadores relacionados à proteólise, extensão, profundidade e aminoácidos livres (individuais e teor total) são, portanto, relevantes indicadores do tempo de estocagem de Mussarela.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO PRATO

1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do tempo de maturação no perfil de aminas bioativas livres, aminoácidos livres, proteólise, pH, perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis em queijo Prato, bem como verificar a existência de correlações que expliquem alterações, caracterizando o queijo ao longo de sua maturação.

2. Material e Métodos

2.1 Produção dos queijos Prato

Queijos Prato foram fabricados em três repetições no Núcleo Industrial do Instituto de Laticínios Cândido Tostes - ILCT da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, em Juiz de Fora, MG, conforme descrito em Dutra e Munck (2002). O leite utilizado nas fabricações foi captado na região de Juiz de Fora entre abril e maio de 2016 e atendeu às especificações de qualidade exigidas na legislação (BRASIL, 2011).

O leite foi padronizado em relação ao teor de gordura para 3,5%, pasteurizado (75 °C/15 s), resfriado a 30 – 31 °C e adicionado de cloreto de cálcio (0,02%), corante urucum (solução comercial), fermento láctico mesofílico tipo “O” (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) e coagulante em quantidades recomendadas pelos fabricantes. O fermento e o coagulante Chy-max[®], foram fornecidos pela Chr. Hansen (Hørsholm, Dinamarca).

Após aproximadamente 45 minutos de repouso, a coalhada foi cortada lentamente em cubos de 0,5 cm de aresta. Foi feito repouso de 3 minutos, seguido de agitação lenta por 20 minutos. Procedeu-se à dessoragem com retirada de 40% de soro. A segunda agitação foi rápida e acompanhada de um aquecimento lento da massa com água quente a 80 °C até a massa atingir a temperatura de 42 °C. O “ponto da massa” ocorreu quando os grãos ficaram firmes, aproximadamente 80 minutos após o corte da coalhada.

Depois de obtido o ponto, a massa foi completamente dessorada e pré-prensada no próprio tanque por 15 minutos. A massa foi enformada em formas retangulares com dessoradores e os queijos foram então prensados por 30 minutos com pressão de 15 kg, virados e permaneceram por mais 12 horas na prensa (*overnight*).

Após a prensagem, os dessoradores foram retirados e procedeu-se uma terceira prensagem em que os queijos foram mantidos por 40 minutos com pressão de 20 kg. A salga foi realizada em salmoura a 10 – 12 °C com 20% de sal por 24 horas e, em seguida, os queijos foram encaminhados à câmara fria (10 – 12 °C) por mais 24 horas. Após a secagem, os queijos foram embalados em embalagem plástica termoencolhível e deixados em câmaras frias por mais 8 dias à temperatura de 12 °C para maturação, quando então foram enviados para câmara fria, à temperatura de 2 a 4 °C.

Periodicamente, aos 8, 15, 22, 29, 35 e 42 dias de fabricação, foram colhidas amostras e analisadas em duplicata. No primeiro dia (8 dias após a fabricação) foram analisadas amostras para aminoácidos livres, aminas bioativas, teor total de sólidos, gordura em extrato seco, cloretos, atividade da água, pH, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 ($NS_{pH4,6}$), nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% ($NS_{TCA12\%}$), perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis. Durante a maturação, foram determinados aminoácidos livres, aminas bioativas, NT, $NS_{pH4,6}$, $NS_{TCA12\%}$, perfil de textura, pH, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis.

2.2 Reagentes

Os reagentes para análises físico-químicas, bioquímicas (aminas e aminoácidos) e microbiológicas foram os mesmos citados no Capítulo II.

2.3 Análises físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas

Os métodos utilizados para análises físico-químicas, bioquímicas (aminas e aminoácidos) e microbiológicas foram os mesmos descritos no Capítulo II.

2.4 Perfil de textura

A análise do perfil de textura (TPA) das amostras de queijos foi conduzida segundo Sobral et al. (2016), usando texturômetro CT3 Brookfield (Middleboro, MA, EUA).

Velocidades de pré-teste, teste e pós teste foi de 1 mm/s, com distância de compressão de 40% a partir da parte superior da amostra. Foi utilizada sonda cilíndrica (TA 4/1000) de 38,1 mm de diâmetro, célula de carga de 4,5 kg e *trigger point* de 0,05 N. Amostras cilíndricas (2 cm de largura, 2,5 cm de profundidade) foram aleatoriamente coletadas em 6 partes do queijo para cada determinação. Os parâmetros de textura analisados foram os mesmos descritos no Capítulo II.

2.5 Análises estatísticas

O delineamento do experimento, bem como as técnicas estatísticas e tratamento dos dados aplicados foram semelhantes aos descritos no Capítulo II.

3. Resultados e Discussão

3.1 Características do queijo Prato aos 8 dias de maturação

As características físico-químicas do queijo Prato aos 8 dias após sua fabricação estão descritas na Tabela IV.1. Os valores obtidos para GES (46,0%) e umidade (45,8%) estão de acordo com o RTIQ de queijos Prato (BRASIL, 1997a), tendo sido classificado como queijo gordo e de média umidade (BRASIL, 1996). Além disso, o queijo Prato apresentou pH de 5,2, proteína total de 22,96%, extensão e profundidade abaixo de 6%, cloreto de sódio 1,97% e atividade de água 0,95, valores semelhantes a encontrados na literatura (Tabela IV.1).

Tabela IV.1. Composição média de queijos Prato aos 8 dias após sua fabricação

Parâmetros (unidades)	Valores (médias \pm DP) *
pH	5,20 \pm 0,18
Proteína total (% m/m)	22,96 \pm 0,49
Índice de Extensão (%)	5,56 \pm 1,82
Índice de Profundidade (%)	2,91 \pm 0,39
Cloreto de sódio (% m/m)	1,97 \pm 0,12
Atividade de água	0,95 \pm 0,01
GES (%)	46,00 \pm 2,41
Umidade (%m/m)	45,80 \pm 1,24
Sal na umidade (%)	4,08 \pm 0,42

* DP = desvio padrão. n=3 repetições.

Sobral et al. (2014) avaliaram queijo Prato esférico e obtiveram, para o tratamento controle, umidade de 45,67% m/m, GES 57,06%, pH 5,46, proteína bruta 19,42% m/m e atividade de água 0,98. Spadoti et al. (2003) avaliaram queijos Prato produzidos a partir de leite ultrafiltrado e para seu tratamento controle o pH foi 5,37, umidade 48,23% m/m, GES 48,78%, proteína total 18,42% m/m, sal 1,60% m/m e sal na umidade 3,22%. Valores aproximados foram encontrados em estudo similar (realizado com leite ultrafiltrado na fabricação dos queijos) para o queijo Prato controle com 10 dias de fabricação: pH 5,41, umidade 48,4% m/m, GES 48,3%, proteína total 18,16% m/m, sal 1,63% m/m e sal na umidade 3,27% (NARIMATSU et al., 2003). Sánchez (2000) encontrou atividade de água de 0,956 para queijo prato com 7 dias de fabricação. Alves et al. (2013) avaliaram parâmetros físico-químicos e de textura em queijos Prato feitos em escala piloto com diferentes coagulantes. Para seu grupo controle, após 5 dias de fabricação, os queijos apresentaram pH de 5,13, umidade de 44% m/m, GES 49,67%, proteína total 22,97% m/m, sal 1,93%, sal na umidade 4,38%. O queijo Prato é um produto de tecnologia bem estabelecida, por ser produzido em larga escala devido ao alto consumo no País, o que está de acordo com o fato dos dados encontrados em diversos trabalhos apresentarem similaridade.

Os perfis de aminas bioativas e aminoácidos livres para o queijo Prato estão demonstrados na Tabela IV.2. No primeiro tempo analisado o ácido glutâmico, asparagina, leucina, lisina, prolina, serina, valina e o íon amônio foram quantificados em baixos níveis e o total de aminoácidos livres chegou a 39,5 mg/100 g. Ácido glutâmico foi o aminoácido prevalente neste estágio de maturação e a valina foi o aminoácido encontrado em menor quantidade, 2,4 mg/100 g. Aos 8 dias após a fabricação dos queijos Prato nenhuma amina foi detectada, o que é esperado visto que estas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos (aminas biogênicas) e, não havendo aminoácidos livres em grande quantidade, sua formação não é observada nos períodos iniciais de maturação do queijo Prato.

Não foi encontrado na literatura dados sobre a quantificação de aminoácidos livres em vários estágios de maturação em queijo Prato industrial, porém Gorostiza et al. (2004) avaliaram estes parâmetros em queijo Prato artesanal (feito a partir de leite cru) e encontraram 21 aminoácidos livres em 7 dias de maturação enquanto 8 aminoácidos livres foram encontrados aos 8 dias de maturação do queijo Prato no presente trabalho. Os teores individuais e total de aminoácidos livres em queijo Prato feito a partir de leite cru também foram maiores que os encontrados para o queijo feito a partir de leite pasteurizado no início da maturação. Gorostiza et al. (2004) obtiveram teores totais de

aminoácidos livres de 415 mg por 100 g de sólidos totais enquanto o queijo fabricado no presente estudo continha 72,9 mg por 100 g de sólidos totais do queijo.

Tabela IV.2. Aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias

Teores de aminas bioativas e aminoácidos (mg/100 g) durante maturação (dias)						
	8	15	22	29	35	42
Íon amônio	2,1±0,7	2,8±1,4	3,5±1,5	3,6±1,9	4,2±1,9	5,3±1,2
Aminoácidos						
Ácido glutâmico	13,4±3,1	10,9±5,7	10,2±6,6	11,1±8,2	12,9±8,9	16,2±10,1
Alanina	nd	2,0±0,3	2,7±0,4	2,7±0,7	3,2±1,1	3,9±0,8
Asparagina	2,8±0,4	3,1±0,5	3,3±0,4	3,4±0,5	3,2±0,5	3,6±0,9
Fenilalanina	nd	4,9±1,9	5,9±1,8	7,5±3,0	8,4±2,0	11,5±2,3
Leucina	4,1±0,9	6,3±1,9	7,8±1,7	8,8±2,4	10,1±2,2	13,5±3,2
Lisina	4,2±1,4	4,6±2,2	4,2±2,6	4,4±0,6	5,5±2,7	6,1±2,2
Prolina	5,7±0,4	6,3±0,3	6,5±0,6	6,5±0,2	6,3±1,0	7,1±0,8
Serina	4,8±0,5	6,5±1,2	5,5±0,9	5,5±1,6	5,7±1,4	4,7±1,6
Treonina	nd	2,5±0,3	2,9±0,4	3,2±0,2	3,6±0,8	4,7±1,5
Valina	2,4±0,2	3,0±1,4	3,5±1,4	4,1±1,6	4,7±2,2	5,9±2,8
Aminas						
Cadaverina	nd	nd	2,8±2,1	3,6±3,2	4,6±3,0	5,3±2,9
Tiramina	nd	nd	nd	nd	nd	3,3±0,1
Total						
Aminoácidos livres	39,5±4,0 ^c	52,9±12,8 ^{bc}	56,0±13,7 ^{bc}	60,9±15,0 ^{abc}	67,8±18,3 ^{ab}	82,4±15,3 ^a
Aminas bioativas	nd	nd	2,8±2,1 ^b	3,6±3,2 ^{ab}	4,6±3,0 ^{ab}	8,6±2,9 ^a

Médias ± desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes em cada linha são significativamente diferentes (Teste de Fisher, P<0,05). nd=não detectado

3.2 Alterações ocorridas durante a maturação do queijo Prato

3.2.1 pH e proteína total

O queijo Prato apresentou pH constante durante sua maturação, com média de 5,08 (Tabela IV.3). Na literatura, diversos valores de pH de queijo Prato ao longo da maturação foram encontrados, de uma forma geral maiores que os valores encontrados no presente trabalho. O pH do queijo Prato light sem adição de cultura adjunta aos 5 dias de fabricação foi 5,36 (BARROS et al., 2006). Em outros trabalhos, o queijo Prato maturado por 60 dias teve variação de pH entre 5,22 e 5,36 (ANTUNES & COSTA, 1995) e entre 5,52 e 5,85 (RAPACCI et al., 1996). Queijos Prato de diferentes Estados

brasileiros foram maturados por 5 semanas (MORENO et al., 2002). O queijo Prato fabricado em São Paulo obteve na primeira semana o menor valor de pH encontrado, 5,34, enquanto o queijo de Goiás, na quarta semana de maturação, apresentou o maior valor de pH – 5,76. Alves et al. (2013) avaliaram pH de queijo Prato aos 5 dias de maturação e o valor encontrado foi de 5,13; mais próximo ao encontrado nesse trabalho. A variação do pH ao longo da maturação depende do tipo de microbiota presente, sendo que os queijos processados com espécies que utilizam lentamente a lactose apresentam uma elevação mais rápida do pH, enquanto que uma diminuição do pH pode estar relacionada com o número elevado de bactérias NSLAB detectadas nesses queijos (MORENO et al., 2002).

Tabela IV.3. Médias de pH e proteína total para o queijo Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias

Tempo de armazenamento (dias)	Valores *	
	pH	Proteína (% m/m)
8	5,20±0,18 ^a	22,96±0,49 ^a
15	5,02±0,18 ^a	22,73±0,18 ^a
22	5,02±0,09 ^a	22,58±1,38 ^a
29	5,00±0,10 ^a	19,95±0,60 ^b
35	5,08±0,13 ^a	18,59±1,00 ^b
42	5,14±0,04 ^a	20,22±0,77 ^b

* Valores médios ± desvio padrão na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, P>0,05).

A proteína total do queijo Prato apresentou diminuição entre os primeiros três tempos de maturação mensurados e os três tempos finais (Tabela IV.3), com regressão significativa (Figura IV.1). Alves et al. (2013) quantificaram a proteína total de queijo Prato aos 5 dias de maturação e o valor encontrado foi de 22,97%, similar ao encontrado nesse trabalho. Queijos Prato maturados obtiveram variação para o conteúdo de proteína total de 21,7% (queijo do Estado de Santa Catarina, na segunda semana de maturação) a 23,7% (queijo do Estado de Minas Gerais, na quinta semana de maturação). Queijo Prato com adição de cultura produtora de exopolissacarídeo apresentou 22,2% de proteína total aos 2 dias de maturação (NEPOMUCENO et al., 2016). Os dados apresentados mostraram que o teor de proteína total em queijo Prato apresenta similaridade em diversos estudos realizados e apresenta robustez frente a diversos fatores de diferenciação do queijo aplicados, inclusive tempo de maturação.

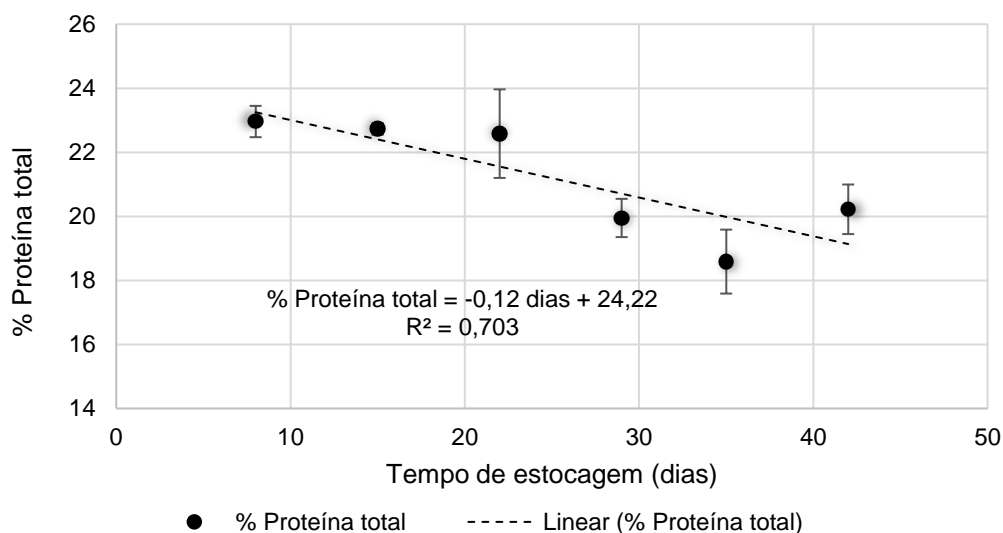


Figura IV.1. Regressão linear para a porcentagem de proteína total do queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.

3.2.2 Índices de proteólise

A proteólise aumentou durante a maturação do queijo Prato, fato expresso nos índices de extensão e profundidade (Tabela IV.4), porém a extensão da proteólise apresentou maior variação que a profundidade durante o período analisado, visto que os coeficientes angulares foram bem distintos entre si (Figura IV.2). Sendo o queijo Prato um queijo de massa cozida, a plasmina pode ter uma forte influência na proteólise deste queijo, pois a plasmina resiste a altas temperaturas, concomitante com a ativação do plasminogênio devido à inativação térmica dos inibidores dos ativadores de plasminogênio, precursor da plasmina (McSWEENEY, 2004). A plasmina é uma protease que hidrolisa diretamente as frações da caseína, interferindo diretamente no $NS_{pH4,6}$, e portanto, no índice de extensão (IVENS et al., 2017).

Tabela IV.4. Médias de extensão e profundidade de proteólise para o queijo Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias

Tempo de armazenamento (dias)	Proteólise *	
	Extensão (%)	Profundidade (%)
8	5,56±1,82 ^b	2,91±0,39 ^b
15	6,28±1,2 ^b	4,28±0,97 ^{ab}
22	8,93±2,82 ^b	6,39±2,36 ^a
29	8,57±2,18 ^b	6,54±1,57 ^a
35	7,54±2,45 ^b	4,86±1,69 ^{ab}
42	13,22±1,22 ^a	6,71±0,71 ^a

* Valores médios ± desvio padrão na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Fisher, $P > 0,05$).

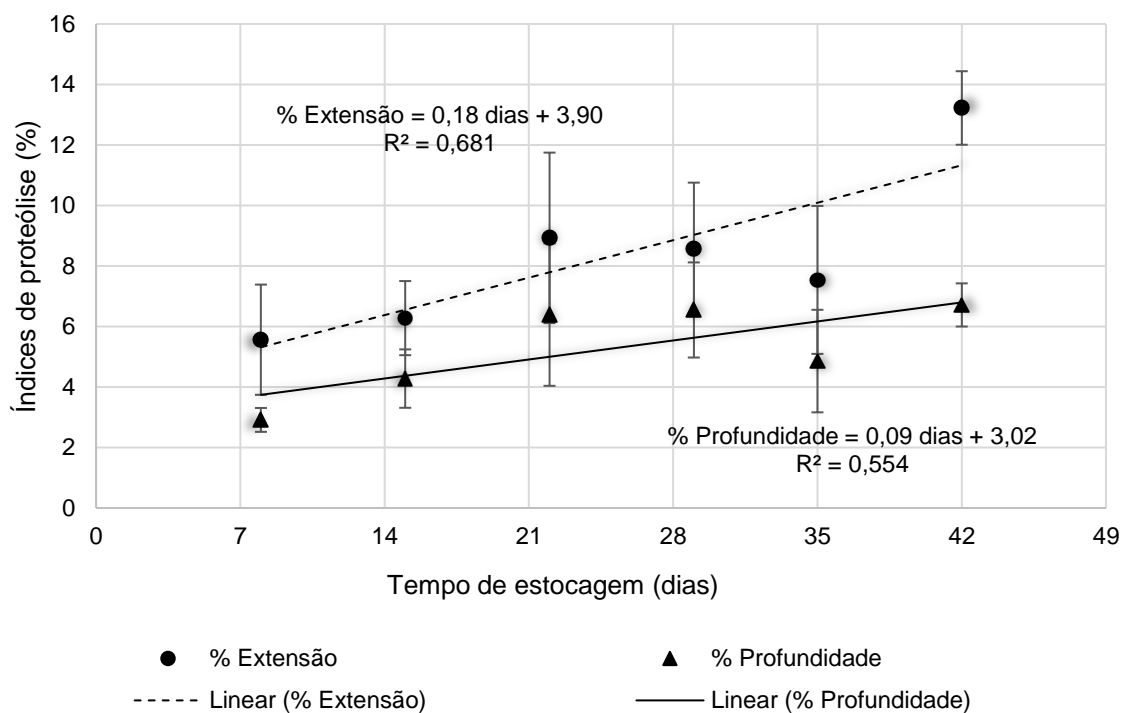


Figura IV.2. Regressão linear para os índices de extensão e profundidade da proteólise do queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.

