

**JULIANA CRISTINA SAMPAIO RIGUEIRA**

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS  
SOMÁTICAS NO PERFIL E TEORES DE AMINAS  
BIOATIVAS E NA QUALIDADE DE LEITE CRU E  
DE QUEIJO MUSSARELA**

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2010

**JULIANA CRISTINA SAMPAIO RIGUEIRA**

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS  
SOMÁTICAS NO PERFIL E TEORES DE AMINAS  
BIOATIVAS E NA QUALIDADE DE LEITE CRU E  
DE QUEIJO MUSSARELA**

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 doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA – DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**JULIANA CRISTINA SAMPAIO RIGUEIRA**

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO  
PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS E NA QUALIDADE DE  
LEITE CRU E DE QUEIJO MUSSARELA**

**TESE APROVADA EM 20 DE DEZEMBRO DE 2010**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof. Dr. ANTÔNIO FERNANDES DE CARVALHO**

**Profa. Dra. FLÁVIA BEATRIZ CUSTÓDIO**

**Prof. Dr. ROGÉRIO MARCOS DE SOUZA**

**Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA**

**Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA**  
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais Ana e Paulo,  
aos meus irmãos Ana Paula, Cláudio e João  
Paulo e aos meus sobrinhos Larissa e Lucas.

# AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante na minha vida.

Aos meus pais Ana e Paulo, pela dedicação, paciência, incentivo e amor incondicional. Aos meus irmãos, Ana Paula, Cláudio e João Paulo e aos meus sobrinhos Lucas e Larissa, pelo carinho e apoio.

Ao Daniel pelo amor, incentivo e compreensão.

À professora Dr<sup>a</sup> Maria Beatriz Abreu Glória, pela amizade, oportunidade de aprendizado e orientação em todas as etapas da realização deste trabalho.

À professora Maria Isabel Rodrigues, pela atenção, ensinamentos e dedicação no planejamento experimental e análise dos dados.

Aos professores Leorges Moraes da Fonseca e Antônio Fernandes de Carvalho por disponibilizarem os laboratórios para realização das análises e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Luiz Antonio Minim e Letícia Malta pelas contribuições no planejamento experimental.

Às professoras Scheilla V.C.S. Ferreira, Renata Adriana Labanca e aos funcionários do Laboratório de Bromatologia Marcos e Ronália pela amizade, incentivo e atenção.

Aos colegas do LBqA, Adriana C. Mendonça, Aline M. Nachtigall, Ana Alice M. Pereira, Ana Amélia P. Almeida, Ana Carolina C. L. Martins, Bruno M. Dala Paula, Bruno Botelho, Caroline de Paiva, Cecília M. Bandeira, Cyntia K. B. Batista, Fabiane F. Silva, Flávia Mendes, Guilherme C. L. dos Reis, Janice M. Gouvea, Kátia F. Fraga, Larissa Bomtempo, Letícia R. Guidi, Mariana F.O. Prates, Patrícia A. V. de Barros, Patrícia Amaral, Pedro Prates, Priscila S. Sabaini, Raquel M. A. Rostagno, Regina C. Adão, Rummenigge Oliveira, Sílvia M. Vieira, Tarliane M. da Silva, Tânia M. L. Oliveira, Valdirene Neves e Warley P. Evangelhista pelo convívio, amizade, momentos agradáveis, sugestões e colaboração durante a realização do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Leite e Derivados, em especial a Jéssica Yoko Suda e Rosângela de Freitas pela dedicação e contribuição na realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

A todos os funcionários do Laboratório da Qualidade do Leite pelo apoio na realização das análises das amostras de leite.

Aos funcionários do Laticínios FUNARBE, em especial ao Oswaldo pela ajuda na elaboração dos queijos Mussarela.

A professora Ângela Lana e Danilo Bastos pelo auxílio na realização das análises estatística.

Ao professor Roberto Junqueira pela atenção e ensinamentos.

Aos professores membros da banca pelas sugestões importantes na finalização da tese.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo aprendizado.

À Leila Moreira Bittencourt, Ana Paula Lelis Rodrigues, Gisele Mendes e Aline Rodrigues pela amizade e momentos agradáveis.

Ao Roney pelas contribuições.

Aos meus familiares pelo carinho e apoio constante.

A todos os colegas da Pós-graduação em Ciência de Alimentos.

As funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação Marilene Beatriz de Souza e Úrsula Regiane Martins pela atenção, esclarecimentos e auxílio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

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

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Pág
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>1 LEITE .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 ASPECTOS ECONÔMICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2 QUEIJO MUSSARELA .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 ASPECTOS ECONÔMICOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS .....</b>	<b>23</b>
<b>3 CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE BOVINO .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 DEFINIÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 FATORES QUE AFETAM A CONCENTRAÇÃO DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS COMO ÍNDICE DE QUALIDADE .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS SOMÁTICAS NA QUALIDADE DO LEITE E QUEIJO .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO LEITE .....</b>	<b>31</b>
<b>4 PROTEÓLISE .....</b>	<b>32</b>
<b>5 AMINAS BIOATIVAS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 FORMAÇÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5.3 FUNÇÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>5.4 METABOLISMO E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS .....</b>	<b>41</b>
<b>5.5 AMINAS COMO CRITÉRIO DE QUALIDADE .....</b>	<b>44</b>
<b>5.6 AMINAS EM LEITE CRU .....</b>	<b>44</b>
<b>5.7 AMINAS EM LEITE PROCESSADO .....</b>	<b>47</b>
<b>5.8 AMINAS EM QUEIJOS .....</b>	<b>48</b>
<b>6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS À ANÁLISE DE AMINAS .....</b>	<b>51</b>
<b>6.1 EXTRAÇÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>6.2 DETECÇÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6.3 SEPARAÇÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>55</b>

<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS NO LEITE POR CLAE</b>	
<b>1 OBJETIVO .....</b>	<b>59</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1 MATERIAL .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1.1 Amostras .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1.2 Reagentes e solventes .....</b>	<b>60</b>
<b>2.1.3 Soluções .....</b>	<b>60</b>
2.1.3.1 Solução padrão das aminas .....	60
2.1.3.2 Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio .....	60
2.1.3.3 Solução derivante .....	61
<b>2.2 MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.1 Delineamento experimental .....</b>	<b>61</b>
2.2.1.1 <i>Screening</i> das variáveis que afetam a extração das aminas do leite .....	61
2.2.1.2 Otimização da condição de extração usando o ácido sulfosalicílico .....	63
<b>2.2.2 Determinação de aminas em leite bovino, leite humano e bebidas lácteas .....</b>	<b>63</b>
<b>2.2.3 Separação e determinação das aminas por CLAE .....</b>	<b>64</b>
<b>2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>65</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>3.1 SCREENING DAS VARIÁVEIS QUE AFETAM A EXTRAÇÃO DAS AMINAS DO LEITE UTILIZANDO TCA E ASS .....</b>	<b>66</b>
<b>3.2 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO O ÁCIDO SULFOSALICÍLICO .....</b>	<b>69</b>
<b>3.3 DETERMINAÇÃO DE AMINAS EM LEITE BOVINO, LEITE HUMANO E BEBIDAS LÁCTEAS .....</b>	<b>76</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA QUALIDADE E NO PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS DO LEITE CRU</b>	
<b>1 OBJETIVO .....</b>	<b>78</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>78</b>
<b>2.1 MATERIAL .....</b>	<b>78</b>
<b>2.1.1 Amostras .....</b>	<b>78</b>
<b>2.1.2 Reagentes, soluções e solvente.....</b>	<b>78</b>
<b>2.2 MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
<b>2.2.1 Determinação da contagem de células somáticas, composição centesimal e contagem bacteriana total .....</b>	<b>79</b>

2.2.2 Determinação do pH .....	79
2.2.3 Determinação da acidez titulável .....	80
2.2.4 Determinação das aminos bioativas .....	80
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	80
3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, CONTAGEM BACTERIANA TOTAL, PH E ACIDEZ	80
3.2 PERFIL E TEORES DAS AMINAS BIOATIVAS .....	83
4 CONCLUSÕES .....	84

### CAPÍTULO III

## PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS MUSSARELA COMERCIALIZADOS NO MERCADO DE BELO HORIZONTE

1 OBJETIVO .....	85
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	85
2.1 MATERIAL .....	85
2.1.1 Amostras .....	85
2.1.2 Reagentes e solventes .....	85
2.1.3 Soluções .....	86
2.1.3.1 Solução padrão das aminos .....	86
2.1.3.2 Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio .....	86
2.1.3.3 Solução derivante .....	87
2.2 MÉTODOS .....	87
2.2.1 Determinação das aminos bioativas .....	87
2.2.1.1 Extração .....	87
2.2.1.2 Separação e determinação das aminos por CLAE .....	87
2.2.2 Determinação do pH .....	89
2.2.3 Determinação do teor de umidade .....	89
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	89
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
3.1 PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA .....	89
3.2 TEORES DE AMINAS BIOATIVAS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA .....	90
3.3 UMIDADE E PH NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA .	94
3.4 CORRELAÇÃO DOS TEORES DE UMIDADE E PH COM AS AMINAS BIOATIVAS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA	95
4 CONCLUSÕES .....	99

## **CAPÍTULO IV**

### **INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA QUALIDADE E NO PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS DO QUEIJO MUSSARELA**

<b>1 OBJETIVO .....</b>	<b>100</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>100</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>100</b>
2.1.1 Amostras .....	100
2.1.2 Reagentes, solventes e soluções .....	101
2.1.3 Coadjuvantes tecnológicos .....	101
<b>2.2 MÉTODOS .....</b>	<b>101</b>
2.2.1 Elaboração dos queijos Mussarela .....	101
2.2.2 Determinação da contagem de células somáticas pelo Wisconsin mastitis test .....	106
2.2.3 Determinação da contagem de células somáticas e composição centesimal .....	106
2.2.4 Determinação da contagem bacteriana total .....	106
2.2.5 Determinação dos parâmetros físico-químicas e microbiológicos .....	107
2.2.6 Determinação dos micro-organismos proteolíticos .....	108
2.2.7 Determinação das aminos bioativas .....	108
<b>2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>109</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>110</b>
<b>3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, PH, ACIDEZ, CONTAGEM BACTERIANA TOTAL E AMINAS BIOATIVAS DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU COM DIFERENTES CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....</b>	<b>110</b>
<b>3.2 ACIDEZ, PH E MICRO-ORGANISMOS PROTEOLÍTICOS DAS AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO .....</b>	<b>113</b>
<b>3.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, PH, ACIDEZ E AMINAS BIOATIVAS DAS AMOSTRAS DE SORO .....</b>	<b>114</b>
<b>3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, E PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS DOS QUEIJOS MUSSARELA...</b>	<b>116</b>
<b>3.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICRO-ORGANISMOS PROTEOLÍTICOS E PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS DOS QUEIJOS MUSSARELA DURANTE O ARMAZENAMENTO .....</b>	<b>118</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>129</b>
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	 <b>130</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>		<b>Pág</b>
<b>1</b>	Produção mundial de leite de 2003 a 2010.....	21
<b>2</b>	Produção e consumo de queijos no Brasil.....	23
<b>3</b>	Percentual de amostras de leite cru de rebanhos bovinos localizados na região sudeste do Brasil que atendem os limites estabelecidos na Instrução Normativa 51/2002.....	28
<b>4</b>	Funções metabólicas e fisiológicas de aminas bioativas.....	40
<b>5</b>	Surtos de intoxicação por histamina associadas ao consumo de queijo.....	42
<b>6</b>	Efeitos tóxicos das aminas bioativas.....	43
<b>7</b>	Teores de poliaminas em leite de diferentes espécies de mamíferos.....	45
<b>8</b>	Teores médios de aminas em diferentes tipos de leite bovino coletados no mercado.....	48
<b>9</b>	Teores de aminas bioativas em diferentes tipos de queijos .....	50
<b>10</b>	Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em leite .....	53
<b>11</b>	Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em queijos .....	54
<b>CAPÍTULO I</b>		
<b>I.1</b>	Valores experimentais e os respectivos níveis codificados para as variáveis independentes usados no delineamento Plackett-Burman para extração das aminas com o ácido tricloroacético (TCA) .....	62
<b>I.2</b>	Valores experimentais e os respectivos níveis codificados para as variáveis independentes usados no delineamento Plackett-burman para extração das aminas com o ácido sulfosalicílico (ASS) .....	62
<b>I.3</b>	Valores experimentais e níveis codificados das variáveis independentes utilizados no Delineamento central composto rotacional para determinação da condição ótima de extração das aminas com o ácido sulfosalicílico .....	63
<b>I.4</b>	Gradiente de eluição na CLAE-par iônico para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação das aminas .....	65
<b>I.5</b>	Porcentagem de recuperação da extração das aminas putrescina (PUT); histamina (HIM); espermidina (EPD) e espermina (EPM) dos ensaios realizados para os dois delineamentos experimentais Plackett-Burman utilizando-se os ácidos tricloroacético e sulfosalicílico .....	67
<b>I.6</b>	Efeitos principais na porcentagem de recuperação durante a extração das aminas putrescina, histamina, espermidina e espermina utilizando os ácidos tricloroacético (TCA) e sulfosalicílico (ASS) .....	68
<b>I.7</b>	Valores codificados e as respostas da porcentagem de recuperação da putrescina, histamina, espermidina e espermina com o ácido sulfosalicílico no Delineamento central composto rotacional .....	69
<b>I.8</b>	Modelos construídos para putrescina, histamina, espermidina e espermina a partir das variáveis codificadas com os parâmetros significativos .....	70
<b>I.9</b>	Coeficiente de determinação ( $R^2$ ), F calculado ( $F_{cal}$ ), F tabelado ( $F_{tab}$ ) para as aminas extraídas segundo as condições do Delineamento central composto rotacional .....	70

		12
<b>I.10</b>	Condição de extração onde se obtém maior porcentagem de recuperação das aminas analisadas .....	75
<b>I.11</b>	Resultados experimentais e preditos obtidos na condição otimizada de extração das aminas.....	76
 <b>CAPÍTULO II</b>		
<b>II.1</b>	Composição centesimal, contagem bacteriana total (CBT), pH e acidez das amostras de leite cru com diferentes níveis de contagens de células somáticas .....	82
 <b>CAPÍTULO III</b>		
<b>III.1</b>	Gradiente de eluição na CLAE-par iônico para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação das aminas .....	88
<b>III.2</b>	Teores de aminas bioativas em queijos Mussarela adquiridos no mercado de Belo Horizonte, MG no período de outubro de 2009 a agosto de 2010 ..	92
<b>III.3</b>	Valores de umidade e pH das amostras de queijo Mussarela proveniente de leite bovino (A, B, C, D, E, F, G e H) e leite bubalino (I e J) adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de outubro de 2009 a agosto de 2010 .....	94
<b>III.4</b>	Correlação entre os teores de umidade e pH com os teores de aminas bioativas .....	97
<b>III.5</b>	Correlação entre os teores de aminas bioativas para as marcas de queijo Mussarela analisadas .....	98
 <b>CAPÍTULO IV</b>		
<b>IV.1</b>	Tipos de análises físico-químicas e microbiológicas feitas nas amostras de leite cru, leite pasteurizado e soro e as respectivas referências.....	107
<b>IV.2</b>	Tipos de análises físico-químicas e microbiológicas feitas nas amostras de queijo Mussarela e as respectivas referências .....	107
<b>IV.3</b>	Composição centesimal, pH, acidez e contagem bacteriana total (CBT) do leite cru com diferentes contagens de células somáticas, utilizando os métodos eletrônico e de referência.....	111
<b>IV.4</b>	Micro-organismos proteolíticos em amostras de leite cru com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CCS) .....	113
<b>IV.5</b>	Perfil e teores de aminas bioativas nas amostras de leite cru com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CCS).....	113
<b>IV.6</b>	Valores de acidez e pH do leite pasteurizado utilizado na elaboração dos queijos, de acordo com as faixas de contagem células somáticas.....	114
<b>IV.7</b>	Micro-organismos proteolíticos em amostras de leite pasteurizado com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CS/mL).....	114
<b>IV.8</b>	Composição centesimal, pH e acidez dos soros de queijo Mussarela produzidos a partir de leite com diferentes contagens de células somáticas.....	115
<b>IV.9</b>	Perfil e teores de aminas bioativas nas amostras de soro de queijo Mussarela produzidos a partir de leite com diferentes contagens de células somáticas (CCS).....	116
<b>IV.10</b>	Composição centesimal, pH e acidez dos queijos Mussarela produzidos com leite de diferentes faixas de contagem de células somáticas (CCS)....	117
<b>IV.11</b>	Perfil e teores de aminas bioativas nos queijos produzidos com leites de diferentes faixas de contagem de células somáticas.....	118
<b>IV.12</b>	Valores de umidade, acidez, pH e proteína nas amostras de queijo	

	Mussarela com diferentes contagens de células somáticas no período de células somáticas no período de 60 dias de armazenamento.....	119
<b>IV.13</b>	Valores de índice de extensão e profundidade da proteólise nas amostras de queijo Mussarela com diferentes contagens de células somáticas no período de 60 dias de armazenamento .....	122
<b>IV.14</b>	Micro-organismos proteolíticos em amostras de queijos Mussarela com 15 e 45 dias de armazenamento, elaborados a partir de leites com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CCS).....	123
<b>IV.15</b>	Teores de aminos bioativas (mg/Kg) em amostras de queijo Mussarela elaborado a partir de leite com diferentes contagens de células somáticas durante o período de armazenamento de 60 dias.....	126

## LISTA DE FIGURAS

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>		<b>Pág</b>
<b>1</b>	Projeções de produção e consumo de leite fluido - 2008/09 a 2019/20.....	22
<b>2</b>	Destino do leite com Serviço de Inspeção Federal (SIF) no Brasil em 2007..	22
<b>3</b>	Representação esquemática dos conceitos de extensão e profundidade da proteólise.....	34
<b>4</b>	Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.....	35
<b>5</b>	Estrutura química de algumas aminas bioativas.....	36
<b>6</b>	Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido.....	37
<b>CAPÍTULO I</b>		
<b>I.1</b>	Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise das aminas bioativas.....	64
<b>I.2</b>	Valores experimentais <i>versus</i> valores preditos pelo modelo para as aminas putrescina (a), histamina (b), espermidina (c) e espermina (d).....	71
<b>I.3</b>	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a putrescina em função do número de extrações e da concentração do ácido (a) e (b), do tempo de agitação e número de extrações (c) e (d), da concentração do ácido e do tempo de agitação (e) e (f).....	73
<b>I.4</b>	Porcentagens de recuperação de histamina em função do número de extrações.....	74
<b>I.5</b>	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a espermidina em função da concentração do ácido e do número de extrações (a) e (b).....	74
<b>I.6</b>	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a espermina em função do tempo de agitação e número de extrações (a) e (b).....	75
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>II.1</b>	Valores das contagens de células somáticas (CCS) obtidos nas amostras de leite cru.....	81
<b>II.2</b>	Cromatogramas de amostras de leite cru com contagens de células somáticas (CS/mL) < 400.000 (A), 451.000 a 750.000 (B) e > 751.000 (C)...	84
<b>CAPÍTULO III</b>		
<b>III.1</b>	Percentual de ocorrência das aminas bioativas nas amostras de queijo Mussarela adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG.....	90
<b>CAPÍTULO IV</b>		
<b>IV.1</b>	Fluxograma do processo de elaboração do queijo Mussarela .....	103
<b>IV.2</b>	Etapas do processo de elaboração do queijo Mussarela .....	104
<b>IV.3</b>	Contagens de células somáticas das amostras de leite cru utilizadas para elaboração dos queijos Mussarela de acordo com o equipamento eletrônico (a) e o <i>Wisconsin mastitis test</i> (b).....	110
<b>IV.4</b>	Valores de pH dos queijos Mussarela em função dos dias de armazenamento.....	120
<b>IV.5</b>	Índices de extensão e profundidade da proteólise dos queijos Mussarela em função dos dias de armazenamento.....	123
<b>IV.6</b>	Exemplo de colônias típicas de micro-organismos proteolíticos obtidas em uma amostra de queijo Mussarela utilizando o meio Agar-padrão crescido	124

de leite em pó reconstituído a 10%.....	
<b>IV.7</b> Teores totais (mg/Kg) de aminos biogênicos e poliaminas nos queijos Mussarela obtidos a partir de leite com contagens de células somáticas baixa (a), média (b) e alta (c), durante o período de armazenamento de 60 dias .....	128

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	- Agmatina
ASS	- Ácido sulfosalicílico
CAD	- Cadaverina
CCS	- Contagem de células somáticas
UE	- União Européia
CBT	- Contagem bacteriana total
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	- Coeficiente de variação
DAO	- Diaminoxidase
DDCR	- Delineamento central composto rotacional
DQCI	- <i>Dairy Quality Control Inc.</i>
DP	- Desvio-padrão
EPD	- Espermidina
EPM	- Espermina
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FEM	- Feniletilamina
HIM	- Histamina
IEP	- Índice de extensão da proteólise
IPP	- Índice de profundidade da proteólise
IN	- Instrução Normativa
LBqA	- Laboratório de Bioquímica de Alimentos
LabUFMG	- Laboratório da Qualidade do Leite da Universidade Federal de Minas Gerais
MAO	- Monoaminoxidase
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NS	- Nitrogênio solúvel
NNP	- Nitrogênio não protéico
ODC	- Ornitina descarboxilase
OPA	- <i>orto</i> -ftalaldeído
PAO	- Poliaminoxidase
PB	- Plackett-Burman
PCA	- Ácido perclórico
PUT	- Putrescina
SAM	- S-adenosil metionina
SRT	- Serotonina
TCA	- Ácido tricloroacético
TIM	- Tiramina
TRM	- Triptamina
UV	- Ultra-violeta
UAT	- Ultra alta temperatura
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	- Universidade Federal de Viçosa