Barros et al. (2006) avaliaram a proteólise de queijos Prato light e a profundidade variou de 2% a aproximadamente 5,5% entre 2 e 45 dias de maturação. Já a extensão apresentou valores pouco abaixo de 5% aos 5 dias de fabricação, entre 5 e 10% aos 25 dias e acima de 10% aos 45 dias. Narimatsu et al. e (2003) Alves et al. (2013) avaliaram queijos Prato durante a maturação e observaram comportamento de proteólise semelhante ao encontrado neste trabalho, de aumento com o tempo de fabricação. Narimatsu et al. (2003) encontraram a extensão da proteólise abaixo de 10% aos 10 dias de fabricação, entre 10 e 15% aos 25 dias e pouco acima de 15% aos 45 dias, enquanto a profundidade foi de 2 a 3%, 3 a 4% e aproximadamente 5%, respectivamente. Queijos Prato com teor reduzido de gordura adquiridos no mercado apresentaram extensão entre 5 e 15% e profundidade entre 3 e 9% aos 30 dias de fabricação (DE RENSIS et al., 2009). Todos esses dados são próximos aos encontrados neste estudo, e corroboram com a conclusão de que a extensão da proteólise é mais pronunciada neste tipo de queijo que a profundidade, fato que caracteriza o queijo quanto ao sabor e textura intrínsecos deste produto.

3.2.3 Aminoácidos livres e aminas bioativas

O queijo Prato apresentou diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre aminoácidos totais para os diferentes tempos de maturação avaliados; também para aminas totais essa diferença foi significativa (Tabela IV.2). O teor máximo encontrado para aminoácidos livres totais foi 82,4 mg/100 g e para aminas bioativas 8,6 mg/100 g, ambos no último tempo de maturação – 42 dias. A regressão para estes dois parâmetros também foi significativa ($P \leq 0,05$) e o coeficiente de determinação foi maior que 0,9 (Figura IV.3).

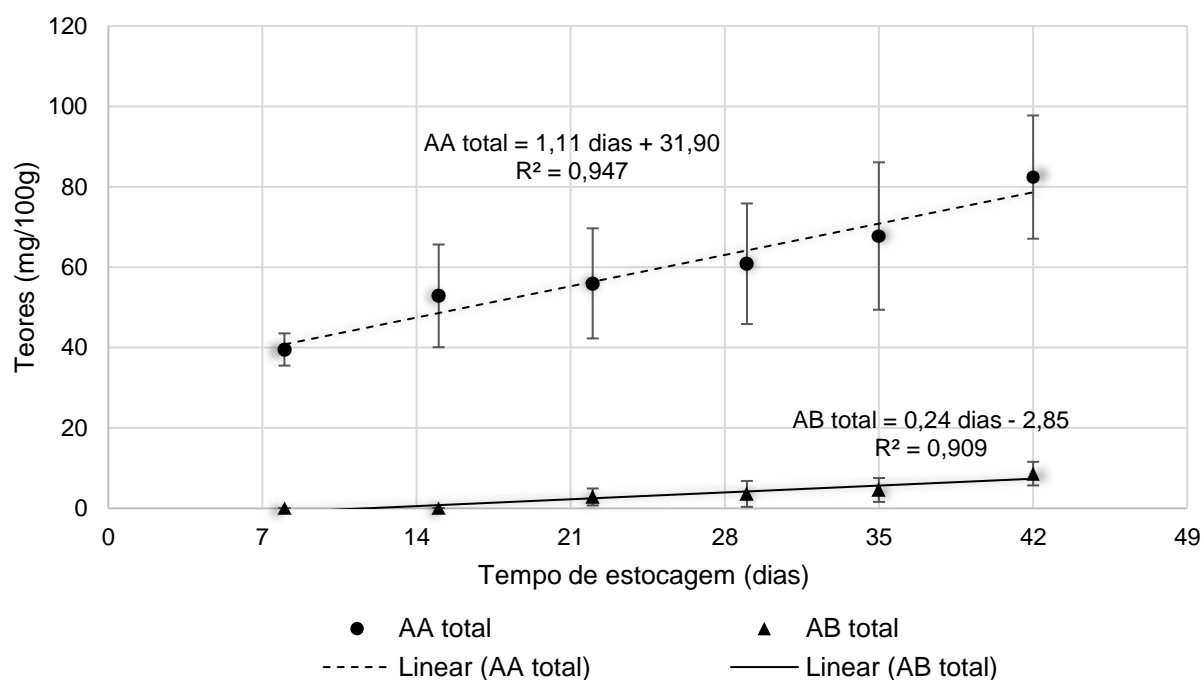


Figura IV.3. Regressão linear para os teores de aminoácidos (AA) livres e aminas bioativas (AB) totais do queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.

Redruello et al. (2013) encontraram teor de aminoácidos livres totais para o queijo Gouda, que é semelhante ao queijo Prato em seus teores de GES e umidade, porém mais maturado, de 6,59 g/100 g, com destaque para a leucina com 893,7 mg/100 g, lisina com 626 mg/100 g e valina com mais de 543 mg/100 g. No presente estudo não foram encontrados ácido aspártico, glicina, glutamina, histidina, arginina, cistina, tirosina, metionina e isoleucina em nenhum tempo de análise do queijo Prato. Os aminoácidos mais abundantes são o ácido glutâmico, leucina e fenilalanina (Figura IV.4). O ácido glutâmico é um importante aminoácido relacionado ao gosto umami e, portanto, possivelmente contribui para as características organolépticas do produto final.

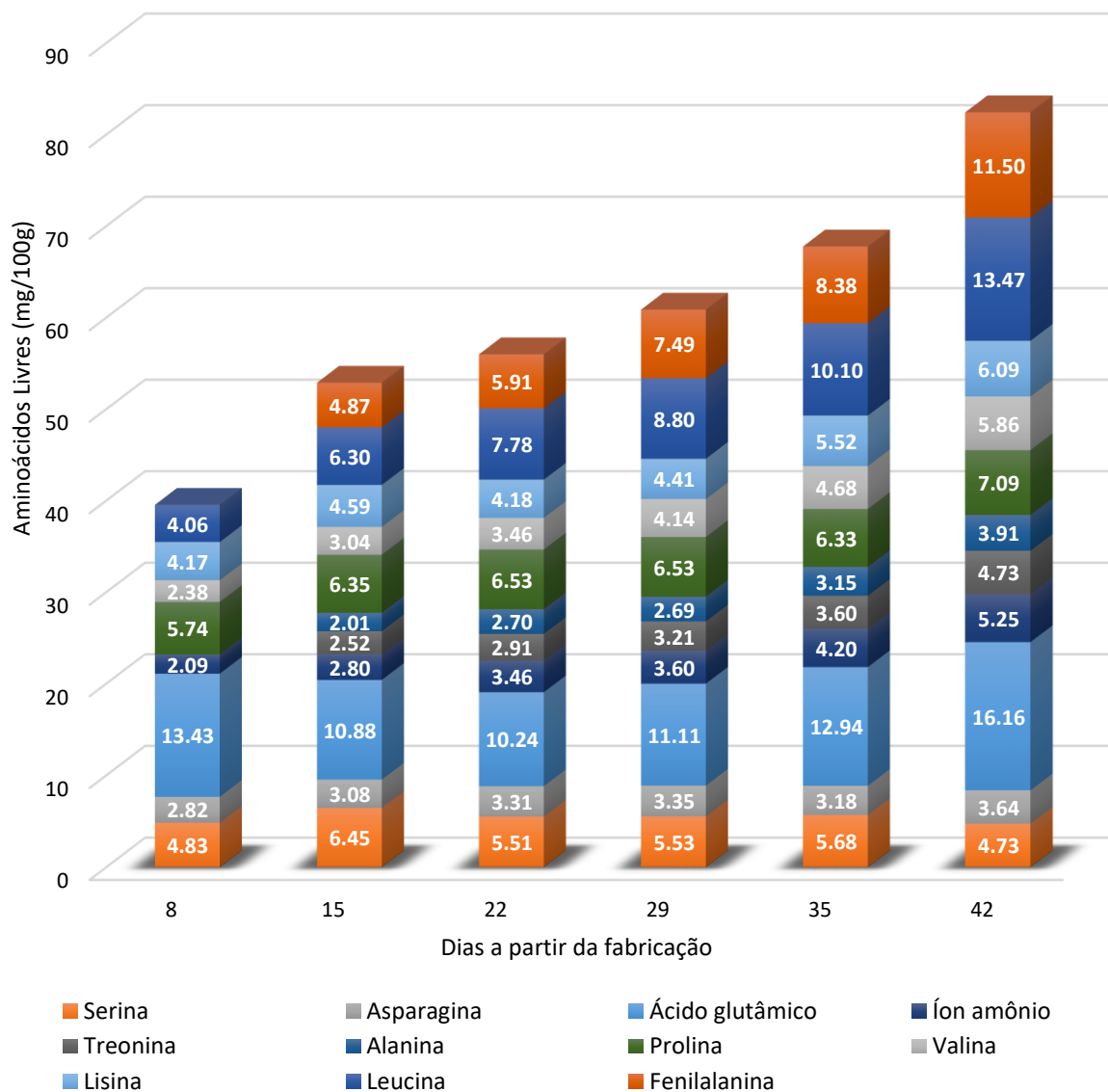


Figura IV.4. Aminoácidos livres em queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.

As únicas aminas presentes no queijo Prato foram cadaverina, a partir de 22 dias de fabricação até o final, e a tiramina, que apareceu somente no último tempo avaliado para este queijo (Figura IV.5). A quantidade de tiramina (3,32 mg/100 g) no queijo Prato é considerado seguro para indivíduos saudáveis que não estejam em tratamento com medicamentos inibidores de MAO, que é de 10 a 80 mg/100 g de queijo para essa amina (EFSA, 2011; BENKERROUM, 2016). A quantidade máxima encontrada de cadaverina, 5,33 mg/100 g, está abaixo do limiar de percepção para seu sabor considerado 19 mg/100 g (GLÓRIA, 2006). Histamina, putrescina e cadaverina foram as principais aminas encontradas em queijos Prato analisados por Vale e Glória (1998), tendo sido encontrados valores tão baixos quanto os relatados para os queijos neste trabalho: 6,15; 3,53; 3,39 mg/100 g respectivamente.

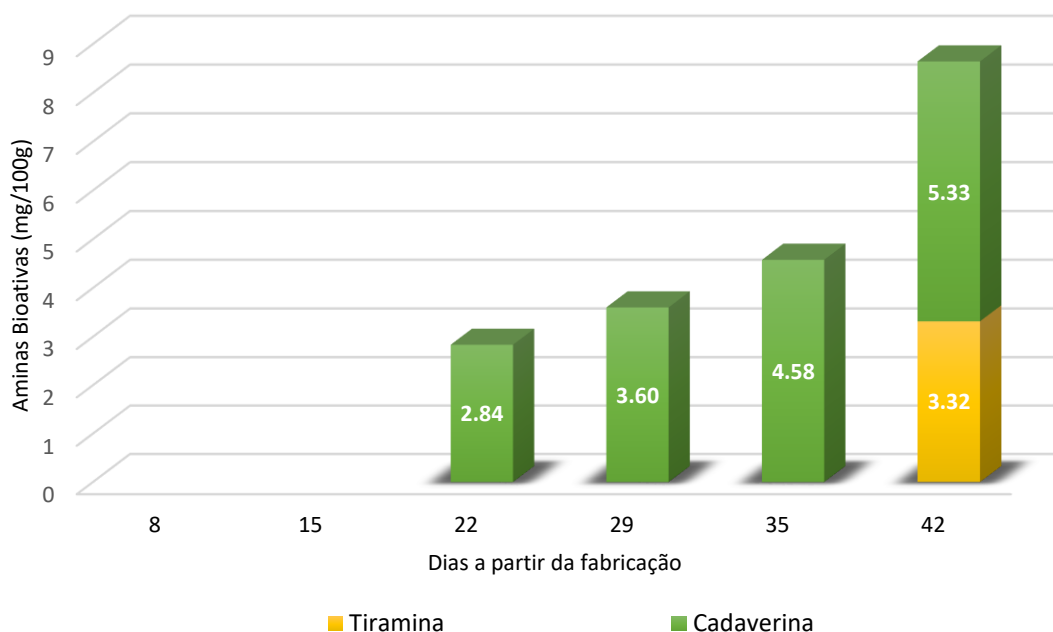


Figura IV.5. Aminas bioativas em queijo Prato durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias.

3.2.4 Perfil de textura

A elasticidade do queijo é a distância recuperada após força aplicada pelo texturômetro durante a primeira compressão; o índice de elasticidade é a razão entre a altura da amostra após descompressão do queijo e a altura original (GUNASEKARAN & AK, 2003). Estes índices sofreram leve variação no queijo Prato durante a maturação, diminuindo ao longo do tempo (Tabela IV.5). Já a adesividade dos queijos mostrou oscilações e diferenças significativas entre as médias, que variaram de 0,10 a 1,82 mJ do primeiro ao último tempo avaliado, mostrando que de forma geral o parâmetro sofreu um aumento durante a maturação (Tabela IV.5). Esse comportamento foi semelhante ao encontrado em queijos Prato produzidos com leite comum e ultrafiltrado (SPADOTI et al., 2005); e queijos Prato produzidos com e sem cultura produtora de exopolissacarídeos (NEPOMUCENO et al., 2016). A proteólise, que leva a um aumento na fluidez da estrutura proteica, ou uma diminuição do pH, podem levar a uma diminuição da elasticidade de queijos (SPADOTI et al., 2005). A adesividade pode ter sofrido alterações que, embora contrárias – o que é esperado pela definição dos parâmetros avaliados – também pode estar relacionada a alterações na proteólise do queijo Prato durante a maturação.

Tabela IV.5. Parâmetros de textura de queijo Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias

Textura	Parâmetros por tempo de maturação					
	8	15	22	29	35	42
Dureza (N) (primeira "mordida")	36,4±8,6 ^a	36,2±7,3 ^a	39,1±5,8 ^a	31,1±7,8 ^a	32,7±9,0 ^a	37,9±9,8 ^a
Dureza (N) (segunda "mordida")	33,0±8,0 ^a	32,6±7,3 ^a	34,0±5,4 ^a	26,4±6,0 ^a	28,1±8,2 ^a	31,7±8,1 ^a
Gomosidade (N)	27,5±6,8 ^a	27,0±7,0 ^a	27,6±5,1 ^a	21,3±4,2 ^a	22,0±7,2 ^a	25,1±6,3 ^a
Mastigabilidade (J)	0,19±0,04 ^a	0,18±0,04 ^a	0,19±0,04 ^a	0,14±0,03 ^a	0,14±0,05 ^a	0,17±0,04 ^a
Coesividade	0,76±0,01 ^a	0,74±0,04 ^a	0,70±0,03 ^a	0,70±0,04 ^a	0,67±0,06 ^a	0,67±0,02 ^a
Elasticidade (mm)	6,96±0,19 ^a	6,69±0,12 ^{ab}	6,70±0,17 ^{ab}	6,69±0,20 ^{ab}	6,31±0,25 ^b	6,59±0,12 ^{ab}
Índice de elasticidade	0,87±0,02 ^a	0,84±0,01 ^{ab}	0,84±0,02 ^{ab}	0,84±0,03 ^{ab}	0,79±0,03 ^b	0,83±0,02 ^{ab}
Adesividade (mJ)	0,10±0,05 ^b	0,62±0,02 ^{ab}	1,16±0,63 ^{ab}	0,41±0,16 ^b	0,88±0,07 ^{ab}	1,82±0,53 ^a

Valores médios ± desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma linha com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, P>0,05).

3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis

Durante a maturação de queijo Prato houve uma diminuição da contagem de mesófilos aeróbios totais enquanto a contagem de bactérias lácticas permaneceu constante (Tabela IV.6).

Tabela IV.6. Contagem média (log UFC/g ± desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Prato durante a maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias

Dias de maturação	Contagem de microrganismos (log UFC/g ± desvio padrão)	
	BAL	MAV
8	9,10±0,13 ^a	8,99±0,30 ^{ab}
15	9,27±0,62 ^a	9,20±0,75 ^a
22	7,92±1,36 ^a	8,25±0,37 ^{ab}
29	8,73±0,10 ^a	8,31±0,11 ^{ab}
35	7,89±1,34 ^a	7,42±0,94 ^b
42	7,81±0,61 ^a	7,51±0,78 ^{ab}

BAL – bactérias lácticas; MAV – mesófilos aeróbios viáveis.

Valores médios ± desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, P>0,05).

Em relação à contagem de MAV, comportamento semelhante foi encontrado em queijos Prato submetidos à salga em salmoura com cloreto de sódio e cloreto de potássio em diferentes proporções; nos quais foi notado também uma diminuição na contagem de *Lactococcus* ao longo da maturação por 60 dias, chegando a menos de 1 log UFC/g para os dois grupos de microrganismos no final da maturação para todos os tratamentos (RAPACCI et al., 1996). Essas bactérias são importantes na produção de enzimas proteolíticas e descarboxilantes, capazes de atuar sobre a estrutura protéica dos queijos produzindo aminoácidos livres e posteriormente aminas bioativas (GLÓRIA, 2006).

3.2.6 Análise multivariada

A análise de grupamento hierárquico realizada para as análises (Figura IV.6) resultou em 4 conjuntos agrupados por similaridade. No primeiro grupo estão coesividade, elasticidade, índice de elasticidade e as contagens microbiológicas; no segundo, mastigabilidade, gomosidade, dureza e proteína total; no terceiro, aminas, aminoácidos, índices de proteólise, adesividade e pH; no quarto, apenas serina.

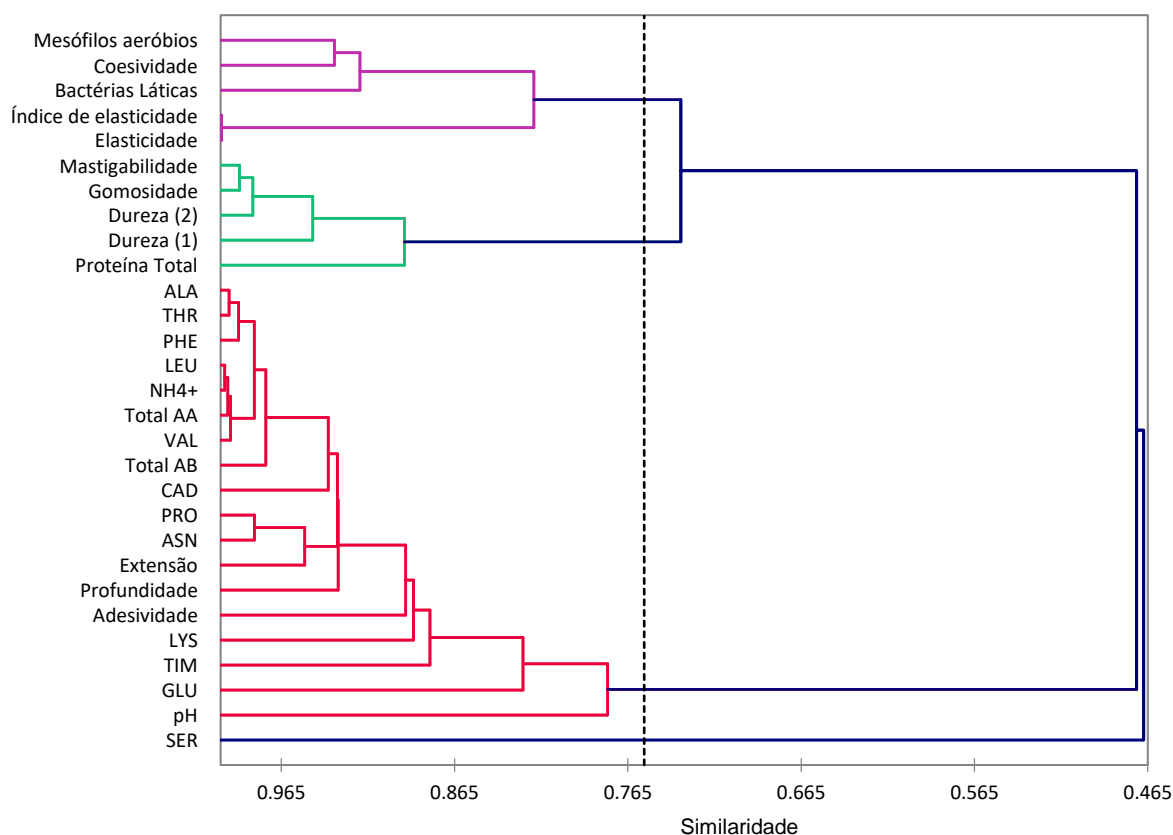


Figura IV.6. Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias de queijo Prato.

Algumas dessas determinações possuem relação entre si, como dureza e proteína total, ou índices de proteólise e aminoácidos livres, o que ficou evidenciado por estarem presentes nos mesmos grupos. A serina não teve correlação significativa com nenhum outro parâmetro, apresentando a menor similaridade com as demais determinações.

No queijo Prato os primeiros dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 81,2% da variância total (Figura IV.7). A análise de componentes principais (Figura IV.7.B) auxiliada pela análise de agrupamento hierárquico (Figura IV.7.C) foi capaz de estratificar os tempos de maturação, sendo que o tempo 1 (8 dias após a fabricação) consistiu em um grupo, os tempos 2 e 3 em outro grupo (15 e 22 dias) e o terceiro grupo foi formado dos tempos 4, 5 e 6 (29, 35 e 42 dias). A primeira e a segunda metade da maturação ficaram em lados distintos no gráfico, divididos por PC1 (Figura IV.7.B). Como demonstrado na Figura IV.7.A, o PC1 contribuiu com 61,59% da variância total e estava correlacionado principalmente com a soma total de aminoácidos livres (0,980), de aminas bioativas (0,958), os aminoácidos treonina, alanina, valina, íon amônio, a amina cadaverina e o parâmetro de textura coesividade ($>0,94$). O PC2 contribuiu com 19,61% e suas correlações maiores foram com proteína total (0,882) e dureza (0,877). A serina foi o parâmetro que teve a maior correlação negativa com PC2, que dividiu os tempos de maturação colocando os três primeiros próximos ao centro e os três últimos nos extremos do gráfico, afastados do centro (Figura IV.7). Pela análise multivariada foi possível notar que parâmetros de textura, aminoácidos e aminas livres foram mais importantes na caracterização da maturação do queijo Prato que os índices de proteólise e contagem de BAL e MAV.

4. Conclusão

O queijo Prato é um produto nacional, com tecnologia difundida em diversos laticínios, porém variabilidade em sua maturação, resultando em características diversas de sabor, aroma e textura, são esperadas devido a diferenças nas condições ambientais, qualidade de matéria prima e insumos de fabricação, e diferenças físicas, químicas e microbiológicas. A cadaverina foi a amina mais abundante, e o ácido glutâmico o aminoácido livre em maior quantidade. Estes compostos têm forte influência sobre o sabor do queijo; o primeiro negativamente, causando *off-flavor*, e o segundo positivamente, por ter relação com o gosto umami. Os índices de proteólise ficaram abaixo de 10% (com exceção da extensão aos 42 dias de maturação) e as mudanças

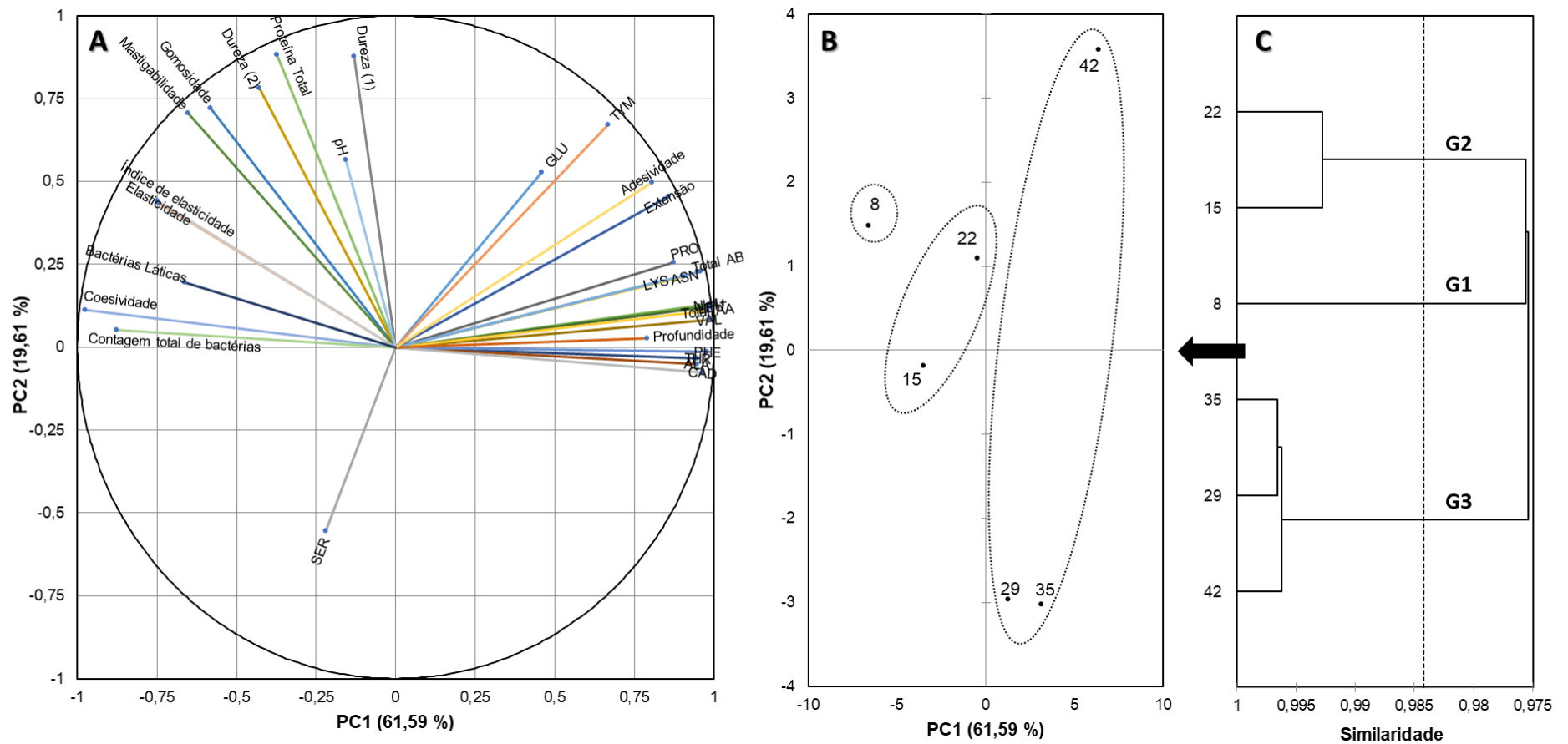


Figura IV.7. Gráficos de *score* (A) e *loading* (B), obtidos pela Análise de Componentes Principais, para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias láticas, mesófilos aeróbios viáveis, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante maturação entre 2 e 4 °C por 42 dias de queijo Prato; (C) Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as observações obtidas em cada tempo de maturação.

na textura foram mensuráveis para a elasticidade, que diminuiu, e a adesividade, que aumentou. As contagens de bactérias lácticas não sofreram alteração, mas as dos mesófilos aeróbios totais sofreram pequena diminuição, porém significativa. A análise multivariada mostrou que o teor de serina foi uma medida singular que não apresentou correlação com as demais, e que os melhores indicadores da maturação de queijo Prato são textura e teores totais de aminoácidos e aminas livres.

CAPÍTULO V

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE MATURAÇÃO NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS, AMINOÁCIDOS LIVRES, TEXTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM QUEIJO PARMESÃO

1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do tempo de maturação no perfil de aminas bioativas livres, aminoácidos livres, proteólise, pH, perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis em queijo Parmesão, bem como verificar a existência de correlações que expliquem alterações, caracterizando o queijo ao longo de sua maturação.

2. Material e Métodos

2.1 Produção dos queijos Parmesão

Queijos Parmesão foram fabricados em três repetições no Núcleo Industrial do Instituto de Laticínios Cândido Tostes - ILCT da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, em Juiz de Fora, MG, conforme descrito em Dutra e Munck (2002). O leite utilizado nas fabricações foi captado na região de Juiz de Fora entre abril e maio de 2016 e atendeu às especificações de qualidade exigidas na legislação (BRASIL, 2011).

O leite foi padronizado em relação ao teor de gordura para 2,5%, pasteurizado (75 °C/15 s), resfriado a 32 - 34 °C e adicionado de cloreto de cálcio (0,02%), fermento termofílico (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*) e nitrato de sódio em quantidades recomendadas pelos fabricantes. Após 30 minutos de pré-maturação foi adicionado o coagulante. O fermento e o coagulante Chy-max®, foram fornecidos pela Chr. Hansen (Hørsholm, Dinamarca).

Após aproximadamente 40 minutos de repouso, a coalhada foi cortada lentamente em cubos de 0,3 cm de aresta. Foi feita a primeira agitação, com agitação lenta por 20 minutos sem aquecimento e em seguida a segunda agitação por 50 minutos com aquecimento lento (1 °C/2-3 min) até 44 °C e aquecimento rápido (1 °C/1min) até 48 °C. O “ponto da massa” ocorreu quando os grãos ficaram firmes e secos.

Depois de obtido o ponto, a massa foi completamente dessorada e pré-prensada por 20 minutos com 2 vezes o peso da massa. A massa foi enformada em formas cilíndricas de 5 kg e os queijos foram prensados com duas viragens, a primeira de 30 minutos e a segunda de 60 minutos. Após essas viragens, os queijos permaneceram por mais 12 horas na prensa (*overnight*). A salga foi realizada em salmoura a 10 - 12 °C com 20% de sal por 5 dias e em seguida os queijos foram encaminhados à câmara fria (10 - 12 °C) para maturação. Aos 29 dias os queijos foram fatiados em cunhas e embalados em plástico termoencolhível.

Periodicamente, aos 29, 63, 90, 119, 153 e 181 dias de fabricação, foram colhidas amostras e analisadas em duplicata. No primeiro dia (29 dias após a fabricação) foram analisadas amostras para aminoácidos livres, aminas bioativas, teor total de sólidos, gordura em extrato seco, cloretos, atividade da água, pH, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 ($NS_{pH4,6}$), nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% ($NS_{TCA12\%}$), perfil de textura, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis. Durante a maturação, foram determinados aminoácidos livres, aminas bioativas, NT, $NS_{pH4,6}$, $NS_{TCA12\%}$, perfil de textura, pH, contagem de bactérias lácticas e contagem de aeróbios mesófilos viáveis.

2.2 Reagentes

Os reagentes para análises físico-químicas, bioquímicas (aminas e aminoácidos) e microbiológicas foram os mesmos citados no Capítulo II.

2.3 Análises físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas

Os métodos utilizados para análises físico-químicas, bioquímicas (aminas e aminoácidos) e microbiológicas foram os mesmos descritos no Capítulo II.

2.4 Perfil de textura

A análise do perfil de textura (TPA) das amostras de queijos foi conduzida conforme Sobral et al. (2016), usando texturômetro CT3 Brookfield (Middleboro, MA, EUA). Velocidade de pré-teste foi 1 mm/s, de teste e pós teste foi de 2 mm/s, com distância de compressão de 40% a partir da parte superior da amostra. Foi utilizada sonda cônica (ATA 2/1000) de 35 mm de altura, 30 mm de diâmetro e ângulo de 60°. célula de carga

de 4,5 kg e *trigger point* de 0,05 N. Amostras cúbicas (2 cm de largura, comprimento e profundidade) foram aleatoriamente coletadas em 6 partes do queijo para cada determinação. Os parâmetros de textura analisados foram os mesmos descritos no Capítulo II.

2.5 Análises estatísticas

O delineamento do experimento, bem como as técnicas estatísticas e tratamento dos dados aplicados foram semelhantes aos descritos no Capítulo II.

3. Resultados e Discussão

3.1 Características do queijo Parmesão aos 29 dias de maturação

As características físico-químicas do queijo Parmesão aos 29 dias após sua fabricação estão descritas na Tabela V.1. Os valores obtidos para GES (46,7%) e umidade (35,8%) estão de acordo com o RTIQ de queijos Parmesão (BRASIL, 1997c), tendo sido classificado como queijo gordo e de baixa umidade (BRASIL, 1996).

Tabela V.1. Composição média de queijos Parmesão aos 29 dias após sua fabricação

Parâmetros (unidades)	Valores (médias \pm DP) *
pH	5,37 \pm 0,06
Proteína total (% m/m)	27,45 \pm 3,38
Índice de Extensão (%)	6,85 \pm 2,45
Índice de Profundidade (%)	2,91 \pm 0,53
Cloreto de sódio (% m/m)	2,28 \pm 0,25
Atividade de água	0,94 \pm 0,01
GES (%)	46,70 \pm 2,32
Umidade (%m/m)	35,76 \pm 1,00
Sal na umidade (%)	5,83 \pm 0,62

* DP = desvio padrão. n=3 repetições.

Barros et al. (2011) obtiveram valores de composição centesimal de queijos Parmesão bem diferentes do apresentado neste estudo; com valores médios (3 lotes de queijos Parmesão) para atividade de água de 0,977; 30,8% de umidade; 40,3% de

gordura no extrato seco, 29,6% de proteína total e 1,02% de sal. A extensão da proteólise aos 30 dias de maturação destes queijos foi 5,69% e a profundidade de proteólise 3,26%. Diferenças no teor de umidade entre os dois trabalhos explicam as diferenças nos teores de proteína e GES, enquanto o teor de sal pode ter sido o que influenciou as discrepâncias nos valores de atividade de água.

Jaster et al. (2014) avaliaram 12 marcas de queijos Parmesão vendidos em mercados no sul do Brasil. O pH das amostras estava entre 5,33 e 5,76; umidade entre 27,5 e 41,5%; atividade de água entre 0,83 e 0,94; proteína total entre 26,7 e 42,3% e GES entre 22,8 e 50,6%. Os resultados deste trabalho se encontram dentro da variação destes queijos, que é muito ampla, seja por falta de padronização de metodologias de fabricação, seja pelo fato dos queijos se encontrarem em diferentes estágios de maturação. Queijos Parmigiano Reggiano com 30 dias de maturação apresentaram umidade de 37,0%, proteína 30,9%, GES 44,0%, sal 1,0%, pH 5,32, profundidade de proteólise 6,7% e extensão de 9,2% (PANARI et al., 2003). Em outro trabalho, queijos Parmigiano Reggiano apresentaram GES médio de 45,3%, evidenciando a importância deste componente para a identidade deste produto (TOSI et al., 2008).

Aos 29 dias de maturação o queijo Parmesão não apresentou nenhuma amina bioativa quantificável e apenas os aminoácidos ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, leucina, lisina, prolina, serina, tirosina e valina foram quantificados, com teor total de 51,5 mg/100 g (Tabela V.2). Queijos duros holandeses também apresentaram baixo teor de aminas bioativas no início de sua maturação, um total de 3,05 mg/100 g (KOMPRDA et al., 2007).

3.2 Mudanças ocorridas durante a estocagem do queijo Parmesão

3.2.1 pH e proteína total

Os teores de proteína total e pH não sofreram variações significativas durante a maturação dos queijos Parmesão (Tabela V.3), tendo médias de $26,3 \pm 0,74\%$ e $5,4 \pm 0,08$ respectivamente. Valores semelhantes de pH foram encontrados para queijos duros, porém os teores de proteína neste trabalho são menores que os encontrados na literatura, que variaram de 26,7 a 42,3% (PANARI et al., 2003; JASTER et al., 2014)

Tabela V.2. Aminoácidos livres e amins bioativas em queijos Parmesão durante maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias

Teores de amins bioativas e aminoácidos (mg/100 g) durante maturação (dias)						
	29	63	90	119	153	181
Íon amônio	2,6±0,8	4,4±1,0	6,8±1,4	13,5±6,2	11,4±2,2	17,7±7,0
Aminoácidos						
Ácido aspártico	nd	9,1±0,0	18,6±0,0	23,7±0,0	43,0±0,0	45,7±0,0
Ácido glutâmico	5,8±4,1	19,5±7,2	36,1±18,7	52,1±22,2	83,5±49,4	100,7±41,0
Alanina	5,6±1,7	9,5±1,9	14,3±3,7	18,5±1,6	23,6±5,4	26,7±1,5
Arginina	5,5±1,6	9,5±6,5	15,8±13,2	22,7±9,2	46,8±14,0	44,1±3,1
Asparagina	2,8±0,0	5,2±3,3	8,7±7,6	10,2±10,5	18,6±19,5	17,9±19,9
Cistina	nd	nd	nd	nd	5,6±0,0	5,7±0,4
Fenilalanina	nd	9,8±1,8	21,1±4,3	31,4±2,3	51,1±5,1	55,8±6,1
Glicina	nd	2,0±0,0	2,9±0,7	3,5±2,3	7,5±5,1	8,4±5,0
Glutamina	nd	nd	nd	4,8±0,0	18,9±0,0	17,4±0,0
Histidina	nd	4,7±0,5	9,3±1,8	13,7±1,8	23,5±7,3	25,9±3,7
Isoleucina	nd	6,4±0,0	8,2±6,4	11,5±8,7	22,0±16,4	25,9±15,3
Leucina	6,2±1,7	18,2±4,9	34,1±11,1	44,8±13,4	72,2±22,8	84,9±14,4
Lisina	6,3±3,6	16,2±6,8	27,6±15,6	36,0±19,4	59,8±34,7	76,1±25,0
Metionina	nd	3,6±1,0	5,8±1,0	7,3±1,2	11,5±1,7	13,2±2,1
Prolina	3,8±1,3	8,1±3,6	14,5±9,3	21,6±9,9	38,7±21,5	46,3±18,0
Serina	4,3±0,6	6,1±2,5	8,6±3,2	13,0±6,3	13,1±1,9	17,5±6,4
Tirosina	4,0±0,0	5,9±0,0	7,6±3,9	9,4±1,1	15,4±7,8	21,4±2,6
Treonina	nd	4,6±0,9	7,2±3,6	11,9±4,0	19,0±8,1	23,9±8,0
Valina	4,7±0,0	10,4±5,3	19,2±12,5	30,5±11,7	52,0±20,7	62,4±17,1
Amins						
Agmatina	nd	nd	nd	nd	2,8±0,0	3,5±0,0
Feniletilamina	nd	nd	nd	nd	4,5±0,0	4,7±2,3
Putrescina	nd	nd	nd	nd	nd	2,1±0,0
Serotonina	nd	4,7±0,2	6,1±2,2	4,7±0,6	5,2±0,9	6,8±3,7
Tiramina	nd	3,8±0,0	4,9±2,7	11,9±7,5	10,6±7,0	11,8±9,5
Triptamina	nd	nd	nd	nd	nd	3,4±0,0
Totais						
Aminoácidos livres	51±15 ^c	153±47 ^c	266±118 ^c	380±131 ^{bc}	637±243 ^{ab}	737±196 ^a
Amins bioativas	nd	8,5±0,2 ^b	11,0±4,9 ^b	16,6±8,1 ^{ab}	23,1±7,9 ^{ab}	32,2±15,5 ^a

Médias ± desvio padrão (n=3) seguidas de letras diferentes em cada linha são significativamente diferentes (Teste de Tukey, P<0,05). nd=não detectado

Tabela V.3. Médias de pH e proteína total para o queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias

Tempo de maturação (dias)	Valores *	
	pH	Proteína (% m/m)
29	5,37±0,06 ^a	27,45±3,38 ^a
63	5,50±0,16 ^a	25,90±2,85 ^a
90	5,41±0,11 ^a	26,68±0,31 ^a
119	5,26±0,17 ^a	25,90±1,36 ^a
153	5,36±0,15 ^a	26,35±0,67 ^a
181	5,30±0,11 ^a	25,30±2,24 ^a

* Valores médios ± desvio padrão na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, P>0,05).

3.2.2 Índices de proteólise

A extensão e a profundidade da proteólise dos queijos Parmesão aumentaram linearmente ao longo da maturação por 6 meses, apresentando coeficientes de correlação das equações lineares estimadas superior a 0,98 para a extensão e 0,97 para a profundidade (Figura V.1). A extensão cresceu mais que a profundidade, visto que os coeficientes angulares apresentaram valores distintos (P<0,05), chegando a 21,6% e 13,5% respectivamente, aos 181 dias de fabricação (Tabela V.4).