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos otimizar o método de extração para determinação de aminas por CLAE em leite; avaliar a influência da contagem de células somáticas (CCS) na qualidade e no perfil e teores de aminas no leite cru; verificar o perfil e teores das aminas em queijo Mussarela do mercado de Belo Horizonte, MG; e avaliar a influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminas em queijos Mussarela durante o período de 60 dias de armazenamento. O método para extração de aminas em leite foi otimizado: 40 s de agitação, quatro extrações sucessivas, 1,5% de ácido sulfosalicílico e centrifugação a 14.000 x *g* por 5 min. Esta condição proporcionou porcentagem de recuperação  $\geq 92,8\%$  e coeficiente de variação  $\leq 5,8\%$ . Nas amostras de leite cru não foram detectadas as aminas bioativas ( $< 0,05$  mg/L). Desta forma, a contagem de células somáticas não afetou o perfil e os teores das aminas analisadas. Em relação a qualidade físico-química das amostras de leite cru com diferentes contagens de células somáticas foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no teor de lactose. Nos queijos Mussarela do mercado de Belo Horizonte, MG foram encontradas todas as dez aminas investigadas em teores totais que variaram de  $< 0,5$  a 84,0 mg/Kg, sendo estes queijos considerados de boa qualidade em relação as aminas bioativas. Nos queijos Mussarela com um dia de fabricação, não foi observada influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminas bioativas. Durante o armazenamento dos queijos por 60 dias foi observado um aumento linear dos índices de extensão e profundidade da proteólise e valores de pH. Entretanto, não houve interação entre a contagem de células somáticas e estes parâmetros. Foram encontradas as aminas tiramina, serotonina, espermidina, espermina e triptamina em teores que variaram de  $< 0,5$  a 156,3 mg/Kg, porém a contagem de células somáticas não teve efeito significativo na formação destas aminas nos queijos durante o armazenamento.

**Palavras-chave:** aminas bioativas; células somáticas; otimização; leite cru; queijo Mussarela.

## ABSTRACT

**BIOACTIVE AMINES IN RAW MILK AND MOZZARELLA CHEESE: INFLUENCE OF SOMATIC CELL COUNTS.** The aims of this work were to optimize the extraction of amines from milk for HPLC determination; to investigate the influence of somatic cell counts on the quality and profile of amines in raw milk; to determine the profile and levels of amines in Mozzarella cheese from the market of Belo Horizonte, MG, Brazil; and to investigate the influence of somatic cell counts on the quality and levels of amines in Mozzarella cheeses during 60 storage days. The extraction method was optimized as follows: 40 sec of vortexing, 4 successive extractions, 1.5% sulfosalicylic acid and centrifugation at  $14.000 \times g$  for 5 min. This condition provided amines recoveries  $\geq 92.8\%$  and coefficient of variation  $\leq 5.8\%$ . No bioactive amine was detected in the raw milk samples ( $< 0.05$  mg/L). The somatic cell counts did not influence the profile and levels of the amines examined. In relation to the physico-chemical quality, SCC affected significantly ( $p < 0.05$ ) only lactose levels. Mozzarella cheese from the market of Belo Horizonte, MG, Brazil contained all ten amines investigated (total levels from  $< 0.5$  to 84.0 mg/kg). The cheese samples were of good quality in relation to bioactive amines. One day Mozzarella cheese was not affected by somatic cell counts with respect to quality and bioactive amines. During storage of the cheese made from milk with different SCC there was a linear increase in the extent and depth of proteolysis indexes and pH values; however no significant interaction was observed. Tyramine, serotonin, spermidine, spermine and tryptamine were detected in the cheese samples at levels ranging from  $< 0.5$  to 156.3 mg/kg. No significant effect of somatic cell counts was observed on the formation of these amines in cheese during 60 days storage.

**Keywords:** bioactive amines; somatic cell; optimization; raw milk; Mozzarella cheese.

## INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil apresenta importância sócio-econômica significativa, sendo considerado o sexto maior produtor mundial em 2008 (MILKPOINT, 2010). A produção e a composição do leite podem variar de acordo com a raça do animal, mudanças ambientais, alimentação, estágio de lactação e presença de infecções na glândula mamária do animal, como a mastite, o que pode causar um aumento no número de células somáticas (LANGONI, 2006, MAGALHÃES et al., 2006, NORO et al., 2006).

O leite com elevadas contagens de células somáticas tem a sua qualidade comprometida, ocorrendo alterações na sua composição e no rendimento de queijos; pois há diminuição da caseína e íons cálcio. Na produção de queijos, o elevado número de células somáticas é indesejável, pois acarreta uma diminuição no rendimento, maiores perdas de proteínas no soro, aumento da taxa de proteólise, o que pode favorecer alterações no perfil e teores de amins biogênicas. A ocorrência de elevadas concentrações das amins histamina e tiramina em leite e produtos lácteos pode ter efeito nocivo à saúde humana.

Estas amins, denominadas biogênicas, são formadas nos alimentos por reações de descarboxilação pela ação de descarboxilases sintetizadas pelos micro-organismos. Estas incluem, além da histamina e tiramina, cadaverina, agmatina, serotonina, feniletilamina, triptamina e putrescina (BARDÓCZ, 1995).

As amins biogênicas, assim como as poliaminas, fazem parte de um grupo maior denominado de amins bioativas. As poliaminas são formadas durante a biossíntese *de novo*, ou seja, a partir de uma molécula mais simples. Entre elas estão a espermidina e a espermina sendo a putrescina uma precursora obrigatória na formação das poliaminas (HALÁSZ et al., 1994; GLORIA, 2005).

Estudos realizados para avaliar o perfil e os teores de amins em leite cru apresentaram resultados controversos. GLORIA et al. (2010) verificaram uma maior concentração de espermina e putrescina em leite cru recém ordenhado. Estes resultados são diferentes daqueles relatados por MOTYL et al. (1995), que encontraram uma maior concentração de espermidina no leite cru. Há necessidade de se esclarecer o perfil e teores de amins em leite recém ordenhado.

Teores de amins biogênicas capazes de causar efeitos adversos no homem têm sido relatados em diversos tipos de queijos. A formação e o acúmulo de amins

em queijos podem ser influenciados por diversos fatores, dentre eles, a qualidade do leite, incluindo a presença de micro-organismos descarboxilase positivos, atividade proteolítica, pH, concentração de sal, tempo e temperatura de maturação, dentre outros (KALAČ & GLORIA, 2009). Estudos são necessários para estabelecer os pontos críticos na formação de aminas e acúmulo de aminas em queijos de forma a controlá-los e, desta forma, minimizar os teores de aminas biogênicas em queijos.

Dentre os queijos brasileiros com teores elevados de aminas biogênicas, tem-se o queijo Mussarela, um dos mais populares, sendo o mais consumido no Brasil (VALE & GLORIA, 1998; ABIQ, 2010). Este queijo é obtido por filagem de uma massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Este é classificado como um queijo de média (36,0 a 45,9%), alta (46,0 a 54,9%) ou muito alta umidade (não inferior a 55%) e extragordo (mínimo 60,0%), gordo (45,0 a 59,9%) e semigordo (25,0 a 44,9%) de gordura na matéria seca (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997).

O estudo da influência da contagem de células somáticas no perfil e teores de aminas bioativas no leite e queijo Mussarela poderá contribuir para a utilização de aminas como critério de qualidade do leite cru com relação a células somáticas, assim como predizer a qualidade do queijo Mussarela.

Considerando os aspectos anteriormente citados, ou seja, os dados controversos a respeito do perfil de aminas no leite bovino, e a escassez de dados sobre a influência da contagem de células somáticas na concentração de aminas do queijo Mussarela, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de elucidar estes questionamentos.

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminas bioativas em leite e em queijo Mussarela.

Os objetivos específicos foram: (i) otimizar o método de extração para determinação de aminas no leite por CLAE; (ii) avaliar a influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminas do leite cru; (iii) determinar o perfil e teores de aminas bioativas em queijos Mussarela comercializados no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG; e (iv) verificar a influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminas do queijo Mussarela durante o período de 60 dias de armazenamento.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 LEITE

#### 1.1 ASPECTOS ECONÔMICOS

O mercado do leite no Brasil tem se desenvolvido muito nos últimos anos, ocupando o sexto lugar no ranking mundial em 2008. Segundo dados apresentados pela MILKPOINT (2010) a produção passou de 22.860 mil toneladas em 2003 para 27.820 mil toneladas em 2008 (Tabela 1). No cenário nacional, a produção leiteira concentra-se na Região Sudeste, com 37% da produção, sendo que Minas Gerais responde por 28% da produção nacional com 7.657 mil toneladas em 2008.

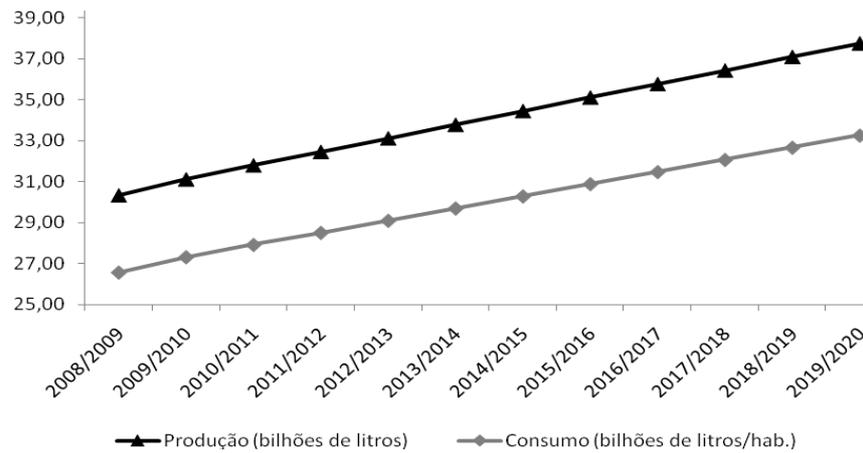
**Tabela 1** – Produção mundial de leite de 2003 a 2010

Países	Produção de leite (Mil toneladas)							
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010**
União Européia	135.069	133.969	134.672	132.206	132.604	133.848	133.800	134.000
Estados Unidos	77.289	77.488	80.255	82.455	84.211	86.179	85.820	85.230
Índia	36.500	37.500	37.520	41.000	42.890	44.500	45.865	47.670
Rússia	33.000	32.000	32.000	31.100	32.200	32.500	32.500	32.800
China	17.463	22.606	27.534	31.934	35.252	34.300	28.445	31.290
Brasil	22.860	23.317	24.250	25.230	26.750	27.820	28.795	30.235

\* Dados preliminares; \*\* Projeção

Fonte: Adaptado de MILKPOINT (2010).