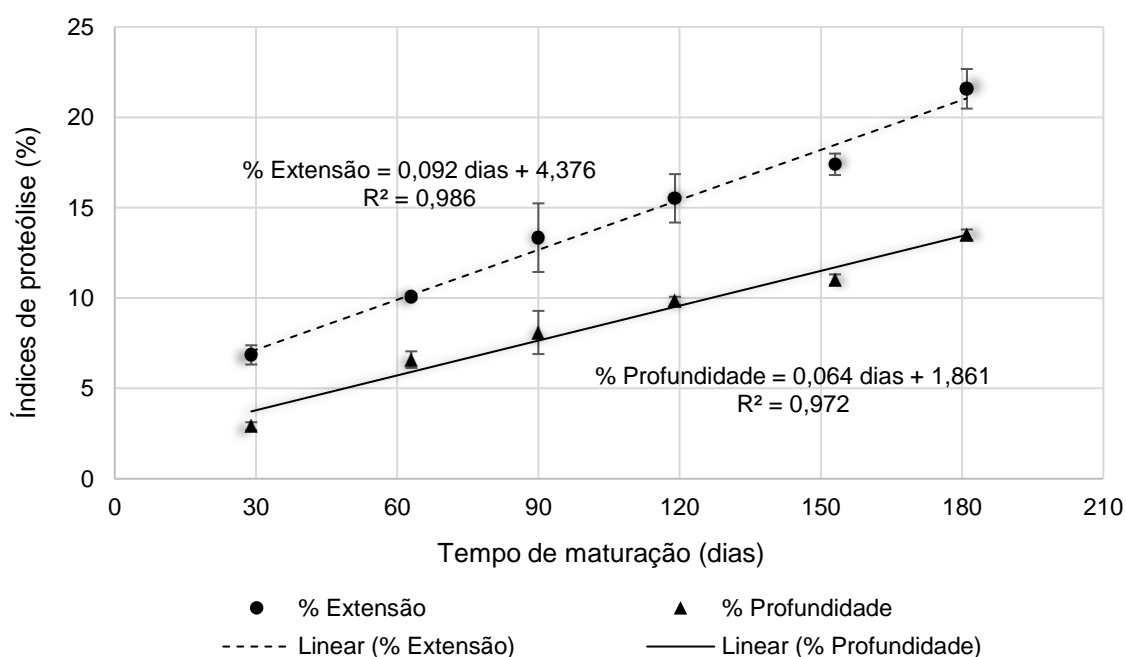


Figura V.1. Regressão linear para os índices de extensão e profundidade da proteólise do queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias.

Tabela V.4. Médias de extensão e profundidade de proteólise para o queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias

Tempo de armazenamento (dias)	Proteólise *	
	Extensão (%)	Profundidade (%)
29	6,85±2,45 ^c	2,91±0,53 ^d
63	10,08±3,27 ^{bc}	6,59±2,14 ^c
90	13,34±3,85 ^{bc}	8,09±2,18 ^{bc}
119	15,52±4,34 ^{ab}	9,85±1,96 ^b
153	17,40±4,77 ^{ab}	11,02±1,75 ^{ab}
181	21,58±6,20 ^a	13,51±1,77 ^a

* Valores médios ± desvio padrão na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Fisher, P>0,05).

Três lotes de queijo Parmesão foram avaliados por 180 dias e obtiveram índice de extensão variando de 5,7 a 19,7% e índice de profundidade de 3,3 a 12,3% (BARROS et al., 2011). Queijos Parmigiano Reggiano com 6 meses de maturação apresentaram 22,9% de extensão (com base em NS pH4,4) e 20,0% de profundidade de proteólise (PANARI et al., 2003). Em média, o teor de NS_{TCA12%}/ NS_{pH4,6} nos queijos Parmesão deste trabalho foi 59,6%. É um valor alto, porém semelhante ao obtido para queijos Parmesão em outros trabalhos (BARROS et al., 2011) e inferior ao observado em outros queijos duros maturados como Parmigiano Reggiano e Grana Padano (PANARI et al., 2003; PAULA et al., 2008). É esperado que o NS_{TCA12%} seja composto de aminoácidos livres, amônia e oligopeptídeos de baixo peso molecular, os quais devem representar entre 6 e 10% do nitrogênio total em queijos Parmigiano Reggiano (ADDEO et al., 1994).

A extensão da proteólise de 161 queijos duros Parmigiano Reggiano foi estudada por 26 meses e a equação que melhor representou o crescimento deste índice foi uma equação de terceiro grau, visto que houve um rápido crescimento nos primeiros 14 meses de maturação e uma tendência a se manter constante nos meses seguintes. A extensão da proteólise variou de 9,9 a 21,7% entre o primeiro e o sexto mês de maturação, chegando a 32,9% ao final de 26 meses (TOSI et al., 2008).

3.2.3 Aminoácidos livres e aminas bioativas

Teores relativos de aminoácidos livres tem sido utilizados para caracterizar queijos duros quanto à variedade e ao tempo de maturação, bem como índices de proteólise baseados na razão entre produtos de degradação e seu composto primário (MAYER, 1996; D'INCECCO et al., 2016a). Assim como os índices de proteólise, os teores totais

de aminoácidos livres e aminas bioativas aumentou linearmente durante a maturação dos queijos Parmesão (Figura V.2) chegando a 737,5 mg/100 g de aminoácidos livres e 32,2 mg/100 g de aminas bioativas totais, aos 181 dias de maturação.

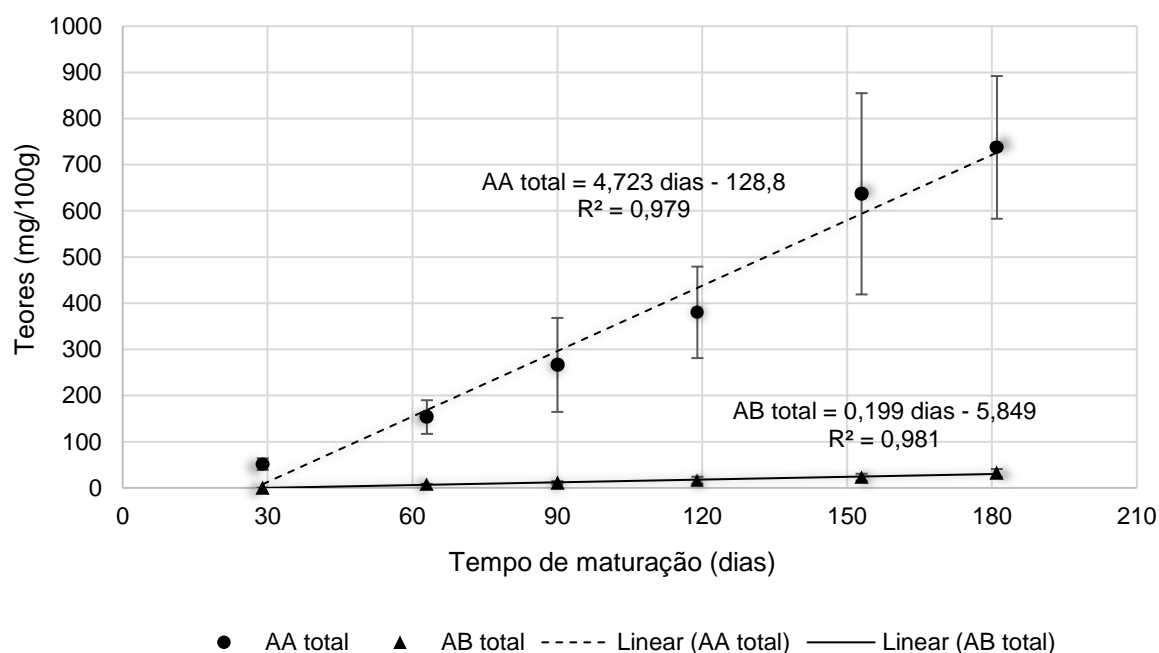


Figura V.2. Regressão linear para os teores de aminoácidos (AA) livres e aminas bioativas (AB) totais do queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias.

Os aminoácidos livres encontrados em maior quantidade durante a maturação do queijo Parmesão foram o ácido glutâmico, a leucina e a lisina, chegando a 100,7 mg/100 g, 84,9 mg/100 g e 76,1 mg/100 g respectivamente, representando juntos 35% do total de aminoácidos livres no final do tempo avaliado. Glicina e cistina foram os menos prevalentes chegando a menos de 10 mg/100 g de queijo (Figura V.3).

Em trabalhos realizados com Parmigiano Reggiano também foi observada a liberação de aminoácidos livres nos primeiros meses de maturação, o que foi considerado significativo para caracterização deste tipo de queijo (TOSI et al., 2008). Teores maiores que os encontrados neste trabalho estão correlacionados para aminoácidos livres em queijo Parmigiano Reggiano, possivelmente pelo tempo maior de maturação deste queijo, com destaque para ácido glutâmico (1.448,9 mg/100 g), lisina (1.009,1 mg/100 g) e leucina (729,0 mg/100 g) (FOX et al., 2004).

A concentração crescente de solutos (sais, íons, aminoácidos livres) na fase aquosa do queijo pode dar origem a agregação e fenômenos de cristalização que resultam em diferentes tipos de estruturas no interior e superfície de diferentes variedades de queijos,

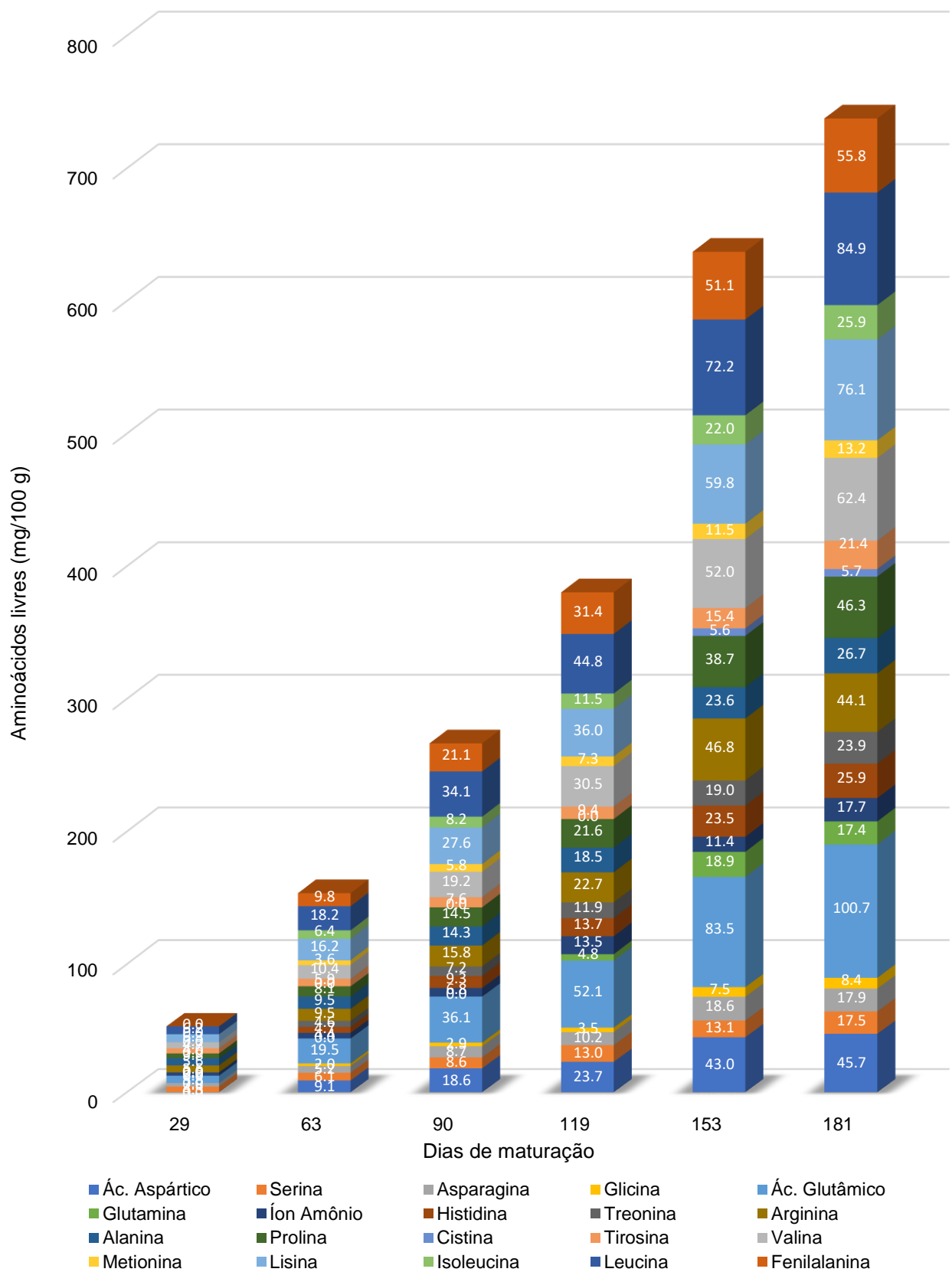


Figura V.3. Aminoácidos livres em queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias.

sendo muito observado em queijos duros maturados por longos períodos (D'INCECCO et al., 2016b). Queijos Grana Padano italianos foram analisados quanto ao teor de aminoácidos presentes em grânulos e manchas nos queijos. Tirosina, fenilalanina e ácido glutâmico foram os principais aminoácidos livres presentes nos grânulos, enquanto nas manchas não havia tirosina, mas havia prevalência de leucina e isoleucina, todos em teores médios diferentes do obtido para o queijo inteiro (BIANCHI et al., 1974). Resultados semelhantes foram encontrados em outro trabalho conduzido com queijos duros, com prevalência de 95% de tirosina nos grânulos e leucina, fenilalanina e cristais de fosfato de cálcio em aglomerações nomeadas como microcristais (D'INCECCO et al., 2016b). A contagem microbiana foi maior nesses pontos onde havia concentração de aminoácidos do que no queijo como um todo, sugerindo que a ação bacteriana é um importante fator contribuinte para o fenômeno de localização de aminoácidos (BIANCHI et al., 1974). A presença de soro residual onde a massa não foi devidamente agregada pode promover o crescimento e a lise de células bacterianas aprisionadas nessas microcavidades, influenciando tanto a disponibilidade de metabólitos quanto as condições microambientais, que por sua vez regulam a difusão e a cristalização de solutos localmente (D'INCECCO et al., 2016b).

Peptídeos de baixa massa molecular obtidos da proteólise (fração solúvel em TCA 12%) em queijos Parmigiano Reggiano maturados por 6 meses foram caracterizados como sendo, em grande parte, fosforilados e procedentes da β -caseína. Esses peptídeos de β -caseína pareceram ser mais resistentes à hidrólise por enzimas presentes no queijo que os provenientes de outras frações de caseínas e a fosforilação, via ligação com o aminoácido serina, por ser muito frequente indicou a importância do grupo fosfato para a solubilização em TCA 12%. Em queijos maturados por longos períodos (acima de 15 meses), os fosfopeptídeos não são mais encontrados, e a fosfoserina é encontrada livre no meio (ADDEO et al., 1994).

Com relação às aminas bioativas, entre as dez pesquisadas, quatro não foram encontradas em nenhum tempo de maturação avaliado no queijo Parmesão: histamina, cadaverina, espermidina e espermina. Serotonina e tiramina foram encontradas a partir do segundo mês de maturação, agmatina e feniletilamina a partir de 153 dias e a putrescina e a triptamina somente aos 6 meses de fabricação do queijo (Figura V.4).

Tiramina foi a amina encontrada em maior quantidade, sendo que o teor considerado perigoso para consumo por pessoas que tomam inibidores de monoamino oxidases (fármaco de “primeira geração”) pode ser atingido com 50 g de queijo Parmesão já no quarto mês de maturação (EFSA, 2011). Para pessoas saudáveis e que não fazem uso

deste tipo de medicação, o nível de tiramina encontrado em queijo Parmesão é seguro. Os teores encontrados para tiramina neste trabalho são semelhantes à média encontrada para queijos duros, de uma forma geral – 8,3 a 11,3 mg/100 g (EFSA, 2011).

Aminas biogênicas foram encontradas em queijos Parmigiano Reggiano em quantidades abaixo do considerado potencialmente perigoso para a saúde e histamina, foi a amina encontrada em quantidade mais significativa (INNOCENTE et al., 2015).

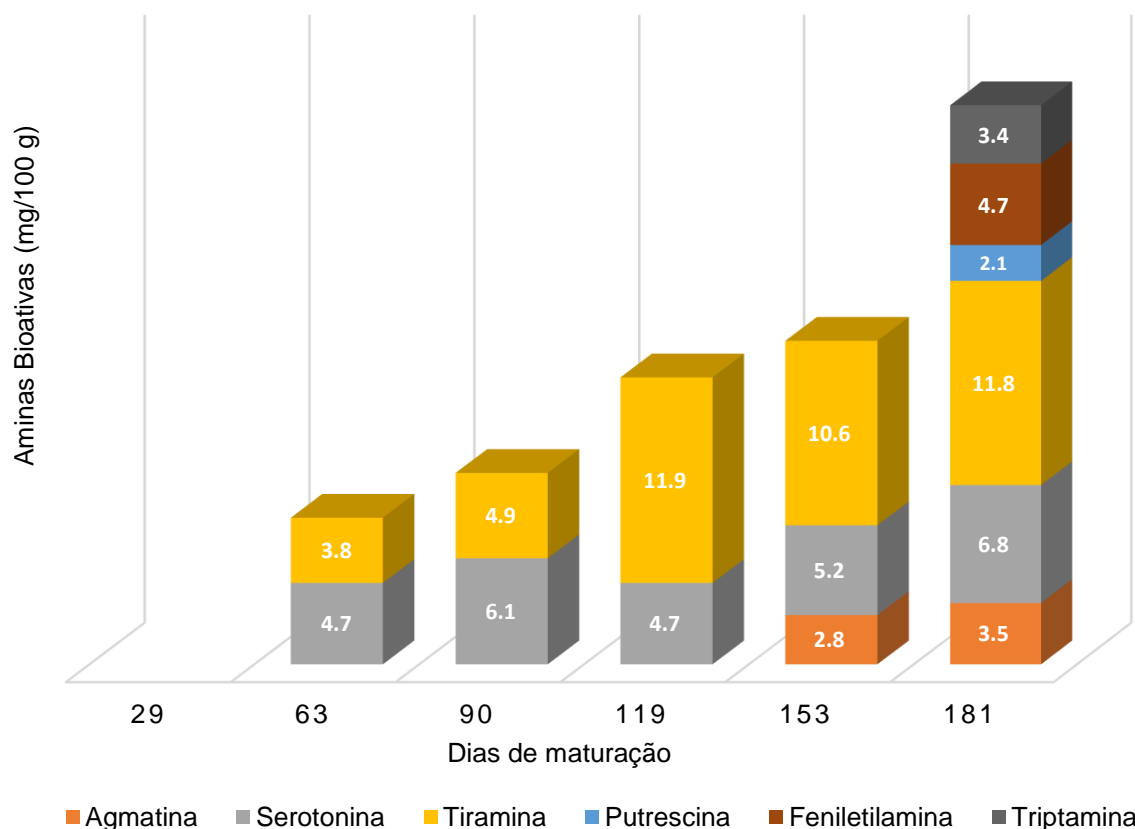


Figura V.4. Aminas bioativas em queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias.

3.2.4 Perfil de textura

O perfil de textura obtido para o queijo Parmesão não apresentou alterações significativas nos parâmetros estudados ao longo da maturação, exceto para a adesividade, que aumentou nos últimos 4 meses de maturação em relação aos 2 meses iniciais (Tabela V.5). A adesividade está relacionada com o esforço envolvido na supressão de forças que mantêm duas superfícies em contato, como a força requerida para retirar a amostra do palato enquanto mastigada (GUNASEKARAN & AK, 2003; FOEGEDING & DRAKE, 2007; ROHM & JAROS, 2011). Extensão e profundidade de proteólise, bem como teor total de aminas bioativas, apresentaram altas correlações de

Pearson com adesividade (maiores que 0,72). A proteólise aumenta as interações entre as moléculas com a água, devido à formação de grupos iônicos carboxi e amino terminais (JACK & PATERSON, 1992; KABELOVÁ et al., 2009), o que pode ter influenciado o aumento da adesividade dos queijos durante a maturação.

A textura de queijos Parmesão obtidos no mercado apresentou valores muito distintos dos obtidos neste trabalho para dureza, elasticidade e mastigabilidade, porém semelhantes para coesividade, cuja média foi de 0,67 para 12 marcas avaliadas em triplicata (JASTER et al., 2014) enquanto 0,66 foi a média de coesividade para os queijos Parmesão durante os 6 meses de maturação. As condições dos testes foram diferentes entre si e os queijos apresentam diferenças principalmente quanto ao tempo de maturação, mas como a coesividade é a razão entre as áreas de primeira e segunda compressão e, portanto, um valor relativo, isso diminui as diferenças e permite uma comparação mais imparcial entre os queijos. Em um outro trabalho, conduzido em queijos Parmigiano Reggiano, o tempo de maturação correlacionou com o índice de elasticidade e tensão na fratura enquanto efeitos menores e menos significantes do tempo de maturação foram observados nos atributos sensoriais (NOËL et al., 1996).

Tabela V.5. Parâmetros de textura de queijo Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias

Textura	Parâmetros por tempo de maturação (dias) *					
	29	63	90	119	153	181
Dureza (N) (primeira "mordida")	14,1±4,8 ^a	21,5±3,9 ^a	19,2±1,0 ^a	19,7±1,0 ^a	18,1±0,9 ^a	14,6±6,0 ^a
Dureza (N) (segunda "mordida")	12,9±4,30 ^a	19,5±3,7 ^a	17,8±0,7 ^a	17,9±1,0 ^a	16,4±0,8 ^a	13,2±5,4 ^a
Gomosidade (N)	10,0±3,0 ^a	14,3±2,8 ^a	12,5±0,9 ^a	12,6±1,0 ^a	11,4±0,6 ^a	9,4±3,0 ^a
Mastigabilidade (J)	0,07±0,02 ^a	0,09±0,02 ^a	0,07±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a	0,06±0,00 ^a	0,06±0,01 ^a
Coesividade	0,72±0,03 ^a	0,66±0,02 ^a	0,65±0,03 ^a	0,64±0,03 ^a	0,63±0,01 ^a	0,66±0,06 ^a
Elasticidade (mm)	6,57±0,23 ^a	6,16±0,35 ^a	5,77±0,36 ^a	5,85±0,56 ^a	5,62±0,06 ^a	6,02±0,79 ^a
Índice de elasticidade	0,82±0,03 ^a	0,77±0,04 ^a	0,73±0,05 ^a	0,73±0,07 ^a	0,71±0,01 ^a	0,76±0,10 ^a
Adesividade (mJ)	0,42±0,29 ^b	0,45±0,10 ^b	1,89±0,47 ^a	1,61±0,29 ^a	1,62±1,10 ^a	1,45±0,12 ^a

* Valores médios ± desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma linha com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Fisher, P>0,05).

3.2.5 Bactérias lácticas e aeróbios mesófilos viáveis

Os queijos Parmesão analisados apresentaram decréscimo na contagem de bactérias lácticas e mesófilos aeróbios viáveis ao longo do tempo de maturação (Tabela V.6). A diminuição progressiva de bactérias lácticas durante a maturação do queijo encontrada durante este estudo pode ser atribuída ao desenvolvimento gradual de condições desfavoráveis ao crescimento microbiano (diminuição da atividade da água e a indisponibilidade de carbono fermentável que restringem o crescimento a um número limitado de cepas) (COPPOLA et al., 1997). Em outro trabalho, realizado com queijos Parmesão vendidos em mercados na região sul do Brasil, a contagem de mesófilos aeróbios foi inferior ao observado neste estudo em quase todas as amostras, variando de 2,7 a 5,1 log UFC/g, porém é desconhecido o tempo de maturação dos queijos estudados (JASTER et al., 2014).

Tabela V.6. Contagem média (log UFC/g \pm desvio padrão) de bactérias lácticas (BAL) e mesófilos aeróbios viáveis (MAV) em queijos Parmesão durante a maturação entre 10 e 12 °C por 181 dias

Dias de estocagem	Contagem de microrganismos (log UFC/g \pm desvio padrão)	
	BAL	MAV
29	7,85 \pm 0,39 ^a	6,97 \pm 0,18 ^{ab}
63	7,12 \pm 1,00 ^{ab}	7,52 \pm 0,12 ^a
90	6,59 \pm 1,16 ^{ab}	6,89 \pm 0,65 ^{abc}
119	4,34 \pm 0,51 ^{bc}	5,97 \pm 0,33 ^{bc}
153	3,32 \pm 0,06 ^c	6,26 \pm 0,25 ^{abc}
181	4,34 \pm 0,46 ^{bc}	5,49 \pm 0,40 ^c

Valores médios \pm desvio padrão (n=6 análises de 3 repetições) na mesma coluna com letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, P>0,05).

Queijos Parmigiano Reggiano feitos a partir de leite cru foram analisados por 150 dias e foi observado que bactérias lácticas termofílicas não foram encontradas a partir de 30 dias de maturação dos queijos, enquanto bactérias lácticas mesofílicas heterofermentativas facultativas (*L. casei*, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. paracasei* ssp. *tolerans*, *L. rhamnosus* e *pediococci*) progressivamente aumentaram a contagem até o quinto mês de maturação, de 5,3 a 7,2 log UFC/g (COPPOLA et al., 2000). Para este mesmo tipo de queijo, outro estudo mostrou declínio de bactérias lácticas de 8 para 2 log UFC/g durante a maturação por 24 meses (COPPOLA et al., 1997).

3.2.6 Análise multivariada

A análise de grupamento hierárquico realizada para as análises (Figura V.5) resultou em 3 conjuntos agrupados por similaridade. No primeiro grupo estão contagem de mesófilos aeróbios viáveis e bactérias lácticas, pH, elasticidade, coesividade e proteína total; no segundo, dureza, mastigabilidade e gomosidade; no terceiro, aminas, aminoácidos, índices de proteólise e adesividade. Este grupamento evidencia as relações entre as determinações. É interessante destacar que as contagens microbianas e os parâmetros de proteólise, aminoácidos livres e aminas bioativas estão em grupos distintos, enquanto pH, elasticidade e coesividade no mesmo grupo.

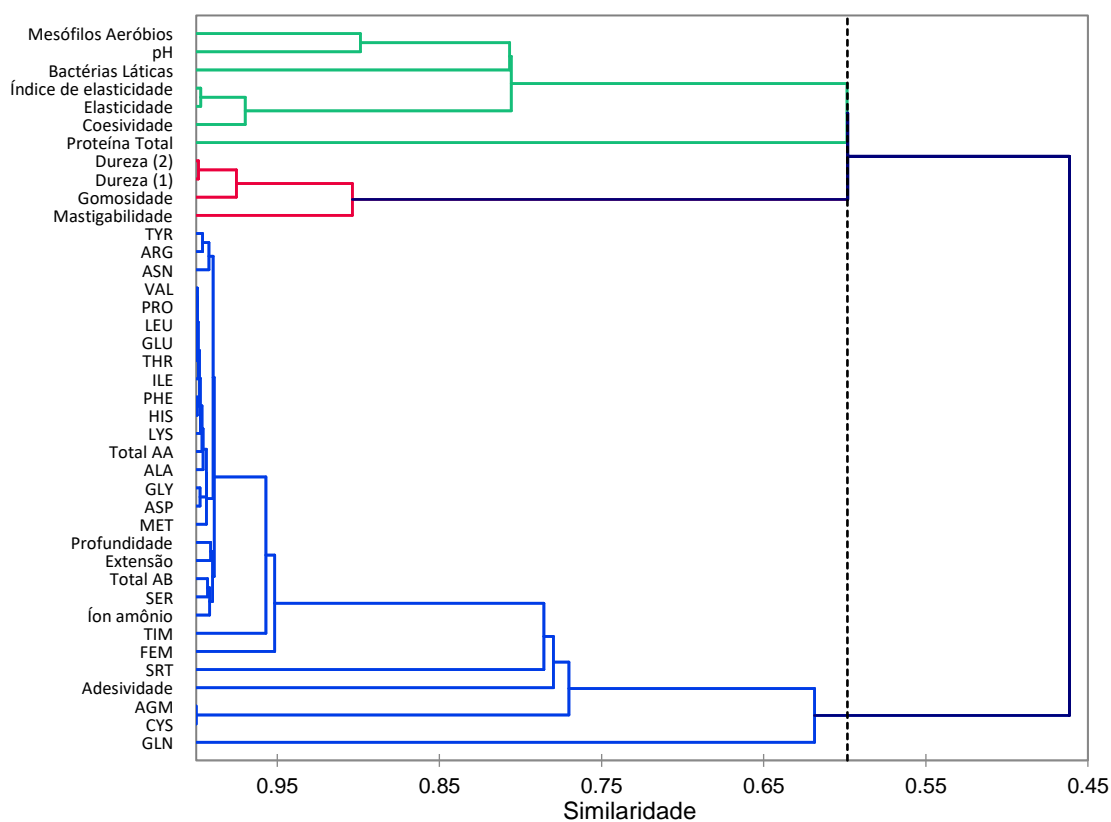


Figura V.5. Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as médias dos parâmetros de textura, índices de proteólise, pH, bactérias lácticas, mesófilos aeróbios, aminas bioativas e aminoácidos livres (totais e individuais) durante a maturação de queijo Parmesão entre 10 e 12 °C por 181 dias.

No queijo Parmesão os primeiros dois componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 88,4% da variância total (Figura V.6). A análise de componentes principais (Figura V.6.B) auxiliada pela análise de grupamento hierárquico (Figura V.6.C) foi capaz de estratificar os tempos de maturação, sendo que o tempo 1 (29 dias após a fabricação) consistiu em um grupo, o tempo 2 em outro grupo (63 dias) e o terceiro grupo foi formado dos tempos 3, 4, 5 e 6 (90, 119, 153 e 181 dias). A primeira e a segunda metade da

maturação ficaram em lados distintos no gráfico, divididos por PC1 (Figura V.6.B). Como demonstrado na Figura V.6.A, o PC1 contribuiu com 72,76% da variância total e apresentava altas correlações positivas com parâmetros de proteólise – extensão (0,987), profundidade (0,971), total de aminas bioativas (0,981), total de aminoácidos livres (0,977) e vários aminoácidos livres ($>0,97$). Por outro lado, apresentou altas correlações negativas com contagem de mesófilos aeróbios (-0,871) e bactérias lácticas (-0,912). O PC2 contribuiu com 15,60% da variância total e separa o primeiro e último tempo de maturação dos demais (Figura 41B). Suas maiores correlações, positivas e negativas, foram com parâmetros de textura – dureza (0,958), gomosidade (0,882), mastigabilidade (0,729), coesividade (-0,726) e elasticidade (-0,682) (Figura V.6.A). Pela análise multivariada foi possível concluir que os parâmetros relacionados à proteólise são importantes para caracterização da maturação do queijo Parmesão, enquanto as contagens de MAV e BAL foram as menos eficientes, possivelmente por apresentarem baixas contagens devido à baixa atividade de água condizente com essa variedade de queijo, enquanto a longa maturação favorece a formação e acumulação de produtos de hidrólise proteica.

4. Conclusão

Os queijos Parmesão apresentaram proteólise expressiva ao longo da maturação, com evolução dos índices de extensão e profundidade, bem como de aminoácidos livres, porém a formação de aminas bioativas não foi igualmente relevante.

Entre os aminoácidos livres destacaram-se o ácido glutâmico, a leucina e a lisina, aminoácidos de importância para a formação de cristais e manchas nos queijos duros de longa maturação. A amina mais prevalente foi a tiramina, que apresentou teores preocupantes para pessoas que fazem uso de medicações do tipo inibidores de monoaminoxidases. A adesividade foi o único parâmetro de textura que apresentou alterações significativas ao longo do tempo de maturação pesquisado. pH e proteína total se mantiveram constantes enquanto as contagens microbiológicas diminuíram significativamente ao longo do tempo, o que pode ter influenciado na baixa diversidade e quantidade de aminas presentes no queijo Parmesão durante o período avaliado.

A análise multivariada mostrou que a diferenciação do queijo Parmesão ao longo da sua maturação é apreciável nos primeiros meses, enquanto nos últimos meses as alterações são menos notáveis. Além disso, os índices de proteólise e aminoácidos livres são bons marcadores de caracterização de queijo Parmesão ao longo da sua maturação.

CAPÍTULO VI

AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS COMO PARÂMETROS DE DIFERENCIAÇÃO DAS VARIEDADES DE QUEIJO ESTUDADAS POR MEIO DE ANÁLISE MULTIVARIADA

1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi comparar os queijos Gorgonzola, Mussarela, Prato e Parmesão por meio de análise multivariada, buscando estabelecer os principais parâmetros de diferenciação entre as variedades estudadas.

2. Material e Métodos

Duas técnicas de análise multivariada foram utilizadas para diferenciação das variedades de queijos: análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). Para a PCA, o teor de umidade, de gordura no extrato seco, médias do pH e dos teores de aminoácidos livres totais, de aminos bioativas totais, das porcentagens de extensão e profundidade de proteólise, teor de tiramina e dos aminoácidos livres serina, asparagina, ácido glutâmico, treonina, alanina, prolina, valina, lisina, leucina e fenilalanina (presentes em todos os queijos em pelo menos um tempo de análise) foram usadas como variáveis ativas para a determinação dos componentes principais, e a variável suplementar (variedades de queijo) foi projetada no plano fatorial. PCA foi conduzida com padronização das variáveis usando matriz de correlação de Pearson.

A HCA foi realizada agrupando as mesmas variáveis utilizadas para a PCA, acima descritos. Foi utilizado o método do encadeamento único (*single linkage*) e a similaridade foi medida por correlação de Pearson.

As análises foram conduzidas utilizando o software XLSTAT (versão 2018.6.53470; Addinsoft, Paris, França).

3. Resultados e Discussão

Entre os dezenove aminoácidos e dez aminos bioativas livres pesquisados, alguns foram encontrados em pelo menos um tempo de análise em todas as variedades de queijo, e foram escolhidas para compor a lista de parâmetros na análise multivariada. As

aminas espermina, espermidina não foram detectadas em nenhum tempo de análise em nenhum queijo, enquanto a tiramina foi encontrada em todos os queijos em pelo menos um tempo de análise. Cadaverina só esteve presente em queijo Prato, histamina e triptamina somente no Gorgonzola e putrescina em Parmesão. O queijo Parmesão apresentou todos os aminoácidos pesquisados em algum momento da sua maturação, o queijo Prato, apenas dez aminoácidos, e os queijos Mussarela e Gorgonzola apresentaram dezessete dos dezenove aminoácidos analisados (Tabela VI.1).

Tabela VI.1. Aminoácidos, aminas bioativas e íon amônio presentes nos queijos em pelo menos um tempo de análise

Analitos	Presença no queijo em pelo menos um tempo de análise			
	Gorgonzola	Parmesão	Mussarela	Prato
Íon Amônio	X	X	X	X
Aminoácidos				
Ácido Aspártico	X	X		
Ácido Glutâmico	X	X	X	X
Alanina	X	X	X	X
Arginina		X	X	
Asparagina	X	X	X	X
Cistina		X	X	
Fenilalanina	X	X	X	X
Glicina	X	X	X	
Glutamina	X	X		
Histidina	X	X	X	
Isoleucina	X	X	X	
Leucina	X	X	X	X
Lisina	X	X	X	X
Metionina	X	X	X	
Prolina	X	X	X	X
Serina	X	X	X	X
Tirosina	X	X	X	
Treonina	X	X	X	X
Valina	X	X	X	X
Aminas				
Agmatina	X	X		
Cadaverina				X
Espermidina				
Espermina				
Feniletilamina	X	X		
Histamina	X			
Putrescina		X		
Serotonina	X	X		
Tiramina	X	X	X	X
Triptamina	X			

X – presença.

Os primeiros dois componentes principais foram responsáveis por 97,51% da variação observada, sendo que PC1 contribuiu com 65,68% e PC2 com 31,83% (Figura VI.1.A e VI.1.B). As variedades de queijo Prato e Mussarela ficaram à esquerda do gráfico de *loading*, enquanto Gorgonzola e Parmesão à direita (Figura VI.1.B). Essa divisão é explicada principalmente pelo teor médio de aminoácidos totais e dos aminoácidos asparagina, valina, lisina, leucina e fenilalanina (correlações maiores que 0,98), mas também pela média dos índices de extensão e profundidade e teores de aminas totais, tiramina, treonina e íon amônio (correlações maiores que 0,82) (Figura VI.1.A). O componente principal 2 isolou o queijo Parmesão das demais variedades (Figura VI.1.B). A porcentagem de gordura no extrato seco (GES) e de umidade são (correlações negativas), pH e os teores médios dos aminoácidos serina e ácido glutâmico (correlações positivas) são os parâmetros que diferenciam este queijo dos demais, visto que a correlação de PC2 com estes é maior que 0,84 (Figura VI.1.A).

A HCA agrupou as variedades de queijos em três conjuntos, por similaridade: Parmesão e Gorgonzola em um grupo, Mussarela e Prato em grupos individuais (Figura VI.1.C). Considerando em conjunto os parâmetros utilizados na análise de agrupamento, os queijos Parmesão e Gorgonzola apresentaram correlação de Pearson de 0,986, demonstrando uma semelhança frente às demais variedades.

4. Conclusão

A análise estatística multivariada demonstrou que o teor total de aminas bioativas e aminoácidos livres, os índices de proteólise extensão e profundidade, os teores dos aminoácidos livres asparagina, treonina, valina, lisina, leucina, fenilalanina, da amina tiramina e do íon amônio são eficientes marcadores de diferenciação entre as variedades de queijos. pH e os teores de GES e umidade foram menos efetivos, visto que queijos com estes valores bem distintos (Parmesão e Gorgonzola) agruparam-se em um conjunto na HCA, e suas maiores correlações foram com o componente principal que menos explicou as variações observadas (PC2).

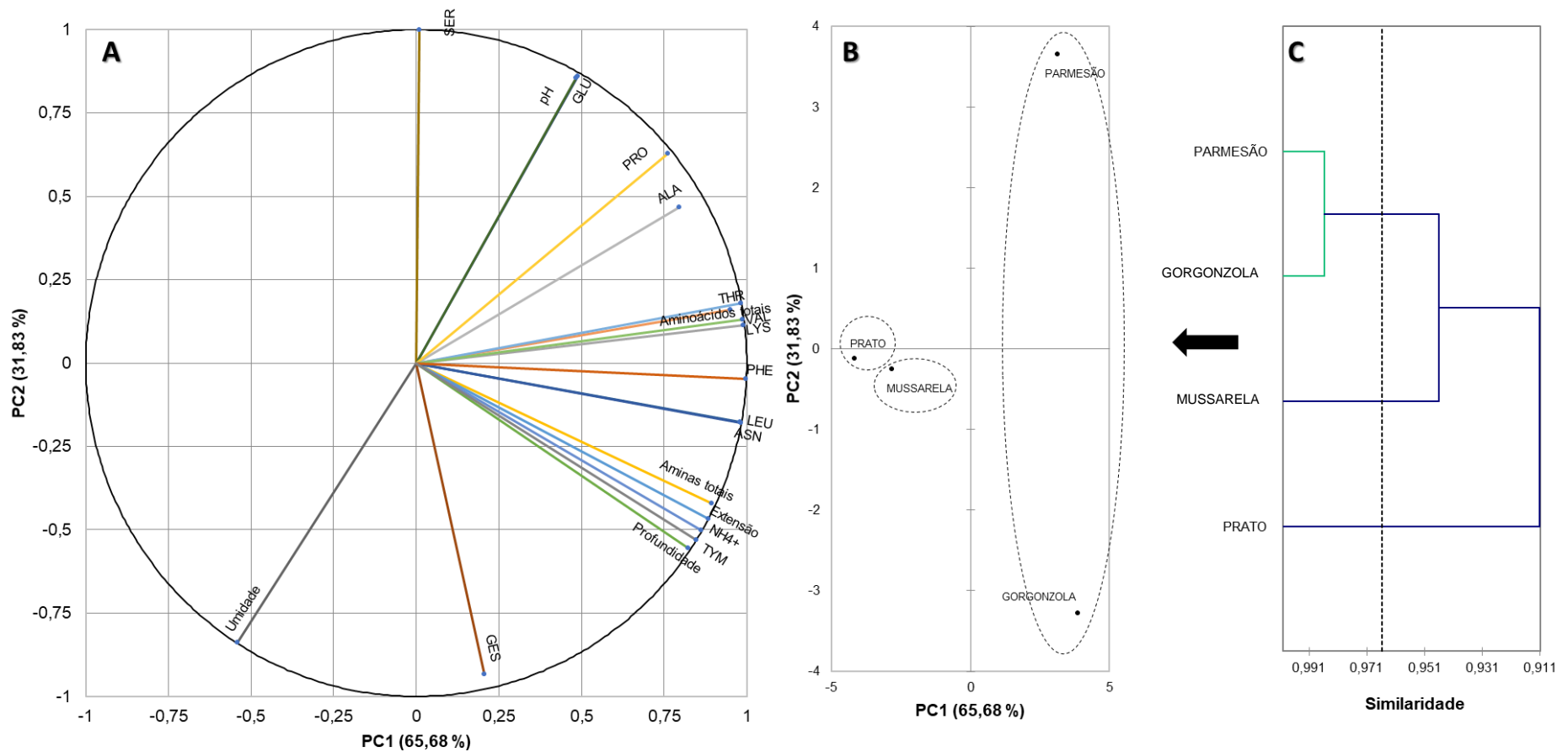


Figura VI.1. Gráficos de *score* (A) e *loading* (B), obtidos pela Análise de Componentes Principais, para as médias dos índices de proteólise extensão e profundidade, pH, aminas bioativas e aminoácidos livres totais, teor de tiramina (TYM) e dos aminoácidos livres serina (SER), asparagina (ASN), ácido glutâmico (GLU), treonina (THR), alanina (ALA), prolina (PRO), valina (VAL), lisina (LYS), leucina (LEU) e fenilalanina (PHE), gordura no extrato seco (GES) e umidade para os queijos Mussarela, Gorgonzola, Prato e Parmesão; (C) Dendrograma da Análise de Grupamento Hierárquico para as observações obtidas para cada variedade de queijo.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

Queijos Mussarela, Prato, Parmesão e Gorgonzola foram fabricados em três repetições com tecnologia tradicional. Os resultados das análises realizadas ao longo da sua maturação/estocagem evidenciaram características intrínsecas de cada variedade e permitiram relacionar fatores que mais representam a peculiaridade de cada queijo.