De acordo com as projeções de GASQUES et al. (2010), a produção de leite deverá crescer a uma taxa anual de 1,95% no período de 2008/09 a 2018/19. Isso corresponde a uma produção de 37,8 bilhões de litros de leite cru no final do período das projeções. O consumo deverá crescer a uma taxa anual de 1,98% no período das projeções, atingindo 33,3 bilhões de litros em 2019/20 (Figura 2). Dados da EMBRAPA (2010) mostram que em 2004 o consumo de leite fluido foi de 69,2 Kg/pessoa/ano aumentando para 77,0 Kg/pessoa ano em 2007.



**Figura 1** – Projeções de produção e consumo de leite fluido - 2008/09 a 2019/20.  
Fonte: Modificado de GASQUES et al. (2010).

## 2 QUEIJO MUSSARELA

### 2.1 ASPECTOS ECONÔMICOS

O queijo representa o maior segmento do setor mundial de lácteos com 18,2 milhões de toneladas consumidas em 2008, equivalente a 39% do total (MILKPOINT, 2010). O Brasil vem seguindo esta tendência mundial, sendo 34% do leite com Serviço de Inspeção Federal (SIF) destinados a produção de queijos no ano de 2007 (Figura 1). Dentre as variedades encontradas, o queijo Mussarela apresenta um crescimento significativo na produção mundial, impulsionado pelo aumento da demanda deste como ingrediente culinário, especialmente para uso em pizza (FERREIRA, 2004; EMBRAPA, 2010).



**Figura 2** – Destino do leite com Serviço de Inspeção Federal (SIF) no Brasil em 2007.  
Fonte: EMBRAPA (2010).

Sobre a produção e consumo de queijos no Brasil, os números vêm aumentando nos últimos anos. Entre 2000 a 2007, os aumentos foram de 135 mil toneladas e 0,5 Kg/pessoa/ano, respectivamente (Tabela 2). Os queijos sob Inspeção Federal são produzidos em 23 dos 27 estados brasileiros, sendo 58% na região Sudeste e 23% na região Sul. Minas Gerais é o maior produtor de queijos, com participação de 45%, seguido do Paraná com 13% e São Paulo com 8% (MILKPOINT, 2010).

Dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ, 2010) mostram que o queijo Mussarela é o mais consumido e produzido no Brasil, com participação na produção total de 29%. Em 2004, a sua produção foi de 144.690 toneladas (EMBRAPA, 2010).

**Tabela 2** – Produção e consumo de queijos no Brasil

Ano	Produção (Mil toneladas)	Consumo (Kg/pessoa/ano)
2000	445	2,6
2001	460	2,6
2002	470	2,7
2003	460	2,5
2004	470	2,5
2005	495	2,6
2006	528	2,8
2007	580	3,1
2008*	640	3,4

\*Previsão.

Fonte: MILKPOINT (2010).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS

De origem italiana, a Mussarela era fabricada única e exclusivamente a partir de leite de búfala. Porém, devido à larga utilização na culinária, tem sido fabricada em grande quantidade, com leite de vaca (PERRY, 2004).

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade, entende-se por Mussarella o queijo obtido por filagem de uma massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Os requisitos físico-químicos, estabelecidos pela legislação, para este tipo de queijo são: umidade (máximo de 60 g/100 g) e matéria gorda no extrato seco (mínimo de 35,0 g/ 100 g) (BRASIL 1997).

A Mussarela é geralmente comercializada sob a forma retangular de diversos tamanhos e pesos. O rendimento médio varia entre 9,5 a 10,5 litros de leite para cada quilograma de queijo produzido. No Brasil, sua composição média varia entre os seguintes valores: umidade: 43 a 46%, gordura: 22 a 24%, pH: 5,1 a 5,3 e sal: 1,6 a 1,8% (FURTADO & LOURENÇO-NETO, 1994).

FURTADO (1997) caracteriza a Mussarela como sendo um queijo tipicamente de massa fermentada e filada, sendo obtida por coagulação enzimática. É consumida fresca, após passar por um período de estabilização, caracterizado principalmente por melhoria das propriedades sensorias, mediante proteólise, e equilíbrio da concentração de sal entre a superfície e o centro do queijo. Além da acidificação por fermentação láctica, são utilizados métodos químicos de acidificação, por meio de ácido láctico ou ácido cítrico (VERRUMA-BERNARDI et al., 2000; DAVE et al., 2003).

A Mussarela pertence ao grupo dos queijos de massa filada, no qual se encontram também o Provolone e o “Caccio Cavallo” (ALBENZIO et al., 2010). A etapa de filagem promove a ordenação das cadeias de proteína por ação mecânica e calor, resultando em uma estrutura alinhada e filamentosa, com camadas de soro livre e gordura emulsificada entrepostos (McMAHON, 1993).

Segundo KINDSTEDT (1993), queijos de massa filada são distinguidos por uma plasticidade única e de amassamento do coágulo fresco em água quente, o qual garante ao queijo características de estrutura fibrosa e propriedades de fusão e elasticidade.

## **3 CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE BOVINO**

### **3.1 DEFINIÇÃO**

O conjunto de células de defesa e células epiteliais presentes no leite é denominado de células somáticas (PHILPOT & NICKERSON, 1991; MACHADO et al., 1999). As células de defesa são aquelas que migram do sangue para o úbere quando este sofre agressão, como por exemplo, nos casos de infecções. Esta migração tem como objetivo combater os agentes infecciosos.

Do total das células somáticas, 75 a 98% correspondem às células de defesa, que têm a função de englobar e fagocitar os micro-organismos invasores da glândula mamária e, também, para reparação do tecido secretório mamário (LANGONI, 2006).

As células epiteliais são oriundas da descamação normal do tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária e compreendem de 2 a 25% do total de células somáticas (PHILPOT & NICKERSON, 1991; PHILPOT, 1998).

### **3.2 FATORES QUE AFETAM A CONCENTRAÇÃO DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE**

Na interpretação da CCS no leite, devem ser considerados todos os fatores que possam influenciar os resultados; porém, está bem definido que a presença de infecção da glândula mamária, denominada mastite, é o fator que mais interfere na CCS no leite (HARMON, 1994; SOUZA et al., 2005; ANDRADE et al., 2007; WELLNITZ et al., 2009).

A mastite é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Caracteriza-se por uma inflamação da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada em clínica e subclínica (RIBEIRO et al., 2003).

Segundo MAGALHÃES et al. (2006), quando na forma clínica, a mastite é de fácil diagnóstico e apresenta sinais clínicos como formação de edema no úbere, endurecimento das glândulas afetadas, aumento da temperatura do teto infectado, reação ao toque em razão da dor, além de grumos, pus e sangue no leite, que se torna mais aquoso e sofre descoloração. Porém, o tipo de mastite que mais preocupa é a subclínica, pois é difícil de ser identificada e não apresenta sintomas visíveis, tornando-se responsável por 70% das perdas econômicas decorrentes de mastite.

Sabe-se que as enzimas de origem microbiana presentes no leite não são desnaturadas no processo de pasteurização e permanecem nos produtos lácteos, diminuindo a vida de prateleira (MAGALHÃES et al., 2006). Outro fator importante é que os micro-organismos que colonizam o úbere, causando infecção na glândula mamária, podem favorecer a formação de amins biogênicas. SOMERS et al. (2003) observaram que o leite com elevada CCS é mais susceptível a atividade proteolítica, o que pode liberar aminoácidos e favorecer a formação de amins biogênicas.

Entre os micro-organismos isolados com maior frequência em vacas com mastite, destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*,

*Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (HARMON, 1994; BRITO, 2003; WHIST et al., 2009).

Além da mastite, vários fatores fisiológicos e ambientais podem influenciar a contagem de células somáticas (CCS) no leite; dentre eles, podem ser citados: estágio de lactação, idade da vaca, número de lactações, estação do ano, práticas de manejo, qualidade da ordenha, alimentação e intervalo entre as ordenhas (HARMON, 1994; MAGALHÃES et al., 2006).

Com relação ao estágio de lactação, SHELDRAKE et al. (1983) observaram grande variação da CCS no início e final do período de lactação, em vacas livres de infecção. No início, verificou-se um acréscimo na CCS devido à presença de imunoglobulinas e, conseqüentemente, de células de defesa. No final da lactação, também foi verificado um acréscimo da CCS, devido à maior descamação natural do epitélio da glândula mamária.

No que se refere à idade das vacas, as mais velhas geralmente, apresentam uma elevada CCS, fato que se deve às maiores chances de infecção pela prolongada exposição aos patógenos envolvidos, e também à maior descamação de células epiteliais ao longo de várias lactações (LANGONI, 2006).

Com relação à estação do ano, MAGALHÃES et al. (2006) observaram uma CCS mais alta no verão (janeiro a março). Neste período, ocorre um aumento na umidade e maior estresse térmico, que aumentam a susceptibilidade do animal a infecções e o número de patógenos aos quais estaria exposto, favorecendo a incidência de mastite nesses meses (HARMON & RENEAU, 1993).

Estudo realizado por BUENO et al. (2005), relacionando a CCS do leite com a estação do ano no estado de Goiás, mostrou uma correlação significativa da temperatura ambiental com maiores médias de CCS ocorrendo na estação seca (setembro e outubro). A ocorrência da maior CCS no leite produzido nestes meses também poderia estar associada à existência de várias vacas no final da lactação, período no qual há maior incidência de casos de mastite. Outra hipótese seria a escassez de pastagem, causando um comprometimento na qualidade e quantidade da dieta das vacas o que, segundo NORO et al. (2006), poderia estar relacionado com a elevação na CCS.

No estado do Paraná, BRAGA et al. (2006) verificaram menores CCS nos leites ordenhados no inverno, período marcado de temperaturas mais baixas, quando comumente há ocorrência de temperaturas negativas. O período contribuiu para os

menores índices de CCS e também de menores desvios-padrão, ou seja, menor variabilidade de resultados.

A influência dos fatores ambientais na variação mensal de CCS em rebanhos no estado de Minas Gerais foi estudada por TEIXEIRA et al. (2003), no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2001, pelo exame de 102.098 amostras individuais. A CCS aumentou nos meses de fevereiro a junho, diminuindo para o mínimo em outubro.

### **3.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS COMO ÍNDICE DE QUALIDADE**

Considerando a relação direta entre a ocorrência de mastite e a perda das características do leite, justifica-se o crescente interesse na realização de estudos que avaliem o impacto da CCS sobre a qualidade de leite e derivados (FERNANDES, 2008).