A proteólise, evento mais complexo e importante que ocorre na maturação de queijos, foi demonstrada em termos de índices de extensão e profundidade e também no perfil de aminoácidos e aminas bioativas, presentes no queijo devido à hidrólise caseínica e catabolismo posterior. Extensão e profundidade aumentaram, como esperado, com o tempo de maturação em todos os queijos, porém no Gorgonzola e no Parmesão a proteólise foi mais acentuada que nos demais queijos. O aminoácido ácido glutâmico, responsável pelo gosto umami, foi encontrado em todos os queijos, com destaque para o Parmesão, em que o teor de ácido glutâmico chegou a 100,7 mg/100 g ao final de 6 meses de maturação. Fenilalanina e lisina, precursores de compostos responsáveis pelo aroma em queijos, também foram abundantes em todas as variedades.

Os queijos mantiveram a qualidade e a segurança do consumidor no que diz respeito a presença de aminas bioativas, importante indicador de qualidade por estar relacionado com a deterioração, e com aspectos de higiene relacionados ao seu processamento. Apesar das diferenças quanto aos tipos e teores de aminas encontradas nas variedades de queijo pesquisadas, a tiramina está sempre presente em quantidades maiores. Portanto, a tiramina deve ser considerada a amina alvo ao empreender medidas de mitigação para melhorar a qualidade destes queijos e reduzir o risco de intoxicação. As poliaminas espermina e espermidina, fatores de crescimento com propriedades antioxidantes, não foram encontradas em nenhum queijo e em nenhum tempo de maturação avaliado.

Os parâmetros de textura que mais sofreram alterações foram os relacionados a propriedades funcionais dos queijos. Foi observada uma diminuição da coesividade dos queijos Gorgonzola, da gomosidade e mastigabilidade da Mussarela, da elasticidade dos queijos Prato e um aumento na adesividade do Parmesão, sempre apresentando altas correlações com parâmetros relacionados à proteólise. Bactérias lácticas, responsáveis por diversas transformações nos queijos, diminuíram ao longo do tempo, com exceção da Mussarela, na qual se manteve constante. A contagem de mesófilos aeróbios viáveis apresentou comportamento semelhante, englobando um grupo maior de microrganismos para se ter uma visão geral sobre a microbiota presente nos queijos.

A abordagem estatística utilizada na caracterização dos queijos foi eficiente, o método para análise simultânea de trinta analitos, entre aminoácidos, amins e íon amônio, teve parâmetros de desempenho mensurados e foi considerado adequado ao que se pretende. As análises multivariadas PCA e HCA foram capazes de sintetizar as influências e diferenças entre as variedades, de uma forma geral distinguindo as variedades maturadas (Gorgonzola e Parmesão) dos queijos Mussarela e Prato. Estas ferramentas mostraram que em todos os queijos os tempos finais de maturação ou estocagem puderam ser agrupados por similaridade, o que demonstra que as maiores alterações nas características gerais das variedades de queijos estudadas ocorreram após a fabricação e que conforme o tempo passa as modificações observadas nas características dos queijos não são mais significativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDEO, F.; CHIANESE, L.; SACCHI, R.; MUSSO, S. S.; FERRANTI, P.; MALORNI, A. Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/L. **Journal of Dairy Research**, v. 61, p. 365–374, 1994.
- ADIMCILAR, V.; ÖZTEKIN, N.; ERIM, F. B. A Direct and sensitive analysis method for biogenic amines in dairy products by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1374–1379, 2017.
- ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo: origem e tecnologia**. Juiz de Fora: [s.n.]. 130 p. 2002.
- ALBUQUERQUE, L. C.; CASTRO, M. C. D. Queijos Azuis. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 50, n. 292, p. 34–48, 1995.
- ALIAKBARLU, J.; ALIZADEH, M.; RAZAVI-ROHANI, S. M.; AGH, N. Biogenic amines in Iranian white brine cheese: modelling and optimisation of processing factors. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 417–424, 13 ago. 2011.
- ALONSO, M. L.; ALVAREZ, A. I.; ZAPICO, J. Rapid analysis of free amino acids in infant foods. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 17, n. 18, p. 4019–4030, 1994.
- ALVAREZ, M. A.; MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 146–155, 2014.
- ALVES, L. S.; MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; SILVA, R.; GIGANTE, M. L. Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 12, p. 7490–7499, 2013.
- ANDIÇ, S.; GENÇCELEP, H.; KOSE, S. Determination of biogenic amines in Herby cheese. **International Journal of Food Properties**, v. 13, n. 6, p. 1300–1314, 25 out. 2010.
- ANDIÇ, S.; TUNÇTÜRK, Y.; GENÇCELEP, H. The effect of different packaging methods on the formation of biogenic amines and organic acids in Kashar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1668–1678, abr. 2011.
- ANDRADE, L. A. F.; FERRAZ, H. B. Inibição enzimática, neuroproteção e tratamento da doença de Parkinson. **Revista de Neurociências**, v. 5, n. 1, p. 27–33, 1997.
- ANTUNES, L. A. F.; COSTA, F. R. F. Queijo Prato salgado com NaCl e ou MgCl₂. Maturação e Aceitabilidade. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 50, n. 296, p. 13–22, 1995.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Capítulo 33. Dairy products. In: ROBERT L. BRADLEY JR. (Chapter Editor). **Official methods of analysis of AOAC**. 19. ed. Washington: [s.n.]. 2012. p. 1–100.
- ARENAS, R.; GONZÁLEZ, L.; SACRISTÁN, N.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Compositional and biochemical changes in Genestoso cheese, a Spanish raw cow's milk variety, during ripening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 4, p. 851–859, 2014.

- ARLORIO, M.; COÏSSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; CAPASSO, M.; RINALDI, M.; MARTELLI, A. Proteolysis and production of biogenic amines in Toma Piemontese PDO cheese during ripening. **Italian Journal of Food Science**, v. 15, n. 3, p. 395–404, 2003.
- AVELAR, E. C.; FRANÇA, A. S.; FERRAZ, V. P. Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos. **Anais VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica UNICAMP**, 2005.
- AYYASH, M. M.; SHAH, N. P. Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 8, p. 3769–3777, 2011.
- BAKER, G. B.; WONG, J. T. F.; COUTTS, R. T.; PASUTTO, F. M. Simultaneous extraction and quantitation of several bioactive amines in cheese and chocolate. **Journal of Chromatography A**, v. 392, n. C, p. 317–331, 1987.
- BANSAL, N.; PIRAINO, P.; McSWEENEY, P. L. H. Determination of proteolysis in cheese. In: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (Eds.). **Handbook of Dairy Foods Analysis**. [s.l.] Taylor & Francis, 2010. p. 405–425.
- BARBOSA, I. C.; OLIVEIRA, M. E. G.; MADRUGA, M. S.; GULLÓN, B.; PACHECO, M. T. B.; GOMES, A. M. P.; BATISTA, A. S. M.; PINTADO, M. M. E.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Influence of the addition of *Lactobacillus acidophilus* La-05, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 and inulin on the technological, physicochemical, microbiological and sensory features of creamy goat cheese. **Food & Function**, v. 7, n. 10, p. 4356–4371, 2016.
- BARCINA, Y.; IBÁÑEZ, F. C.; ORDONEZ, A. I. Evolution of free amino acids during Idiazabal cheese ripening. **Food Control**, v. 6, n. 3, p. 161–164, 1995.
- BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JÚNIOR, L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Queijo Parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 285–294, 2011.
- BARROS, C. M. V.; CUNHA, C. R.; GALLINA, D. A.; VIOTTO, L. A.; VIOTTO, W. H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 11–18, 2006.
- BASTOS, R. A.; PINTO, S. M.; CARNEIRO, J. D. S.; RAMOS, T. M.; RAMOS, F. M.; HADDAD, F. F. Avaliação da percepção e preferência dos consumidores em relação a queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 390, p. 12–19, 2013.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4. ed. Berlim: Springer, 2009.
- BENKERROUM, N. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 801–826, 2016.
- BERNARDES, A. C. M.; SOUZA, S. V. C. DE. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos propostos pela ANVISA (RE nº 899 de 2003) com o documento orientado do INMETRO e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC International, ISO e IUPAC. **Revista Analytica**, v. 51, p. 66–77, 2011.

BIANCHI, A.; BERETTA, G.; CASERIO, G.; GIOLITTI, G. Amino acid composition of granules and spots in Grana Padano cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 12, p. 1504–1508, 1974.

BØRSTING, M. W.; QVIST, K. B.; RASMUSSEM, M.; VINDELØV, J.; VOGENSEN, F. K.; ARDÖ, Y. Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 5, p. 593–612, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62. Aprova o regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do leite tipo a, leite cru refrigerado e leite pasteurizado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 358, de 4 de setembro de 1997. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijo Prato. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 1997a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarella). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 1997b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 353, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 1997c.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 1997d.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 45, de 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Azul. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 45, de 13 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Conservas de Peixes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2011a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: MAPA/ACS, 2011b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 21, de 31 de maio de 2017. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Congelado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2017.

BRITO, C.; CID, N.; MUÑOZ, O.; BAEZ, A.; HORZELLA, M. Biogenic amine content in Chilean Gauda cheese: Physico-chemical and microbiological factors that may influence this content. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 4, p. 554–561, 2014.

BUŇKOVÁ, L.; ADAMCOVÁ, G.; HUDCOVÁ, K.; VELICHOVÁ, H.; PACHLOVÁ, V.; LORENCOVÁ, E.; BUŇKA, F. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. **Food chemistry**, v. 141, n. 1, p. 548–51, 2013.

CARVALHO, M. P.; VENTURINI, C. E. P.; GALAN, V. B. As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil. **Portal MilkPoint**. 2015. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidade-s-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx> Acessado em: dez. 2017.

CENTI, V.; MATTEUCCI, F.; LEPIDI, A.; DEL GALLO, M.; ERCOLE, C. Microbiological and biochemical aspects of inland Pecorino Abruzzese cheese. **Heliyon**, v. 3, n. 2, p. 1–26, 2017.

CHALITA, M. A. N. O consumo de queijo como referência para a análise do mercado de qualidade do produto. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 50, n. 3, p. 545–562, 2012.

CHAMBA, J. F.; IRLINGER, F. Secondary and adjunct cultures. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L.H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Eds.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. General Aspects**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2004. p. 191–206.

CHAVES; VIOTTO, W. H.; GROSSO, C. R. F. Proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese as affected by refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 2, p. 202–205, 1999.

COHEN, S. A. Amino acid analysis using pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. In: COOPER, C.; PACKER, N.; WILLIAMS, K. (Eds.). **Amino Acid Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2001. v. 159, p. 39–47.

COMISSÃO EUROPEIA. Diretiva 2002/657/CE. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, n. 221, p. 8–36, 2002.

COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, A.; SORRENTINO, E.; GRAZIA, L. Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 305–310, 1997.

COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, A.; SORRENTINO, E.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. **Lait**, v. 80, n. 5, p. 479–490, 2000.

- COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; MOSCHETTI, G. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 414–420, 2001.
- COSTA, R. G. B.; FURTADO, M. M. Propriedades funcionais da mussarela para pizza: derretimento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 324, p. 18–28, 2002a.
- COSTA, R. G. B.; FURTADO, M. M. Propriedades funcionais da mussarela para pizza: separação de gordura (oiling off). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 325, p. 21–27, 2002b.
- COSTA, R. G. B.; FURTADO, M. M. Propriedades funcionais da mussarela para pizza: escurecimento (browning) e formação de bolhas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 326, p. 9–16, 2002c.
- CUSTÓDIO, F. B.; TAVARES, É.; GLÓRIA, M. B. A. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 280–288, 2007.
- D'INCECCO, P.; GATTI, M.; HOGENBOOM, J. A.; BOTTARI, B.; ROSI, V.; NEVIANI, E. Lysozyme affects the microbial catabolism of free arginine in raw-milk hard cheeses. **Food Microbiology**, v. 57, p. 16–22, 2016a.
- D'INCECCO, P.; LIMBO, S.; FAORO, F.; HOGENBOOM, J.; ROSI, V.; MORANDI, S.; PELLEGRINO, L. New insight on crystal and spot development in hard and extra-hard cheeses : association of spots with incomplete aggregation of curd granules. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6144–6156, 2016b.
- DAVE, R. I.; McMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; BROADBENT, J. R. Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of mozzarella cheeses made using direct acidification. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 114–26, 2003.
- DE RENSIS, C. M. V. B.; PETENATE, A. J.; VIOTTO, W. H. Caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 488–494, 2009.
- DELGADO, F. J.; RODRÍGUEZ-PINILLA, J.; GONZAÁLEZ-CRESPO, J.; RAMÍREZ, R.; ROA, I. Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 512–519, 2010.
- DIANA, M.; RAFECAS, M.; ARCO, C.; QUÍLEZ, J. Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, n. 2, p. 94–100, 2014a.
- DIANA, M.; QUÍLEZ, J.; RAFECAS, M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 407–420, 2014b.
- DIEZHANDINO, I.; FERNÁNDEZ, D.; SACRISTÁN, N.; COMBARROS-FUERTES, P.; PRIETO, B.; FRESNO, J. M. Rheological, textural, colour and sensory characteristics of a Spanish blue cheese (Valdeón cheese). **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 1118–1125, 2016.
- DUTRA, E. R. P.; MUNCK, A. V. **Apostila de Fabricação de Queijos**. Juiz de Fora: EPAMIG Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2002.

DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M.; DZIUBA, B. Milk Proteins. In: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (Eds.). **Handbook of Dairy Foods Analysis**. [s.l.] Taylor & Francis, 2010. p. 79–106.

EFSA. EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 1–93, 2011.

EL SODA, M. Acceleration of flavour formation during cheese ripening. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.). **Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence**. [s.l.] Elsevier B.V., 1995. p. 721–746.

EVERETT, D. W.; AUTY, M. A. E. Cheese structure and current methods of analysis. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 759–773, 2008.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. **FAOSTAT**, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QP> Acessado em: março de 2017.

FEENEY, E. P.; GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1646–1654, 2002.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. [s.l.] Marcel Dekker, 1996.

FIECHTER, G.; SIVÉC, G.; MAYER, H. K. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 927, p. 191–200, 2013.

FIL - FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE LATICÍNIOS. **Facts and Figures. Cheese per capita consumption (kg) 2013**. Disponível em: <http://www.fil-idf.org/about-dairy/facts-figures/> Acessado em: mar. 2017.

FILHO, R. R. L.; POMBO, G. Aumenta o consumo de queijo no Brasil. **Carta Leite Scot Consultoria**, v. 6, n. 105, 2010.

FLÓREZ, A. B.; RUAS-MADIEDO, P.; ALONSO, L.; MAYO, B. Microbial, chemical and sensorial variables of the Spanish traditional blue-veined Cabrales cheese, as affected by inoculation with commercial *Penicillium roqueforti* spores. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 3–4, p. 250–257, 2006.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory and mechanical properties of cheese texture. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1611–1624, 2007.

FOX, P. F. Cheese overview. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2011. p. 534–543.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; McSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2. ed. [s.l.] Springer, 2015.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. 2. ed. [s.l.] Springer, 2017.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Cheese: An Overview. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Eds.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - General Aspects**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2004. p. 1–18.

- FRANCO, P. R. Aumento da renda leva à expansão do consumo de queijos especiais no País. **Jornal Estado de Minas**, 2013.
- FURTADO, M. M. **A Arte e a Ciência do Queijo**. 2. ed. São Paulo: Editora Globo, 1991.
- FURTADO, M. M. **Manual Prático de Mussarela (Pizza Cheese)**. Campinas: MasterGraf, 1997.
- FURTADO, M. M. Fundamentos originais dos queijos Grana italianos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 40–50, 2011.
- FURTADO, M. M.; AMORIM, A. C. B. Os pioneiros laticinistas dinamarqueses e a história do queijo Prato. **Indústria de Laticínios**, n. 4, p. 18–22, 2000.
- FURTADO, M. M.; CASAGRANDE, H. R.; FREITAS, L. C. G. Estudo rápido sobre a evolução de alguns parâmetros físico-químicos durante a maturação do queijo tipo gorgonzola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, n. 231, p. 3–8, 1984.
- FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. L. **Tecnologia de Queijos: Manual Técnico para a Produção Industrial de Queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994.
- GALGANO, F.; CARUSO, M.; CONDELLI, N.; FAVATI, F. Focused review: Agmatine in fermented foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUN, p. 1–7, 2012.
- GAYA, P.; SÁNCHEZ, C.; NUÑEZ, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 3, p. 287–295, 2005.
- GEROSA, S.; SKOET, J. Capítulo 2 - Disponibilidade de leite: produção e demanda atual, e perspectivas de médio prazo. In: MUEHLHOF, E.; BENNET, A.; MCMAHON, D. (Eds.). **Leite e produtos lácteos na alimentação humana**. Roma: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, 2013. p. 11–40.
- GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In: HUI, Y. H. (Ed.). **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. [s.l.] Taylor & Francis, 2006. p. 13.1–13.38.
- GOBBETTI, M.; BURZIGOTTI, R.; SMACCHI, E.; CORSETTI, A.; DE ANGELIS, M. Microbiology and biochemistry of Gorgonzola cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 8–9, p. 519–529, 1997.
- GOMES, M. B.; PIRES, B. A. D.; FRACALANZZA, S. A. P.; MARIN, V. A. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1123–1134, 2014.
- GOROSTIZA, A.; CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 407–414, 2004.
- GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; GIANOTTI, V.; POLATI, S.; GENNARO, M. C. High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses. **Journal of chromatography. A**, v. 1149, n. 2, p. 151–7, 2007.
- GRUMBACH, E. S.; WHEAT, T. E.; MAZZEO, J. R. A novel method for the analysis of amino acids. **Waters Corporation**, 2006.

GUARCELLO, R.; DIVICCARO, A.; BARBERA, M.; GIANCIPPOLI, E.; SETTANNI, L.; MINERVINI, F.; MOSCHETTI, G.; GOBBETTI, M. A survey of the main technology, biochemical and microbiological features influencing the concentration of biogenic amines of twenty Apulian and Sicilian (Southern Italy) cheeses. **International Dairy Journal**, v. 43, p. 61–69, 2015.

GUINEE, T. P.; HARRINGTON, D.; CORCORAN, M. O.; MULHOLLAND, E. O.; MULLINS, C. The compositional and functional properties of commercial Mozzarella, cheddar and analogue pizza cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 2, p. 51–56, 2000.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. **Cheese Rheology and Texture**. Washington: CRC Press, 2003.

HA-LA BIOTEC INFORMATIVO. Maturação de queijos. **Chr. Hansen**, v. XV, n. 92, 2006.