A contagem de células somáticas no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, indiretamente, como indicadora da produção higiênica do leite (WICKSTRÖM et al., 2009). Sendo assim, muitos países têm estabelecido limites máximos de CCS do leite de rebanho para assegurar a higiene e qualidade do leite. Os Estados Unidos e Canadá estabeleceram um limite de 500.000 e 750.000 CS/mL, respectivamente, enquanto na União Européia, Nova Zelândia e Austrália, o valor é de 400.000 CS/mL (PHILPOT, 1998; SANTOS, 2002).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) fixou, por meio da Instrução Normativa (IN) nº 51, de 18 de setembro de 2002, os requisitos mínimos de qualidade para o leite cru nas propriedades rurais, incluindo pela primeira vez na legislação brasileira, limites máximos para CCS. Esta norma estabeleceu o limite máximo legal de 1.000.000 CS/mL, de 2005 a 2008, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e de 2005 a 2010, para as regiões Norte e Nordeste. Em 2008, o valor máximo estabelecido foi de 750.000 CS/mL, e em 2011, será de 400.000 CS/mL, para a região sudeste (BRASIL, 2002). Dessa forma, em aproximadamente dez anos, o leite produzido no Brasil atenderia às exigências normativas atuais da União Européia e países como Nova Zelândia e Austrália.

Além das implicações legais, a saúde da glândula mamária pode estar relacionada com o bem estar dos animais, visto que em casos de mastite clínica pode ocorrer o desconforto. Entidades de defesa dos direitos dos animais apontam esse

desconforto como indesejáveis para os animais (SCHUKKEN et al., 2003). A CCS está relacionada com o aumento do risco de ocorrência de resíduos de antimicrobianos em rebanhos leiteiros, em função da maior utilização de tratamentos intramamários (RUEGG, 2005).

Nos últimos anos, várias pesquisas foram realizadas em diferentes regiões do Brasil com intuito de avaliar a qualidade do leite com relação à CCS. Na região sudeste SOUZA et al. (2010) avaliaram a qualidade do leite em relação a CCS, de 2005 a 2008, e verificaram uma variação de 78,4 a 80,4% das amostras com contagem inferior a 750.000 CS/mL. Aproximadamente 20% das amostras estavam acima de 750.000 CS/mL, porém, a partir de julho de 2011 o limite será reduzido para 400.000 CS/mL, e o percentual de amostras acima deste limite aumentará para 50%. Observa-se que estes percentuais não apresentaram mudanças significativas desde julho de 2005 (Tabela 3).

LACERDA et al. (2010) analisaram 2.236.700 e 2.629.950 amostras de leite cru de agosto a dezembro de 2006 e janeiro a julho de 2007, respectivamente, no estado do Maranhão. Das amostras analisadas em 2006 e 2007, 65% e 85%, respectivamente, estavam com contagem acima do estabelecido pela legislação (1.000.000 CS/mL). No entanto, CARVALHO et al. (2010) analisaram 541 amostras em Rondônia e valor médio de CCS obtido foi de 289.000 CS/mL. Todas as amostras estavam com os valores de CCS dentro do estabelecido pela legislação (BRASIL, 2002).

**Tabela 3** – Percentual de amostras de leite cru de rebanhos bovinos localizados na região sudeste do Brasil que atendem os limites estabelecidos na Instrução Normativa 51/2002

Contagem de células somáticas (CS/mL)	Ano			
	2005	2006	2007	2008*
Amostras analisadas	38.514	151.751	176.887	96.519
≤ 400.000	50,0	52,1	50,8	48,8
≤ 750.000	78,4	80,4	80,4	78,7

\* 01/01/2008 a 30/06/2008.  
Fonte: SOUZA et al. (2010).

### 3.4 INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS SOMÁTICAS NA QUALIDADE DO LEITE E QUEIJO

Os mais importantes efeitos negativos do aumento no número de células somáticas para os produtos de laticínios incluem: baixo rendimento industrial, aumento do tempo de coagulação do leite, maior perda dos componentes do leite para o soro, defeitos de textura e diminuição da vida de prateleira, devido a alterações sensoriais, causadas principalmente pela ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas (KITCHEN, 1981; SANTOS et al., 2003a; 2003b). As enzimas proteolíticas e lipolíticas podem gerar sabor amargo e rançoso, respectivamente, no leite e seus derivados (MURPHY, 1989; MATIOLI, 2005).

A elevada CCS ocasiona diversas mudanças na composição do leite, afetando sua qualidade, pois altera a permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula e reduz a secreção dos componentes do leite sintetizados na glândula mamária (proteína, gordura e lactose) pela ação direta dos patógenos ou de enzimas sobre os componentes secretados no interior da glândula (MACHADO et al., 2000; SILVEIRA et al., 2004).

BUENO et al. (2005) analisaram a CCS e os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de leite cru armazenado em tanques de refrigeração no estado de Goiás e verificaram que a elevada CCS estava relacionada à redução destes componentes do leite.

CUNHA et al. (2008) verificaram um aumento de 6,2% na porcentagem de proteína entre os leites com CCS de 100.000 e 3.000.000 CS/mL. Entretanto, este aumento na concentração de proteína não deve ser considerado favorável à qualidade do leite, pois se deve a alteração da permeabilidade dos capilares sanguíneos que permitem influxo de proteínas séricas na glândula mamária. Durante o processamento industrial do leite, as proteínas são perdidas, enquanto a concentração de caseína, que realmente é de interesse ao processo, é diminuída pela ocorrência da mastite (BRITO & BRITO, 2010). Desta forma, sistemas de pagamento baseados em porcentagem de proteína total, sem levar em conta a CCS, apresenta limitações, uma vez que o rendimento industrial do leite está associado principalmente à fração de caseína (MA et al., 2000).

SILVA-PADRA et al. (2000) observaram uma redução significativa na concentração de lactose no leite com elevada CCS; porém, não houve alteração na concentração de sólidos totais. Essa redução da lactose ocorreu devida a menor

síntese ocasionada pela destruição do tecido secretor, à perda de lactose da glândula para a corrente sanguínea decorrente do aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue e à utilização da lactose pelos patógenos intramamários (SHUSTER et al., 1991).

FERNANDES (2008) verificou que o leite cru com elevada CCS utilizado na fabricação de leite UAT (Ultra Alta Temperatura) pode prejudicar a qualidade do produto final, devido, sobretudo, às alterações decorrentes da proteólise. No leite UAT, a proteólise associada ao aumento da CCS promove desestabilização das micelas de caseína, o que pode contribuir para aumentar a susceptibilidade a gelificação.

O leite pasteurizado obtido a partir de leite cru com elevada CCS apresenta aproximadamente três vezes mais lipólise e duas vezes mais hidrólise da caseína quando comparado com o leite contendo baixa CCS. A qualidade sensorial é também comprometida, podendo ter uma vida de prateleira até 30 a 40% mais curta do que o leite de boa qualidade (MA et al., 2000). Portanto, é evidente a necessidade do controle da CCS no leite cru para evitar o comprometimento da qualidade do produto final.

VIANNA et al. (2008) verificaram que queijos Prato obtidos a partir de leite cru contendo alta CCS ( $> 700.000$  CS/mL) apresentaram maior umidade quando comparados aos queijos de CCS baixa ( $< 200.000$  CS/mL). Com relação à análise sensorial, que foi avaliada pelos atributos firmeza, sabor e gosto residual amargo, os queijos de baixa CCS apresentaram maior aceitação geral por parte dos provadores.

MARINO et al. (2005) verificaram um aumento da proteólise no leite e queijo Cheddar adicionado de células somáticas, além da influência na composição química do queijo. As células somáticas resuspendidas em tampão fosfato-salino pH 6,8 foram adicionadas antes da pasteurização do leite e observou-se uma elevada contribuição na atividade proteolítica. Ou seja, a pasteurização reduziu, mas não eliminou a atividade enzimática relacionada com as células somáticas. A adição das células somáticas também pode contribuir para um aumento da umidade do queijo, o principal indicador da qualidade do queijo Cheddar.

De acordo com ANDREATTA et al. (2009), o leite destinado à fabricação de queijo Mussarela deve apresentar CCS até  $500.000$  CS/mL, de maneira a evitar alterações na qualidade dos produtos ao longo do período de armazenamento.

Segundo COONEY et al. (2000), durante o processamento de queijos tipo Suíço, como Emmental e Gruyère, a atividade das proteinases endógenas do leite é claramente aumentada com o aumento da CCS. Além disso, observaram uma

diminuição na quantidade de proteína total e maiores perdas de proteínas no soro. O queijo Prato produzido a partir de leite com CCS maior que 500.000 CS/mL apresentou menores teores de caseína e maior taxa de proteólise (MAZAL et al., 2007).

BARBANO et al. (1991) verificaram uma redução na concentração de caseína do leite com CCS superior a 100.000 CS/mL. A perda de caseína no soro também aumentou durante a fabricação de queijo Cheddar.

A elevada CCS no leite ocasiona alterações no volume de leite produzido e em sua composição, como descrito anteriormente. Sendo assim, o perfil de aminos bioativas no leite também pode sofrer alterações, visto que MOTYL et al. (1995) demonstraram que a concentração de poliaminas no leite de vaca está diretamente relacionada com o volume de leite produzido.

De acordo com as informações descritas anteriormente, observa-se que o leite com elevada CCS tem todos os elementos desejáveis como caseína, gordura e lactose reduzidos. Além disso, a elevada CCS favorece o aumento da atividade proteolítica em queijos, proporcionando uma redução no rendimento e na vida de prateleira do produto.

Além das alterações acima citadas, pesquisas já foram realizadas para avaliar os efeitos da CCS sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais em diferentes tipos de queijos como Cheddar (GRANDISSON & FORD, 1986), queijo Prato (MAZAL et al., 2007; VIANNA et al., 2008), queijo Cottage (KLEI et al., 1998) e queijos Mussarela e Minas Frescal (ANDREATTA et al., 2007; COELHO, 2007 ANDREATTA et al., 2009). No entanto, mais estudos são necessários para verificar a existência de correlação entre aminos bioativas e os teores de células somáticas e a qualidade de leite e queijos.

### **3.5 INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO LEITE**

O leite contém várias enzimas naturais que exercem atividades sobre os constituintes da secreção láctea. Cerca de 60 enzimas endógenas foram descritas no leite normal de vaca (FOX & McSWEENEY, 1998). Todas são provenientes da circulação sanguínea ou são liberadas pelas células somáticas. Isto sugere que a mastite pode alterar a atividade enzimática através do aumento da CCS e/ou a alteração da permeabilidade do epitélio da glândula mamária.

As células somáticas, compostas principalmente por neutrófilos, linfócitos e macrófagos, apresentam grande variedade de enzimas proteolíticas e lipolíticas que podem contribuir de forma significativa para a proteólise e lipólise dos constituintes do leite (SANTOS et al., 2003a). As concentrações de muitas enzimas ou mesmo as atividades enzimáticas no leite encontram-se aumentadas durante a mastite (AUDIST & HUBBLE, 1998).

As atividades proteolíticas e lipolíticas no leite são as mais relevantes para a indústria láctea, pois são responsáveis pelas alterações da matéria-prima e pelos consequentes defeitos da qualidade dos queijos (BARBANO, 2004).