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

HE, Y.; ZHAO, X. -E.; WANG, R.; WEI, N.; SUN, J.; DANG, J.; CHEN, G.; LIU, Z.; ZHU, S.; YOU, J. Simultaneous determination of food-related biogenic amines and precursor amino acids using in situ derivatization ultrasound assisted dispersive liquid–liquid microextraction by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 43, p. 8225–8234, 2016.

HENNEQUIN, D.; HARDY, J. Evaluation instrumentale et sensorielle de certaines propriétés texturales de fromages à pâte molle. **International Dairy Journal**, v. 3, n. 7, p. 635–647, 1993.

HOSKINS, M. N. Direct amino acid analyses of Mozzarella cheese. **Journal of American Dietary Association**, v. 12, p. 1612–1615, 1985.

HU, Z.; LI, H.; YUAN, Y.; YUE, T. Ultrasensitive and simultaneous determination of twenty-one amino acids and amines in culture media, red wine and beer. **Food Chemistry**, v. 158, p. 56–65, 2014.

IMM, J. Y.; OH, E. J.; HAN, K. S.; OH, S.; PARK, Y. W.; KIM, S. H. Functionality and physico-chemical characteristics of bovine and caprine Mozzarella cheeses during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2790–2798, 2003.

INNOCENTE, N.; MAIFRENI, M.; BIASUTTI, M.; MANSUTTI, S.; MARINO, M. Biogenic amines in Parmigiano Reggiano cheese. **Industria Alimentari**, v. 54, n. 556, p. 5–12, 2015.

IVENS, K. O.; BAUMERT, J. L.; HUTKINS, R. L.; TAYLOR, S. L. Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1629–1639, 2017.

JACK, F. R.; PATERSON, A. Texture of hard cheeses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, n. C, p. 160–164, 1992.

JANA, A. H.; MANDAL, P. K. Manufacturing and quality of mozzarella cheese: A review. **International Journal of Dairy Science**, v. 6, n. 4, p. 199–226, 2011.

JASTER, H.; CAMPOS, A. C. L. P.; AUER, L. B.; LOS, F. G. B.; SALEM, R. D. S.; ESMERINO, L. A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M. Quality evaluation of Parmesan-type cheese: a chemometric approach. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 181–188, 2014.

JIA, S.; KANG, Y. P.; PARK, J. H.; LEE, J.; KWON, S. W. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 51, p. 9174–9182, 2011.

JOSHI, N. S.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; DAVE, R. I. Effect of calcium on microstructure and meltability of part skim Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 1975–1985, 2004.

JUNCAL, L. F.; SANTOS, A. G.; FURTADO, M. M. Influência da homogeneização de creme na aceleração da maturação de queijo Gorgonzola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 345, p. 328–331, 2005.

KABELOVÁ, I.; DVOŘÁKOVÁ, M.; ČÍŽKOVÁ, H.; DOSTÁLEK, P.; MELZUCH, K. Determination of free amino acids in cheeses from the Czech market. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, n. 3, p. 143–150, 2009.

KALAČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005-mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

KEALY, T. Application of liquid and solid rheological technologies to the textural characterisation of semi-solid foods. **Food Research International**, v. 39, n. 3, p. 265–276, 2006.

KEBARY, K. M. K.; EL-SONBATY, A. H.; BADAWI, R. M. Effects of heating milk and accelerating ripening of low fat Ras cheese on biogenic amines and free amino acids development. **Food Chemistry**, v. 64, p. 67–75, 1999.

KINDSTEDT, P. S.; HILLIER, A. J.; MAYES, J. J. Capítulo 9. Technology, biochemistry and functionality of Pasta Filata/Pizza Cheese. In: LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. (Eds.). **Technology of Cheesemaking**. 2. ed. Nova Deli: Wiley-Blackwell, 2010. p. 330–359.

KOMPRDA, T.; SMĚLÁ, D.; NOVICKÁ, A.; KALHOTKA, L.; ŠUSTOVÁ, K.; PECHOVÁ, P. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 129–137, jan. 2007.

KORÖS, Á.; VARGA, Z.; MOLNÁR-PERL, I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, n. 2, p. 146–152, 2008.

LADERO, V.; LINARES, D. M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 1015–1019, 2008.

LADERO, V.; FERNÁNDEZ, M.; CUESTA, I.; ALVAREZ, M. A. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 933–939, 2010.

LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 33, p. 70–79, 1999.

LINARES, D. M.; RÍO, B.; LADERO, V.; MARTÍNEZ, N.; FERNÁNDEZ, M.; MARTÍN, M.

- C.; ÁLVAREZ, M. A. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAY, p. 1–10, 2012.
- LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F.; PICCI, N.; PUOCI, F.; SPIZZIRRI, U. G.; RESTUCCIA, D. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 38–55, mar. 2013.
- LOURENÇO NETO, J. P. M. Tecnologia de fabricação do queijo Gorgonzola no Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, n. 235, p. 43–45, 1984.
- LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited Review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2725–2743, 2003.
- MARTELLI, A.; ARLORIO, M.; TOURN, M. L. Determination of amines and precursor amino acids in Gorgonzola cheese by ion-pair HPLC without derivatization. **Rivista della Società Italiana di Scienza dell’Alimentazione**, v. 22, n. 3, p. 261–270, 1993.
- MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; TORRIANI, S.; MASTROCOLA, D.; SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SCHIRONE, M.; SUZZI, G. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6–9, p. 571–578, 2005.
- MAYER, H. K. Electrophoretic ripening index for the evaluation of proteolysis and the deduction of the age of Parmesan cheese. **Z Lebensm Unters Forsch Journal**, v. 202, p. 465–470, 1996.
- MAZZUCCO, E.; GOSETTI, F.; BOBBA, M.; MARENCO, E.; ROBOTTI, E.; GENNARO, M. C. High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 127–134, 2010.
- McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 27, n. 2/3, p. 127–144, 2004.
- McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2011. p. 667–674.
- MOREIRA, G. M. M.; SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; PAULA, J. C. J.; FERNANDES, C.; GLÓRIA, M. B. A. Parâmetros de desempenho em método UHPLC-UV para quantificação de aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos Mussarela, Prato, Parmesão e Gorgonzola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 4, p. 192–204, 2017.
- MOREIRA, G. M. M.; COSTA, R. G. B.; TEODORO, V. A. M. PAULA, J. C. J.; SOBRAL, D.; FERNANDES, C.; GLÓRIA, M. B. A. Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture of Gorgonzola-type cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, p. 583-590, 2018.
- MOREIRA, G. M. M.; CUSTÓDIO, F. B.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em queijos. **Informe Agropecuário**, v. 36, n. 284, p. 14–18, 2015.
- MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F.; COSTA, G. A. N.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; SILVA, A. T.; DESTRO, M. T. Propriedades físicas e composição química e bioquímica durante a maturação de queijo Prato de diferentes origens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 270–273, 2002.

- MORSELLI, P. L.; GARATTINI, S. Monosodium glutamate and the chinese resturant syndrome. **Nature**, v. 227, p. 611–616, 1970.
- NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J. R. F.; SPADOTI, L. M.; PIZAIA, P. D.; ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo Prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 177–182, 2003.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.
- NEPOMUCENO, R. S. A. C.; COSTA JUNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B. Exopolysaccharide-producing culture in the manufacture of Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 383–389, 2016.
- NIRO, S.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R.; PANFILI, G.; FRATIANNI, A. Evolution of free amino acids during ripening of Caciocavallo cheeses made with different milks. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9521–9531, 2017.
- NOËL, Y.; ZANNONI, M.; HUNTER, E. A. Texture of Parmigiano Reggiano cheese: Statistical relationships between rheological and sensory variates. **Le Lait**, v. 76, n. 3, p. 243–254, 1996.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 3, p. 750–755, 2003.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; TRUJILLO-MESA, A. J.; VIDAL-CAROU, M. C. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 2, p. 245–252, 2004.
- OBERG, C. J.; WANG, A.; MOYES, L. V.; BROWN, R. J.; RICHARDSON, G. H. Effects of proteolytic activity of thermolactic cultures on physical properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 389–397, 1991.
- OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, G. R. Evolução das elasticidades-renda dos dispêndios de leite e derivados no Brasil. **Anais XLIV Congresso SOBER**, p. 1–14, 2006.
- ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1475–1486, jan. 2007.
- ÖNAL, A.; TEKKELI, S. E. K.; ÖNAL, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food chemistry**, v. 138, n. 1, p. 509–15, 1 maio 2013.
- ÖNER, Z.; GÜL KARAHAN, A.; ALOĞLU, H. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 449–454, 2006.
- OOMMEN, B. S.; McMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; BROADBENT, J. R.; STRICKLAND, M. Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* influences functional properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2750–2758, 2002.
- PACHLOVÁ, V.; BUŇKA, F.; FLASAROVÁ, R.; VALKOVÁ, P.; BUŇKOVÁ, L. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1846–1854, 2012.

- PANARI, G.; MARIANI, P.; SUMMER, A.; GUIDETTI, R.; PECORARI, M. Variazione della composizione e andamento della proteolisi del Parmigiano-Reggiano nel corso della maturazione in riferimento al profilo (centro e periferia) della forma. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 54, n. 3, p. 199–212, 2003.
- PAPAGEORGIU, M.; LAMBROPOULOU, D.; MORRISON, C.; KŁODZIŃSKA, E.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 128–142, 2018.
- PAULA, J. C. J.; MACHADO, G. M.; CARVALHO, A. F.; MAGALHÃES, A. F. R.; MINIM, V, P. R. Queijo Grana Padano de diferentes origens: composição centesimal e aceitabilidade sensorial. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 363, p. 31–35, 2008.
- PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F. DE; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à saga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367/368, p. 19–25, 2009.
- PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-Química do Leite e Derivados: Métodos Analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001.
- PINHA, L. C.; CARVALHO, G. R.; TRAVASSOS, G. F. Poder de compra e consumo de lácteos no Brasil. **Fórum das Américas: Leite e Derivados**, 2010.
- PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; MENDES, E.; OLIVEIRA, B. M.; FERREIRA, M. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. **Food Chemistry**, v. 75, p. 287–291, 2001.
- PINO, A.; PRADOS, F.; GALÁN, E.; VIVO, R. FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Amino acids evolution during ripening of goats' milk cheese manufactured with different coagulants. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2062–2069, 2009.
- POLO, C.; RAMOS, M.; SÁNCHEZ, R. Free Amino acids by high performance liquid chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mahon cheese during ripening. **Food Chemistry**, v. 16, p. 85–96, 1985.
- POVEDA, J. M.; MOLINA, G. M.; GÓMEZ-ALONSO, S. Variability of biogenic amine and free amino acid concentrations in regionally produced goat milk cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 51, p. 85–92, 2016.
- PRIETO, B.; URDIALES, R.; FRANCO, I.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M.; CARBALLO, J. Biochemical changes in Picón Bejes-Tresviso cheese, a Spanish blue-veined variety, during ripening. **Food Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 415–421, 1999.
- RAPACCI, M.; ANTUNES, L. A. F.; FURTADO, M. M. Efeito da substituição de NaCl por KCl nas características do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 50, n. 297, p. 3–12, 1996.
- REDRUELLO, B.; LADERO, V.; CUESTA, I.; BUYLLA, J. R. A.; MARTÍN, M. C.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 1029–1035, 2013.

- RENES, E.; DIEZHANDINO, I.; FERNÁNDEZ, D.; FERRAZZA, R. E.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening. **Food Microbiology**, v. 44, p. 271–277, 2014.
- RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U. G.; PUOCI, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O. I.; IEMMA, F.; PICCI, N. A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 363–369, 2011.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- ROCHA, A. A. Produção no país cresceu menos em 2015. **Valor Econômico**. 2016. Disponível em: <http://www.valor.com.br/agro/4589793/producao-no-pais-cresceu-menos-em-2015#> Acessado em: dez. 2017.
- ROHM, H.; JAROS, D. Principles and significance in assessing rheological and textural properties. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2011. p. 264–271.
- ROIG-SAGUÉS, A. X.; MOLINA, A. P.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 2, p. 96–100, 2002.
- ROSA, C. C. B.; FURTADO, M. M.; NASCIMENTO, W. C. A. Avaliação dos efeitos de temperaturas de filagem e de agentes coagulantes sobre as características físico-químicas do queijo mussarela. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, n. 356, p. 3–10, 2007.
- SÁNCHEZ, V. A. A. G. **Evolução de ácidos graxos e do perfil da textura durante a maturação de queijo Prato**. Dissertação. Universidade de São Paulo, São Paulo, 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, n. 4, p. 595–606, 2003.
- SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; FASOLI, G.; PERPETUINI, G.; CORSETTI, A.; MANETTA, A. C.; CIARROCCHI, A.; SUZZI, G. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. **Food microbiology**, v. 34, n. 1, p. 137–44, 2013.
- SENTELLAS, S.; NÚÑEZ, Ó.; SAURINA, J. Recent Advances in the Determination of Biogenic Amines in Food Samples by (U)HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 41, p. 7667–7678, 2016.
- SERATLIĆ, S. V., MILORADOVIĆ, Z. N., RADULOVIĆ, Z. T.; MAĆEJ, O. D. The effect of two types of mould inoculants on the microbiological composition, physicochemical properties and protein hydrolysis in two Gorgonzola-type cheese varieties during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 408–416, 2011.
- SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675–690, 1996.
- SHEEHAN, J. J.; GUINEE, T. P. Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 2, p. 161–172, 2004.
- SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International journal of food microbiology**, v. 29, n. 2–3, p. 213–31, abr. 1996.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo mussarela de búfala**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, F. R. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, P. H. F. Cálcio em queijos: Aspectos químicos, tecnológicos e nutricionais. **ILSI Brasil Notícias**, n. 4, p. 4–5, 2012.

SIROCCHI, V.; CAPRIOLI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; SAGRATINI, G. Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 9, p. 819–825, 2014.

SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; TEODORO, V. A. M.; MOREIRA, G, M. M.; PAULA, J. C. J.; NOVAES, T. O. Quantificação e porcentagem de recuperação de luteína adicionada na fabricação de queijo Prato esférico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 405, 2014.

SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; MOREIRA, G, M. M.; PAULA, J. C. J.; TEODORO, V. A. M.; NUNES, N. M.; PIRES, C. S.; PINTO, M. S. Can lutein replace annatto in the manufacture of Prato cheese? **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 349–355, 2016.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 327–345, 2001.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; PETENATE, A. J.; ROIG, S. M. Avaliação do rendimento do queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 492–499, 2003.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Avaliação da textura do queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 343, p. 3–12, 2005.

SPIZZIRRI, U. G.; RESTUCCIA, D.; CURCIO, M.; PARISI, O. I.; IEMMA, F.; PICCI, M. Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 43–51, fev. 2013.

STANDAROVÁ, E.; BORKOVCOVÁ, I.; DUŠKOVÁ, M.; PŘIDALOVÁ, H.; DRAČKOVÁ, M.; VORLOVÁ, L. Effect of some factors on the biogenic amines and polyamines content in blue-veined cheese Niva. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, n. special issue, p. S410–S413, 2009.

STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic-amines in cheese and other fermented foods - A review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 6, p. 460–470, 1991.

SUZZI, G.; SACCHETTI, G.; PATRIGNANI, F.; CORSETTI, A.; TOFALO, R.; SCHIRONE, M.; FASOLI, G.; GARDINI, F.; PERPETUINI, G.; LANCIOTTI, R. Influence of pig rennet on fatty acid composition, volatile molecule profile, texture and sensory properties of Pecorino di Farindola cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 11, p. 2252–2263, 2015.

TEICHMANN, F.; RAMOS, C.; RICHARDS, N. S. P. S. Avaliação dos índices de

- profundidade e extensão da maturação de queijos azuis. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. Anais do X, n. 333, p. 257–260, 2003.
- THORNTON, J. M.; OSBORNE, D. L. Antioxidant function of polyamines in human colon cancer cells demonstrated by fluorescence. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 692.15, p. 71–73, 2012.
- TORRACCA, B.; PEDONESE, F.; LÓPEZ, M. B.; TURCHI, B.; FRATINI, F.; NUVOLONI, R. Effect of milk pasteurisation and of ripening in a cave on biogenic amine content and sensory properties of a Pecorino cheese. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 189–195, 2016.
- TOSI, F.; SANDRI, S.; TEDESCHI, G.; MALACARNE, M.; FOSSA, E. Variazioni di composizione e proprietà fisico-chimiche del Parmigiano-Reggiano. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 59, n. 6, p. 507–528, 2008.
- TUBEROSO, C. I. G.; CONGIU, F.; SERRELI, G.; MAMELI, S. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. **Food Chemistry**, v. 175, p. 29–35, 2015.
- TUNICK, M. H. Activation energy measurements in rheological analysis of cheese. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 10, p. 680–685, 2010.
- UBALDO, J. C. S. R.; CARVALHO, A. F.; FONSECA, L. M.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines in Mozzarella cheese from milk with varying somatic cell counts. **Food Chemistry**, v. 178, p. 229–235, 2015.
- URBACH, G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 8, p. 877–903, 1995.
- VALE, S.; GLÓRIA, M. B. A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 343–348, 1998.
- VLAHOVIC, B.; POPOVIC-VRANJES, A.; MUGOŠA, I. International cheese market – Current state and perspective. **Economic Insights – Trends and Challenges**, v. 3, n. 1, p. 35–43, 2014.
- VOIGT, D. D.; CHEVALIER, F.; QIAN, M. C.; KELLY, A. L. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 68–77, 2010.
- VOIGT, M. N.; EITENMILLER, R. R.; KOEHLER, P. E.; HAMDY, M. K. Tyramine, histamine, and tryptamine content of cheese. **Journal of Milk Food Technology**, v. 37, n. 7, p. 377–381, 1974.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y Física Lactológica** (Acribia, Ed.) Zaragoza, 1984.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. [s.l.] Taylor & Francis, 2006.
- WOLFSCHOON POMBO, A. F.; LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em queijo minas frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 44, n. 261–266, p. 50–54, 1989.
- YVON, M.; RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4–7, p. 185–201, 2001.

ZARMPOUTIS, I. V.; McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Proteolysis in blue-veined cheese: An intervarietal study. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 36, n. 2, p. 219–229, 1997.

ZOCCAL, R. Queijos: produção e importação. **Revista Balde Branco**, 2016.

ZULJAN, F. A.; MORTERA, P.; ALARCÓN, S. H.; BLANCATO, V. S.; ESPARIZ, M.; MAGNI, C. Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. **International Dairy Journal**, v. 62, p. 53–62, 2016.

Aminas bioativas em queijos

Gisela de Magalhães Machado Moreira¹, Flávia Beatriz Custódio²,
Maria Beatriz Abreu Glória³

Resumo - Aminas bioativas são compostos com funções metabólicas e fisiológicas nos organismos vivos. Pelo fato de algumas aminas serem formadas por microrganismos, a presença e o perfil de aminas bioativas podem indicar a qualidade da matéria-prima e as condições higiênico-sanitárias prevalentes na produção de queijos e outros alimentos. Além disso, algumas dessas substâncias, em concentrações elevadas, podem causar efeitos adversos à saúde humana. Estudos nacionais e internacionais vêm sendo realizados para aumentar o conhecimento sobre os fatores que interferem na produção e no acúmulo de aminas bioativas em queijos.

Palavras-chave: Amina biogênica. Aminoácido. Indicadores de qualidade. Toxicidade. Queijo. Proteólise.

INTRODUÇÃO

Aminas são compostos nitrogenados de caráter básico, nos quais um, dois ou três átomos de hidrogênio na amônia são substituídos por grupos alquila ou arila (SHALABY, 1996).

Aminas bioativas ou biologicamente ativas são aquelas que possuem funções metabólicas e fisiológicas nos organismos vivos, incluindo funções cruciais em células eucarióticas e, por serem produzidas por rotas metabólicas usuais de animais, plantas e microrganismos, estão presentes também nos alimentos (GLÓRIA, 2005; ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014).

As aminas bioativas podem ser classificadas quanto ao número de grupos amino, ao tipo de estrutura e às funções fisiológicas ou biossíntese, sendo esta última classificação a mais adotada. Dessa forma, quanto à rota biossintética, as aminas bioativas podem ser classificadas em poliaminas (espermidina e espermina) e aminas biogênicas (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, cadaverina) (GLÓRIA, 2005). A Figura 1 apresenta

rotas metabólicas para a formação de algumas aminas bioativas.