## 4 PROTEÓLISE

Proteólise é a hidrólise das proteínas, que gera a formação de peptídeos de pequeno tamanho. Essa ação enzimática que ocorre no leite e queijos é resultante da atividade proteolítica da plasmina e das enzimas liberadas pelas células somáticas ou pelos micro-organismos. No entanto, a plasmina que tem como precursor o plasminogênio, possui maior importância no que diz respeito à proteólise natural no leite (FOX & McSWEENEY, 1998).

No leite com elevada CCS, ocorre um aumento da atividade enzimática, promovendo maior ativação do plasminogênio em plasmina, a qual promove proteólise principalmente na caseína e, mais especificamente, na  $\beta$ -caseína e  $\alpha_{S2}$ -caseína, alterando a composição proteica do leite e diminuindo o rendimento na fabricação do queijo (RECIO et al., 2000; MATIOLI, 2005).

A atividade do ativador do plasminogênio aumenta durante a inflamação, o que estimula a conversão do plasminogênio em plasmina (ZANCHOS et al., 1992). A maior parte da proteólise causada pela plasmina acontece na glândula mamária, antes da ordenha do leite, pois a temperatura interna do úbere é ótima para a atuação desta protease (BARRY & DONNELLY, 1981).

Além da plasmina, outras enzimas originadas das células somáticas e dos leucócitos contribuem para a atividade proteolítica no leite. CONSIDINE et al. (2002) estudaram a catepsina-G que é uma das principais proteases liberadas pelos polimorfonucleares. Os autores demonstraram a capacidade da enzima em hidrolisar as  $\alpha_{S1}$ -caseína e  $\beta$ -caseínas com produção de peptídeos similares aos liberados pela

plasmina, concluindo que a catepsina-G pode contribuir de maneira significativa para a proteólise que ocorre no leite com CCS alta.

As enzimas com atividade proteolítica também podem ser provenientes dos micro-organismos psicotróficos proteolíticos presentes no leite. Estes micro-organismos multiplicam a temperatura de refrigeração, independentemente da temperatura ótima de crescimento (SØRHAUG & STEPANIAK, 1997).

A contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicotróficas pode originar-se do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene e mastite (MURPHY & BOOR, 2000). Portanto, procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade.

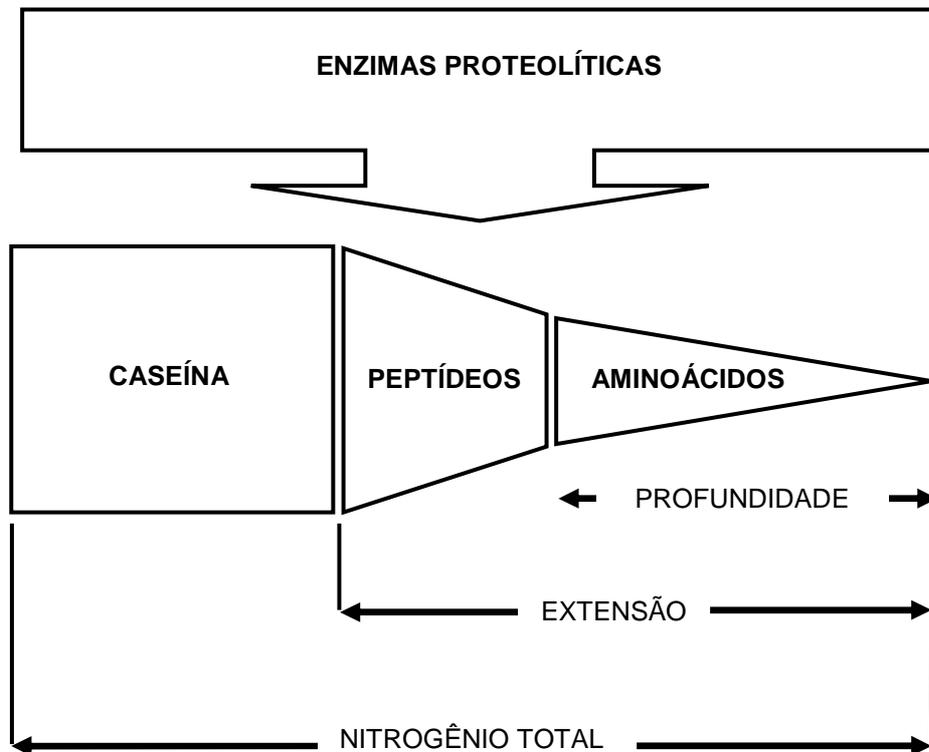
O índice de extensão da proteólise (IEP) é o resultado da reação proteolítica das enzimas do coalho e das proteinases naturais do leite sobre a caseína do queijo, liberando peptídeos de alta massa molecular. Este índice é um fator de grande importância na composição final e na qualidade do produto, caracterizando-se pela quantidade de substâncias solúveis na fase aquosa dos queijos (WOLFSCHOON-POMBO & LIMA, 1989).

O índice de profundidade da proteólise (IPP) tem a finalidade de verificar a formação de substâncias de baixo peso molecular, principalmente por causa da ação proteolítica das enzimas microbianas sobre os compostos nitrogenados oriundos da degradação da caseína. Compostos característicos dessa degradação são os aminoácidos, oligopeptídeos e aminas biogênicas (SILVA et al., 1995). Os conceitos de extensão e profundidade da proteólise estão apresentados na Figura 3, de uma forma esquemática.

O método clássico para determinar o grau de proteólise no queijo baseia-se na determinação das frações nitrogenadas, como o nitrogênio solúvel e o nitrogênio não protéico. Estas frações são determinadas, em vários tipos de queijos, a fim de verificar a intensidade da solubilidade da caseína durante a maturação, mediante o estudo do fracionamento do nitrogênio (PRADO et al., 1996).

As frações nitrogenadas surgem através da degradação das proteínas e são classificadas em função da precipitação em pH 4,6, considerando-se o nitrogênio solúvel (NS), e em ácido tricloroacético a 12%, considerando-se o nitrogênio não protéico (NNP). Com base na decomposição das frações nitrogenadas do queijo, pode-se determinar o grau de extensão e profundidade da proteólise. Estas frações

nitrogenadas são características fundamentais para analisar a proteólise da caseína, em termos de índice de proteólise (WOLFSCHOON-POMBO & LIMA, 1989).



**Figura 3** – Representação esquemática dos conceitos de extensão e profundidade da proteólise.

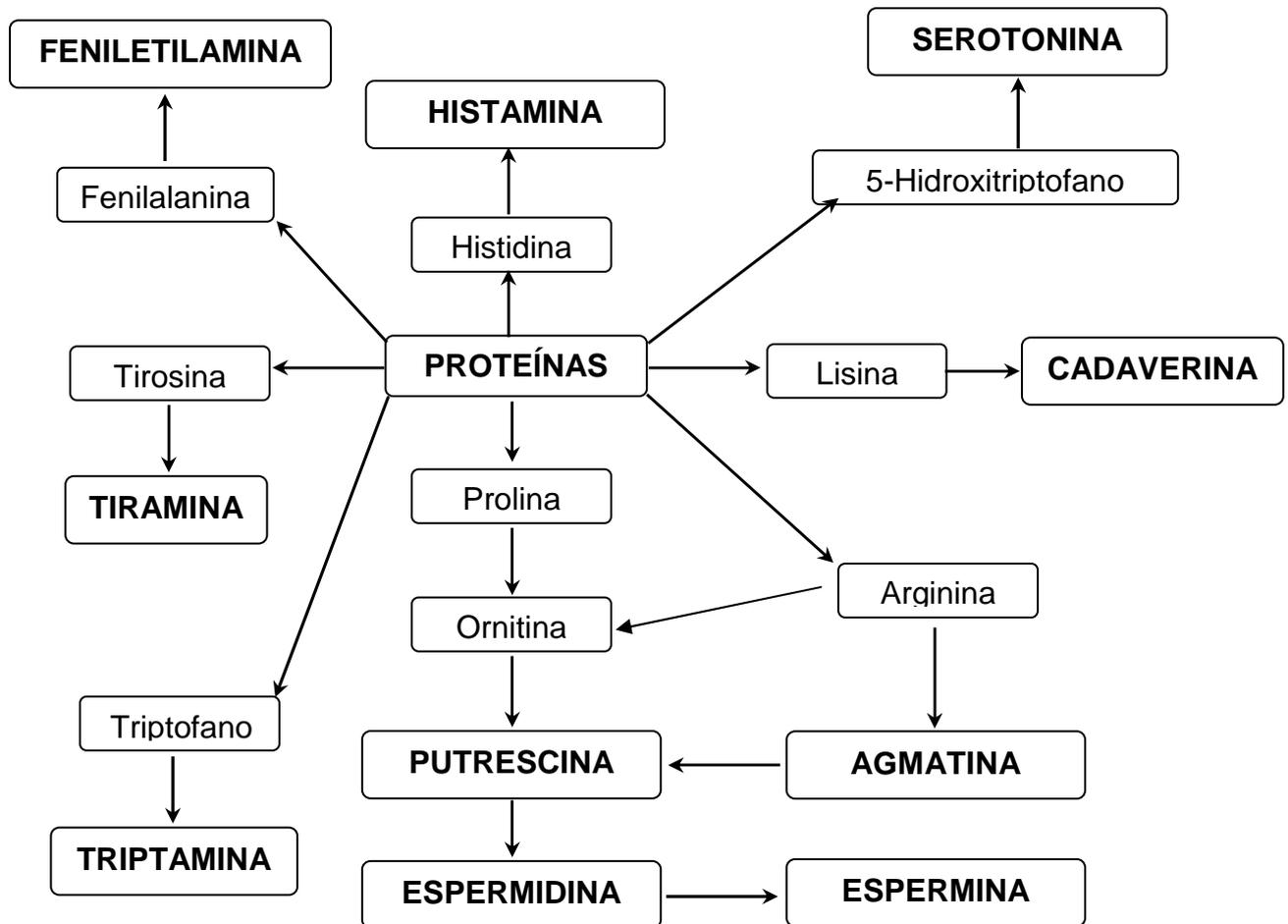
Fonte: WOLFSCHOON-POMBO & LIMA (1983).

## 5 AMINAS BIOATIVAS

### 5.1 DEFINIÇÃO, ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO

As aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixa massa molecular. Elas são também definidas como compostos nitrogenados, em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia foram substituídos por grupos alquila ou arila. Estas substâncias são formadas por processos bioquímicos e participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas. As aminas são encontradas em alimentos de origem animal, vegetal, bem como em alimentos fermentados (HALÁSZ et al., 1994; CINQUINA et al., 2004a; GLORIA, 2005, MAYER et al., 2010).

A denominação das aminas bioativas, em sua maioria, é função dos aminoácidos precursores (Figura 4), como, por exemplo: histamina, tiramina e triptamina originam-se da histidina, tirosina e triptofano, respectivamente. Os nomes cadaverina e putrescina originam-se do fato destas aminas terem sido encontradas em produtos em decomposição ou putrefação. A espermina e espermidina se referem ao fluido seminal, de onde foram isoladas pela primeira vez (GLORIA, 2005).

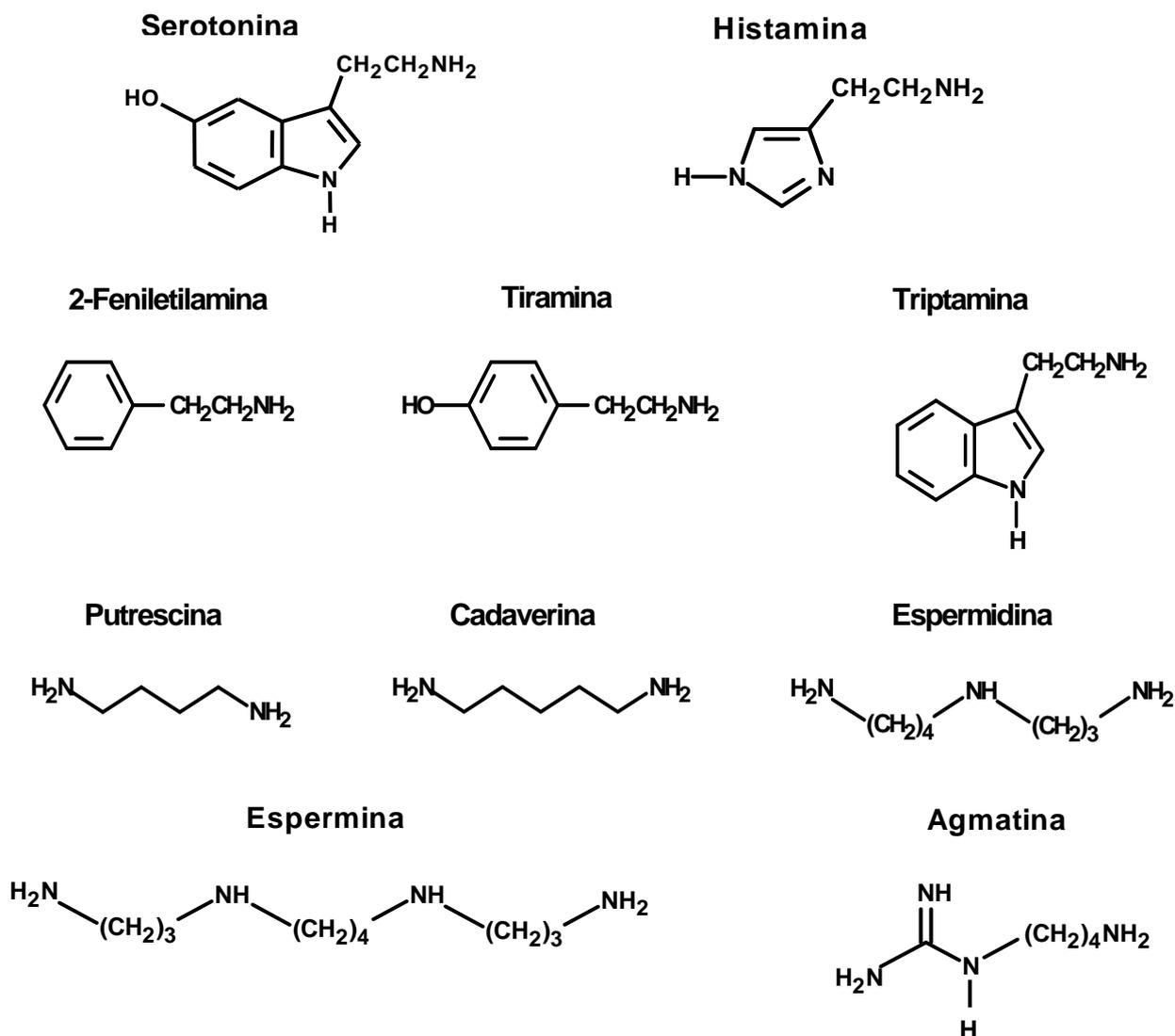


**Figura 4** – Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.

Fonte: HALÁSZ et al. (1994).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química (Figura 5), da via biossintética e da função que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, se classificam em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina).

Com relação à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Ainda, em relação à estrutura química, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e em imidazolaminas (histamina) (SMITH, 1980-81; BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996).



**Figura 5** – Estrutura química de algumas aminas bioativas.

Fonte: GLORIA (2005).

Quanto à via biossintética, as aminas são classificadas em naturais, que são formadas durante a biossíntese “*in situ*”, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar

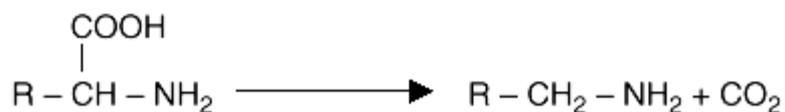
armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina). Por outro lado, as aminas biogênicas são formadas por reações de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de aminas nos alimentos (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (SHALABY, 1996; GLORIA, 2005, MAYER et al., 2010).

Com relação à função que exercem, as aminas bioativas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento (espermidina e espermina), por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular e em vasoativas e neuroativas (tiramina, histamina e serotonina) devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ, 1993).

## 5.2 FORMAÇÃO

A biossíntese de aminas ocorre durante o processo metabólico normal em todos os organismos vivos. As aminas biogênicas podem ser formadas por hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos (Figura 6), sendo a última a principal via de formação (BARDÓCZ, 1995).

A síntese das aminas biogênicas, histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina; ocorre por meio da descarboxilação dos aminoácidos precursores histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina e lisina, respectivamente (Figura 6). Na síntese da serotonina, o triptofano é transformado pela enzima triptofano hidrolase em 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela enzima aminoácido aromático descarboxilase em 5-hidroxitriptamina ou serotonina (GLORIA, 2005).



**Figura 6** – Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido.

Fonte: GLORIA (2005).

A formação de aminas biogênicas nos alimentos está condicionada à disponibilidade de aminoácidos livres, presença de micro-organismo descarboxilase positivo e também às condições favoráveis para o crescimento bacteriano, síntese e ação de enzimas descarboxilantes (SHALABY, 1996). O cofator piridoxal fosfato

também é requerido para a descarboxilação (STRATTON et al., 1991; HALÁSZ et al., 1994).

Os micro-organismos com capacidade de sintetizar e liberar enzimas com atividade descarboxilante sobre os aminoácidos podem fazer parte da microbiota associada ao alimento, serem introduzidos para obtenção de produtos fermentados, ou ainda por contaminação antes, durante ou depois do processamento. A quantidade e o tipo de amins nos alimentos, em geral, dependem da natureza, origem, etapas de processamento e micro-organismos presentes (HALÁSZ et al., 1994).

Inúmeros gêneros bacterianos são mostrados ativos na produção de amins, dentre eles: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Lactococcus* (EDWARDS & SANDINE, 1981; HALÁSZ et al., 1994; LEUSCHNER et al., 1998; PEREIRA et al. 2001b; MORENO-ARRIBAS et al., 2003). A formação de amins biogênicas em produtos lácteos por *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* foi relatada por GIRAFFA et al. (1997). *Enterococcus* e alguns lactobacilos (*Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri*) apresentaram grande capacidade de formação de tiramina (BOVER-CID & HOLZAPFEL, 1999). Espécies de micro-organismo pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produzem histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (MARINO et al., 2000).

Segundo VOIGT et al. (1974), vários pesquisadores investigaram a atividade descarboxilante de tirosina por bactérias. Foi verificado que algumas culturas lácticas de interesse na indústria de leite e derivados possuíam atividade tirosina descarboxilase, dentre elas: *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus casei*.

Fatores como temperatura, pH do meio, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e coenzimas, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis podem influenciar na produção de amins pelas enzimas sintetizadas pelos micro-organismos. Em meio ácido (pH 2,5 a 6,5), a descarboxilação ocorre como um mecanismo de proteção da bactéria (GLORIA, 2005; KALAČ & GLORIA, 2009), devido ao fato de que altas concentrações do íon H<sup>+</sup> são prejudiciais ao micro-organismo, fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases (SILLA-SANTOS, 1996). Com relação à temperatura, as descarboxilases são mais ativas em temperaturas inferiores a 30 °C, acima de 40 °C são inativadas e, na faixa de 0 a 10 °C, a atividade dependerá da microbiota presente (HALÁSZ et al., 1994).

Para formação das poliaminas espermidina e espermina, os aminoácidos ornitina e arginina são os precursores, sendo a putrescina um composto intermediário

obrigatório. Para formar a putrescina, a arginina é transformada em ornitina pela ação da enzima arginase, e em seguida, a ornitina sofre a ação da ornitina descarboxilase (ODC), formando a putrescina (HILLARY & PEGG, 2003; MOINARD et al., 2005). A putrescina pode ser formada por diferentes vias, dependendo do organismo vivo.

Em animais e fungos a formação da putrescina ocorre via descarboxilação da ornitina. Células bacterianas possuem uma via alternativa, a descarboxilação da arginina formando agmatina. Em vegetais, pode ocorrer tanto a via agmatina quanto via ornitina (BARDÓCZ, 1995).

Na síntese da espermidina, é adicionado à putrescina, um grupo aminopropil, derivado da metionina, via S-adenosilmetionina (SAM), e este mesmo grupo é adicionado à espermidina para formar a espermina. As enzimas espermidina e espermina sintases e SAM descarboxilase participam destas reações (KALAČ & GLORIA, 2009).

### 5.3 FUNÇÕES

Estudos com micro-organismos, animais e plantas têm demonstrado a importância das aminas bioativas no metabolismo e multiplicação (SMITH, 1984). As aminas atuam como reserva de nitrogênio, substâncias naturais de crescimento de micro-organismos e vegetais; como hormônios ou fatores de crescimento, aceleram o processo metabólico, participam na regulação da secreção gástrica, na contração e relaxamento do músculo liso, são biomoduladores e estimulam os neurônios sensoriais, motores e cardiovasculares (SMITH, 1980-1981; STRATTON et al., 1991; BAUZA et al., 1995). Um resumo da importância fisiológica das aminas bioativas está descrito na Tabela 4.

As poliaminas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo indispensáveis às células vivas, desempenhando papel importante em diversas funções fisiológicas de humanos e animais (KALAČ & KRAUSOVÁ, 2005). Espermidina e espermina estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e de proteínas, na estabilização das membranas, e são essenciais no crescimento e duplicação das células (BARDÓCZ et al., 1993; JEEVANANDAM et al., 1997; MOINARD et al., 2005). As poliaminas também têm implicações na renovação e funcionalidade do trato digestório e na maturação da mucosa intestinal (BARDÓCZ, 1993; MOINARD et al., 2005).

De acordo com LÖSER (2000), as poliaminas do leite exercem vários efeitos no intestino imaturo e desempenham um papel importante como fatores de crescimento no lúmen, promovendo maturação intestinal.