Já as poliaminas consistem em espermidina e espermina, sendo a putrescina o intermediário obrigatório em sua biossíntese (KALÁČ, 2014). Essas aminas são fatores essenciais na proliferação e diferenciação celular (GLÓRIA, 2005; KALÁČ, 2014). São amplamente encontradas em alimentos de origem vegetal e animal, incluindo leite e derivados.

As aminas biogênicas são derivadas da descarboxilação de aminoácidos pela ação de enzimas, chamadas aminoácido descarboxilases, que estão presentes em culturas iniciadoras ou contaminantes (ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014).

As aminas biogênicas são relevantes do ponto de vista sanitário e toxicológico, podendo indicar a qualidade da matéria-prima e as condições higiênico-sanitárias prevalentes na produção de alimentos. Algumas aminas, quando em concentrações elevadas, podem causar efeito adverso à saúde humana. As aminas biogênicas estão envolvidas como agentes causadores em

vários casos de intoxicação. Também são capazes de iniciar várias reações farmacológicas, por suas ações vasoativas ou neuroativas (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005; SCIENTIFIC..., 2011).

Por outro lado, as poliaminas são fatores de crescimento, desempenhando papel relevante na síntese de proteínas e, portanto, no crescimento dos microrganismos presentes no queijo (ÖNAL, 2007). Estudos têm demonstrado que as poliaminas podem prevenir danos mediados pelo oxigênio e que têm função antioxidante em células gastrointestinais (THORNTON; OSBORNE, 2012).

Os queijos constituem um ambiente ideal para a formação dessas aminas, pela presença de aminoácidos livres e de bactérias capazes de promover a sua descarboxilação, além de outros fatores, como pH, concentração salina, atividade de água, temperatura e tempo de estocagem/maturação, densidade bacteriana e a presença do cofator piridoxal fosfato (VALE; GLÓRIA, 1998; ROIG-SAGUÉS; MOLINA; HERNÁNDEZ-HERRERO, 2002;

¹Eng^a Alimentos, Doutoranda Ciência de Alimentos, Pesq./ProF EPAMIG-ILCT, Juiz de Fora, MG, giselammachado@epamig.br

²Farmacêutica-bioquímica, Pós-Doutoranda UFMG - Faculdade de Farmácia/Bolsista CNPq, Belo Horizonte, MG, flaviabcustodio@gmail.com

³Eng^a Alimentos, Ph.D., ProF Tit. UFMG - Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, MG, mbeatriz@gmail.com

PARÂMETROS DE DESEMPENHO EM MÉTODO UHPLC-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES E AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS MUSSARELA, PRATO, PARMESÃO E GORGONZOLA

Performance parameters of a UHPLC-UV method for quantification of free amino acids and bioactive amines in Mozzarella, Prato, Parmesan and Gorgonzola cheeses

Gisela de Magalhães Machado Moreira^{1}, Denise Sobral¹, Renata Golin Bueno Costa¹,
Junio César Jacinto de Paula¹, Christian Fernandes², Maria Beatriz Abreu Glória²*

RESUMO

Foram apresentados parâmetros de desempenho para um método de cromatografia líquida de ultra eficiência para a determinação de 19 aminoácidos, 10 aminas bioativas e o íon amônio nos queijos Parmesão, Gorgonzola, Prato e Mussarela. As curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação $\geq 0,97$. O método foi seletivo para todos os analitos nos quatro tipos de queijo. Os coeficientes de variação (repetitividade) encontraram-se todos abaixo de 10%. A recuperação dos compostos foi superior a 70% em mais de 76% das determinações. O queijo que apresentou melhores índices de recuperação foi o Prato. Os menores limites de detecção e quantificação encontrados foram para a glutamina, 0,07 e 0,22 mg/100 g respectivamente, enquanto os maiores foram para o ácido aspártico, 0,81 e 2,46 mg/100 g. Desta forma o método é adequado para determinação dessas substâncias nos queijos estudados.

Palavras-chave: proteólise; validação; efeito matriz; queijo brasileiro.

1 Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Instituto de Laticínios Cândido Tostes (EPAMIG/ILCT), Rua Tenente Luiz de Freitas, 116, 36045-560, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: giselammachado@hotmail.com

2 Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Belo Horizonte, MG, Brasil.

* Autor para correspondência.

Recebido / Received: 30/01/2018

Aprovado / Approved: 18/02/2018



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese



Gisela M.M. Moreira^{a,b}, Renata G.B. Costa^b, Vanessa A.M. Teodoro^c, Junio C.J. Paula^b, Denise Sobral^b, Christian Fernandes^a, Maria Beatriz A. Gloria^{a,*}

^a LBqA - Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Tyramine
Histamine
Safety
Serine
Cohesiveness

ABSTRACT

The effect of ripening time on Gorgonzola-type cheeses at $12 \pm 2^\circ\text{C}$ was investigated. Proteolysis indexes, free amino acids and bioactive amines increased throughout ripening. However, cohesiveness and lactic acid bacteria counts decreased; whereas pH, total protein, total mesophilic aerobic bacteria counts, and other instrumental texture parameters did not change. Valine, lysine, leucine and phenylalanine were the most abundant free amino acids throughout ripening. Glycine, histidine and isoleucine were first detected on the 21st day and aspartic acid and glutamine on the 28th after perforation. The levels of most amino acids increased, except serine that decreased and tyrosine remained constant. Among amines formed during ripening, tyramine and agmatine were first detected on the 21st day, serotonin on the 42nd and histamine and tryptamine on the 49th. On the 21st day, tyramine reached contents which could be of health concern for individuals taking classical monoamine oxidase inhibitor drugs. Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis showed that proteolysis (extend and depth indexes) and free amino acid profile are suitable markers for ripening assessment of Gorgonzola-type cheese. They were also able to assess cheese characteristics, quality and safety.

1. Introduction

Cheese, the fresh or matured product obtained from the coagulation of milk, is widely consumed around the world and plays an important role in human nutrition. It is easily digestible and rich in nutritional components, and therefore, it constitutes an important source of proteins, short-chain fatty acids, vitamins, and minerals (Santiago-Lopes et al., 2018). Although exceptional progress has been made in cheese making, there is still a need to establish parameters to consistently characterize the several different types of cheese (Johnson, 2017).

Gorgonzola is one of the world's oldest blue-veined cheeses. The cheese is mainly produced in Northern Italy, and it generally takes three to four months to attain full ripeness. The cheese has a crumbly and soft texture, nutty aroma and mild to sharp taste. It is extensively used in cooking and gourmet dishes all over the world (Fernández-Salguero, 2004). The production and consumption of Gorgonzola-type and other special cheeses in Brazil increased significantly from 2006 to 2012, which represents a new and promising market to dairy products and also another source of dairy proteins into the diet (Franco, 2013).

Penicillium roqueforti, a saprophytic fungus, grows internally in the fissures of the cheese or in the perforations formed after salting (Cantor, van den Tempel, Hansen, & Ardö, 2004). The desired texture, flavor and aroma results from biochemical changes during cheese production and ripening. Proteolysis is the most intricate event which takes place by the action of natural milk proteases, of added rennet, starter and secondary cultures, and enzymes (Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney & O'Mahony, 2015). It is responsible for changes in the protein matrix, modifying its texture and increasing pH (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001). It is also responsible for the release of amino acids, which are precursors of bioactive amines. Therefore, cheeses are ideal environments for the formation of amines (Gloria, 2006; Vale & Gloria, 1998). The profile and levels of bioactive amines in cheeses are dependent upon the amount of protein in the raw material, the proteolytic activity of enzymes used during manufacture, microorganisms present in the cheese, the existence of amino acid decarboxylase activity, and the cofactor pyridoxine phosphate (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014; Yvon & Rijnen, 2001).

Bioactive amines, at low levels, can impart functional and flavor

* Corresponding author. LBqA - Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

E-mail address: mbeatriz@ufmg.br (M.B.A. Gloria).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.026>

Received 15 July 2018; Received in revised form 9 September 2018; Accepted 11 September 2018

Available online 12 September 2018

0023-6438/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO IV

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS



**31º CONGRESSO
NACIONAL DE LATICÍNIOS**



AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS PARMESÃO RALADOS

Gisela de Magalhães Machado Moreira⁽¹⁾, Maria Beatriz de Abreu Glória⁽²⁾

⁽¹⁾ Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG, Brasil, giselammachado@epamig.br

⁽²⁾ Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, MG, Brasil, mbeatriz@ufmg.br

Resumo

Aminas bioativas, em especial as biogênicas, estão envolvidas como agentes causadores em vários casos de intoxicação e podem ser utilizadas como indicadores de qualidade higiênico-sanitário em alimentos. Queijo Parmesão ralado é um produto muito consumido no País e está sujeito a inconformidades e fraudes. Isto posto, foi realizada a determinação de aminas bioativas em queijos Parmesão ralados de 19 marcas encontradas no mercado de Belo Horizonte, MG, e São Paulo, SP, por cromatografia líquida de alta eficiência – par iônico. Os resultados mostraram que as aminas mais prevalentes foram tiramina, putrescina, cadaverina e histamina, estando presentes em mais de 80% das amostras analisadas, com destaque para histamina que obteve a maior média e também o maior valor máximo encontrado em uma amostra. Sugere-se que indivíduos sensíveis consumam este tipo de produto com ressalvas, visto que a quantidade média encontrada de aminas totais pode causar reações toxicológicas neste grupo da população.

Palavras-chave: aminas biogênicas, CLAE, histamina.

Introdução

Aminas bioativas são moléculas orgânicas nas quais um ou mais hidrogênios da amônia são substituídos por radicais diversos, e possuem atividade metabólica nos organismos vivos, estando presentes também em alimentos (Shalaby, 1996, Glória, 2006; Alvarez et al., 2014). Dentre as diversas classificações que podem ser feitas, é mais usual dividir as aminas bioativas em dois grupos, distintos entre si pelas rotas biossintéticas: poliaminas e aminas biogênicas (Glória, 2006). As poliaminas (espermidina e espermina) são fatores de crescimento, desempenhando papel relevante na síntese de proteínas e, portanto, no crescimento dos microrganismos presentes no

queijo (Önal, 2007; Kalač, 2014). Já as aminas biogênicas são derivadas da descarboxilação de aminoácidos pela ação de enzimas, chamadas aminoácido descarboxilases, presentes em culturas iniciadoras ou contaminantes (Alvarez et al., 2014). São relevantes do ponto de vista sanitário e toxicológico, podendo indicar a qualidade da matéria prima e as condições higiênico-sanitárias prevalentes na produção de alimentos, além de poder causar efeitos adversos à saúde quando em concentrações elevadas, por suas ações vasoativas ou neuroativas. Queijos possuem ambiente ideal para produção de aminas biogênicas (Shalaby, 1996; Glória, 2006; EFSA, 2011).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijos ralados (Brasil, 1997) define este produto como sendo aquele obtido por esfarelamento ou ralagem da massa de uma ou até quatro variedades de queijos de baixa umidade aptos para o consumo humano, podendo ser parcialmente desidratado ou não. Sendo de apenas uma variedade ou pelo menos com 75% de um tipo de queijo, o queijo ralado deve conter no rótulo o nome do queijo predominante (Brasil, 1997). O queijo Parmesão é o primeiro dentre as variedades de queijos especiais mais consumidos no Brasil, podendo ser comercializado sob formas íntegras e fracionadas; entretanto, é geralmente consumido pela população na forma ralada (Barros et al., 2011). É um produto que apresenta níveis elevados de não conformidades, oferecendo riscos à saúde pública (Pimentel et al., 2002; Nunes et al., 2015). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo verificar a presença e quantidade de aminas bioativas em queijos tipo Parmesão ralados disponíveis no mercado de Belo Horizonte, MG, e São Paulo, SP.

Material e Métodos

Foram adquiridas 34 amostras de queijos tipo Parmesão ralado de 19 marcas diferentes (15 marcas com 2 lotes e 4 marcas com 1 lote) em mercados de Belo Horizonte, MG, e São Paulo, SP, no ano de 2014. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade Farmácia, UFMG. Todos os reagentes e padrões utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico, conforme sua aplicação.

A extração das aminas nos queijos foi realizada conforme descrito em Custódio et al. (2007). A separação de nove aminas bioativas nos extratos foi feita em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de par iônico, utilizando coluna de fase reversa C18. As aminas foram detectadas fluorimetricamente após derivação pós-coluna com *orto*-ftalaldeído (OPA), de acordo com Rigueira et al. (2011). A identificação das aminas foi realizada por comparação dos tempos de retenção de aminas em amostras com as de

soluções padrão e pela adição da amina suspeita à amostra. Os níveis de amina foram calculados por interpolação direta em curvas de calibração externas.

Resultados e Discussão

Para indivíduos saudáveis e que não fazem uso de medicamento do tipo inibidores de mono-amino-oxidases (IMAO), o nível aceitável em queijos para histamina é 50 a 400 mg.kg⁻¹, para tiramina 100 a 800 mg.kg⁻¹, putrescina 180 mg.kg⁻¹ e cadaverina 540 mg.kg⁻¹ (Benkerroum, 2016). Considerando estes limites, os queijos analisados estão dentro dos níveis aceitáveis para as aminas citadas (Tabela 1), porém algumas amostras apresentam valores relativamente altos em relação aos demais, principalmente para histamina e cadaverina. Pessoas sensíveis ou que fazem uso de medicamentos tipo IMAO podem apresentar reações toxicológicas ao consumir estes produtos, visto que o limiar de toxicidade de aminas biogênicas é muito menor para esse grupo da população (Glória, 2006).

Tabela 1. Aminas bioativas em queijos tipo Parmesão ralados.

Aminas bioativas (mg.kg ⁻¹)	% Positivo	Varição	Média ± desvio padrão
Tiramina	95	nd-92,2	31,6±26,3
Putrescina	84	nd-77,8	19,1±21,1
Cadaverina	95	nd-125,0	32,3±38,4
Histamina	95	nd-214,9	49,1±55,3
Serotonina	0	nd	0
Agmatina	79	nd-8,3	1,8±2,2
Espermidina	16	nd-2,3	0,2±0,6
2-Feniletilamina	16	nd-4,2	0,5±1,2
Triptamina	42	nd-13,8	1,8±4,0
Aminas Totais	-	nd-503,6	136,2±129,1

As aminas mais prevalentes foram tiramina, putrescina, cadaverina e histamina, estando presentes em mais de 80% das amostras analisadas, com destaque para histamina que obteve a maior média e também o maior valor máximo encontrado em uma amostra. Além disso, a presença de cadaverina em 95% das amostras é um sinal de alerta pois esta amina não está presente naturalmente no leite e por ser produzida por enterobactérias é um indicativo de possível contaminação (Glória, 2006).

Vale e Glória (1998) avaliaram 8 amostras de queijo Parmesão ralado e encontraram 127,6±120,6 mg.kg⁻¹ de aminas totais, e histamina, tiramina, putrescina, cadaverina e espermina estavam presentes em todas as amostras analisadas. Coelho et al. (2000) avaliaram 6 marcas (5 lotes de cada marca) de queijo ralado e encontraram

predominantemente histamina, tiramina e cadaverina, enquanto serotonina, agmatina, espermidina, triptamina, feniletilamina e espermina estavam presentes em valores baixos. Estes estudos mostraram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, concernente à prevalência de aminas, quantidade e alto desvio padrão das médias, característico dessa determinação devido a heterogeneidade das amostras disponíveis no mercado.

Conclusões

O elevado desvio padrão das amostras demonstra a alta desigualdade dos produtos disponíveis no mercado, embora os queijos ralados devam seguir uma legislação comum concernente a padrões físico-químicos e microbiológicos. Além disso, a alta variabilidade demonstra que a presença das aminas bioativas pode ser controlada neste produto, e a presença de cadaverina na maior parte das amostras pode ser um indicativo de condições higiênico-sanitárias de fabrico inadequadas. Indivíduos sensíveis devem consumir queijos Parmesão ralados com parcimônia devido ao elevado teor de aminas totais, sobretudo de histamina.

Agradecimentos

A primeira autora agradece à FAPEMIG pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

Referências

- ALVAREZ, M. A.; MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, p. 146-155, 2014.
- BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JÚNIOR, L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Queijo Parmesão caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n.2, p. 285-294, 2011.
- BENKERROUM, N. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4., p.801-826, 2016
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 353, de 4 de setembro de 1997. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1997.
- COELHO, A. F. S, PIMENTEL, E. F.; DIAS, R. S.; GLORIA, M. B. A. Aminas bioativas como critério de qualidade de queijo ralado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, n.315, p. 180-184, 2000.
- CUSTÓDIO, F. B.; TAVARES, E.; GLÓRIA, M. B. A. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p. 280-288, 2007.

EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n.10, 2011.

GLÓRIA, M. B. A. Capítulo 13 - Bioactive amines. In: HUI, Y. H. (editor). **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**, v. 1, p. 13.1–13.38, 2006.

KALAČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: a review for the period 2005–mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

NUNES, A. C. M.; PAIVA, J. E.; CORTEZ, N. M. S.; NÓBREGA, I. C. C.; SIMÕES, R. O. Qualidade físico-química e microbiológica de queijos ralados comercializados em Recife-PE, Brasil. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 1, p. 25-31, 2015.

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

PIMENTEL, E. F.; DIAS, R. S.; RIBEIRO-CUNHA, M.; GLÓRIA, M. B. A. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22., n. 3, p. 289-294, 2002.

RIGUEIRA, J. C. S.; RODRIGUES M. I.; GLORIA, M. B. A. Optimization of the analytical extraction of polyamines from milk. **Talanta**, v. 86, p. 195-199, 2011.

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

VALE, S.; GLÓRIA, M. B. A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. **Food Chemistry**, v.63, n.3, p. 343-348, 1998.



INFLUENCE OF REFRIGERATED STORAGE ON PROTEOLYSIS AND TEXTURE OF MOZZARELLA CHEESE

MOREIRA^{1,2}, G. M. M.; TEODORO³, V. A. M.; COSTA⁴, R. G. B.; PAULA⁵, J. C. J.; SOBRAL⁶, D.; GLÓRIA², M. B. A.



¹Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais /Instituto de Laticínios Cândido Tostes – Minas Gerais, giselammachado@epamig.br

²Universidade Federal de Minas Gerais /Faculdade de Farmácia – Minas Gerais, mbeatriz@ufmg.br

³Universidade Federal de Juiz de Fora /Departamento de Medicina Veterinária – Minas Gerais, vanessa.teodoro@ufjf.edu.br

⁴Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais Gerais /Instituto de Laticínios Cândido Tostes – Minas Gerais, renata.costa@epamig.br

⁵Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais Gerais /Instituto de Laticínios Cândido Tostes – Minas Gerais, junio@epamig.br

⁶Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais Gerais /Instituto de Laticínios Cândido Tostes – Minas Gerais, denisesobral@epamig.br

Keywords: free amino acids, bioactive amines, principal component analysis

Proteolysis is the most complex biochemical event that occurs during cheese maturation and it strongly affects the characteristics of the final product. Cheese texture is modified due to casein matrix hydrolysis. The amino acids generated are the main precursors of aroma compounds and are also substrate for biogenic amines, with potential toxicological effects. This work aimed to assess the changes in proteolysis in terms of extent and depth indexes, free amino acid and bioactive amines profiles, and Texture Profile Analysis of mozzarella cheese, the most consumed cheese in Brazil, throughout its refrigerated storage. Cheeses were manufactured (3 replicates), stored at 12 °C and analyzed by UPLC-UV simultaneously for 19 amino acids, ammonium ion and 10 bioactive amines, in addition to pH assessment and determination of total and soluble nitrogen at pH 4.6 and 12% TCA by Kjeldahl in 6 storage times within 85 days. Extension and depth indexes increased over time, reaching, respectively, 13.4% and 7.1% at 85 days. Gumminess and chewiness reduced with the storage time, whereas hardness, elasticity, cohesiveness and adhesiveness did not change significantly. Glutamic acid, arginine, lysine, and leucine were predominant among amino acids. The only amine present was tyramine showing up on 57 storage day. PCA determined two major components explaining 70.8% of the data set variation, one corresponded to cheeses up to 43 days of storage, and the other corresponded to cheeses from 57 to 85 days. PC1 showed higher correlation with amino acid contents and proteolysis depth index, while PC 2 was more correlated with texture parameters and pH. These results suggest that intrinsic and quality characteristics of mozzarella cheese undergo significant changes during refrigerated storage. In addition, these data can be used as an instrument for classification, characterization, and standardization of the product, and also from public health point of view.