**Tabela 4** – Funções metabólicas e fisiológicas de aminas bioativas

<b>Aminas Bioativas</b>	<b>Funções</b>
Espermidina Espermina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regulação e estimulação da síntese de DNA, RNA e proteínas</li> <li>- Estimulação da diferenciação celular</li> <li>- Permeabilidade e estabilidade das membranas celulares</li> <li>- Sequestrantes de radicais livres</li> <li>- Manutenção da alta atividade metabólica de um intestino saudável funcionando normalmente</li> <li>- Redução da permeabilidade da mucosa a macromoléculas e prevenção de alergias alimentares</li> <li>- Processos fisiológicos em plantas superiores: crescimento da raiz, embriogênese somática, controle do pH intracelular, desenvolvimento da flor e fruto, resposta a estresse abiótico, síntese de metabólitos secundários, senescência, resposta da planta a patógenos</li> </ul>
Putrescina Cadaverina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recicladores de radicais livres</li> </ul>
Histamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte dilatador capilar</li> <li>- Efeito hipotensivo</li> <li>- Psicoativa</li> <li>- Efeito protetor a predadores</li> </ul>
Serotonina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vaso e broncoconstritor</li> <li>- Neurotransmissor</li> <li>- Efeito protetor a predadores</li> </ul>
Tiramina Triptamina Feniletilamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aminas vasoconstritoras</li> <li>- Precursoras de compostos com significância biológica</li> </ul>
Aminas conjugadas (ácido cinâmico)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agentes antivirais e antifúngicos</li> <li>- Crescimento da planta e processo de desenvolvimento</li> <li>- Resposta da planta a patógenos</li> </ul>

Fonte: GLORIA & VIEIRA (2007).

Algumas aminas são psicoativas ou vasoativas. Histamina e serotonina são psicoativas e atuam como neurotransmissoras no sistema nervoso central. As vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras (pressoras) ou vasodilatadoras. Tiramina, feniletilamina, e triptamina causam um aumento na pressão sanguínea por constrição do sistema vascular e aumento da velocidade e da força da contração cardíaca. A histamina causa a vasodilatação periférica, reduz a pressão sanguínea, aumenta a contração e

velocidade do batimento cardíaco, atua na contração e relaxamento do músculo liso e como estimulante dos neurônios dos sistemas motor e sensorial (SMITH, 1980-81; TAYLOR, 1986; STRATTON et al., 1991; GLORIA, 2005).

## 5.4 METABOLISMO E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

As aminas são substâncias importantes na dieta humana, pois desempenham funções fisiológicas essenciais. Sendo assim, as aminas geralmente não apresentam risco à saúde humana. Entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das aminas é inibido, podem causar efeitos tóxicos (HALÁSZ et al., 1994; LANGE et al., 2002).

No homem, as aminas exógenas absorvidas dos alimentos são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação ou mediante reações de oxidação por enzimas aminoxidases, como monoaminoxidases (MAO), diaminoxidases (DAO) e poliaminoxidases (PAO) (SMITH, 1980-1981; BARDÓCZ, 1995).

Dentre os fatores que interferem no catabolismo das aminas, tem-se a deficiência genética, a intervenção por agentes farmacológicos inibidores das aminoxidases (MAO, DAO e PAO) ou de substâncias potencializadoras, como as aminas putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermidina e espermina (HALÁSZ et al., 1994). As aminas putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO, aumentando o seu transporte através da parede gastrointestinal (TAYLOR, 1986).

A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados e queijos maturados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida isolada (GLORIA, 2005). O etanol também pode atuar como inibidor da MAO, intervindo no metabolismo das catecolaminas, tiramina e feniletilamina (BAUZA et al., 1995).

A mais freqüente intoxicação causada por aminas biogênicas em alimentos envolve a histamina (CINQUINA et al., 2004b). A intoxicação histamínica resulta da ingestão de alimentos que contêm altos teores de histamina. Os principais sintomas são erupções na pele, náuseas, dor de cabeça, palpitações, vômitos, dores abdominais, distúrbios respiratórios e taquicardia (GLORIA, 2005, KALAČ & GLORIA, 2009). Os queijos são os principais alimentos envolvidos nesta intoxicação, assim como os peixes (STRATTON et al., 1991; CINQUINA et al., 2004a, LANDETE et al., 2008).

O primeiro registro de intoxicação histamínica (Tabela 5) ocorreu na Holanda, em 1967, e envolveu o queijo Gouda. Desde então, vários casos têm sido citados, sendo os queijos Cheddar, Gouda e Gruyère os mais envolvidos (STRATTON et al., 1991; GLORIA, 2005).

Em 1976, um surto de intoxicação histamínica por queijos ocorreu nos Estados Unidos envolvendo 38 casos e envolvendo o queijo Suíço, com concentração de histamina superior a 100 mg/100g de queijo. Um segundo e menor surto com queijo Suíço ocorreu, também, nos Estados Unidos, envolvendo seis pessoas. Na França, de 1980 a 1983, ocorreram quatro surtos envolvendo o queijo Gruyère, sendo a concentração de histamina de 30 mg/100g de queijo (STRATTON et al., 1991).

**Tabela 5** – Surtos de intoxicação por histamina associadas ao consumo de queijo

Ano - País	Tipo de queijo	Histamina (mg/100g)
1967 – Holanda	Gouda	85
1976 – Estados Unidos	Suíço	> 100
1977 – França	Cheshire	-
1980 – Canadá	Cheddar	40
1980 – Estados Unidos	Suíço	> 100
1983 – França	Gruyère	30
1996 – França	Suíço	70

Fonte: Modificado de STRATTON et al. (1991).

A tiramina é a segunda amina envolvida em intoxicações alimentares. Quando alimentos contendo tiramina em altos níveis são ingeridos, uma grande quantidade desta amina não metabolizada pode atingir a corrente sanguínea. Este fato leva à liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático, acarretando em uma variedade de reações fisiológicas (Tabela 6). Ocorre um aumento na pressão sanguínea pela vasoconstrição periférica. A tiramina pode dilatar pupilas, causando lacrimação, promover salivação, febre vômito, dor de cabeça e aumento na taxa de respiração. Em pacientes em tratamento com inibidores da MAO, a tiramina pode causar enxaqueca, induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (SMITH, 1980-1981; GLORIA & VIEIRA, 2007).

As aminas triptamina e 2-feniletilamina, da mesma forma que a tiramina, podem provocar dor de cabeça, enxaqueca, aumentar a pressão sanguínea, devido à constrição do sistema vascular e a taxa da contração cardíaca (SMITH, 1980-1981). A tiramina e a serotonina podem causar crises hipertensivas e hemorragia intracraniana (GARCIA-MORENO et al., 1978).

**Tabela 6** – Efeitos tóxicos das aminas bioativas

<b>Efeitos tóxicos</b>	<b>Aminas envolvidas</b>	<b>Sintomas</b>
Intoxicação histamínica	Histamina  (efeito tóxico potencializado pela putrescina, cadaverina, espermina, triptamina, tiramina, feniletilamina e álcool)	Gastrointestinal: náusea, vômito, diarreia, cólica abdominal Neurológico: dor de cabeça pulsante, palpitação, rubor facial e no pescoço, coceira, pulsação rápida e fraca, tontura e fraqueza, formigamento Hemodinâmico: hipotensão, dilatação capilar Cutâneo: erupção, urticária, edema, inflamação localizada Casos severos: bronco espasmo, sufocação, respiração difícil
Intoxicação por tiramina	Tiramina	Dor de cabeça, febre, aumento na pressão sanguínea, vômito, transpiração, dilatação da pálpebra e pupilas, salivação, lacrimação, respiração aumentada, palpitação e dispnéia
Reação com queijo ou crise hipertensiva (associada a pacientes medicados com MAOI*)	Tiramina Feniletilamina	Crise hipertensiva, dor de cabeça severa, hemorragia cerebral, seqüela neurológica, deficiência cardíaca, edema pulmonar, alterações na visão, palpitação, náusea, sudação, vômito, contração muscular, excitação, confusão mental, pressão sanguínea alta, febre e transpiração
Enxaqueca	Tiramina Feniletilamina Triptamina Serotonina	Dor de cabeça pulsante e ataque de enxaqueca

\* MAOI – inibidor da monoaminoxidase.

Fonte: GLORIA (2005).

As poliaminas espermidina e espermina podem acelerar o crescimento de tumores. Sendo assim, para pacientes em tratamento do câncer, recomenda-se uma dieta com reduzidos teores destas substâncias de forma a diminuir o crescimento e progresso do tumor (BARDÓCZ, 1995; GLORIA, 2005). A espermidina, espermina, putrescina e cadaverina podem reagir com nitrito, sob condições ácidas, para formar nitrosaminas, muitas das quais apresentam atividade cancerígena (HALÁSZ et al., 1994; SILLA-SANTOS, 1996; ELIASSEN et al., 2002).

Os níveis tóxicos das aminas para humanos ainda são incertos, e a dose tóxica depende da eficiência do metabolismo individual. Para histamina, a dose tóxica é de 10 mg/100g de alimento. Entretanto, indivíduos sensíveis, asmáticos ou portadores de úlcera são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da histamina. A dose tóxica da tiramina é de 10 mg/100g em indivíduos normais e 6 mg/100g naqueles em tratamento com IMAO. A dose tóxica da feniletilamina é de 3 mg/100g (HALÁSZ et al., 1994). Deve-se ressaltar que a presença concomitante de outras aminas podem potencializar o efeito tóxico das aminas (GLORIA, 2005).

## 5.5 AMINAS COMO CRITÉRIO DE QUALIDADE

As aminas, em alimentos, podem ser inerentes ao produto, ou serem formadas por micro-organismos adicionados (culturas iniciadoras) ou contaminantes, introduzidos devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas e/ou das condições higiênicas sanitárias durante a fabricação de certos produtos (HALÁSZ et al., 1994; KALAČ et al., 2002; GLORIA, 2005). Elas também podem ser utilizadas como um indicador do alimento deteriorado, uma vez que a atuação microbiana pode ser acompanhada pelo aumento da produção de descarboxilases (HALÁSZ et al., 1994). Uma vantagem da utilização de aminas como critério de qualidade reside no fato de estas serem termoresistentes, permanecendo no alimento, mesmo após tratamento térmico (GLORIA, 2005).

Quando ocorre a deterioração dos derivados lácteos, as aminas acumuladas originam odores pútridos e sabores estranhos, além de causarem efeitos tóxicos ao homem (CHANDER et al., 1989).

Alguns países têm regulamentado a quantidade máxima de histamina em alguns produtos alimentícios. A Suíça estabelece o nível máximo 10 mg de histamina/L de vinho. O *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu limite de 5 mg de histamina/100 g em atum e peixes susceptíveis de sua formação e estabeleceu regras com relação à peixes enlatados: 10 mg de histamina/100 g. Para a União Européia, um nível aceitável de 10 mg/100g foi estabelecido para histamina em atum e outros peixes pertencentes às famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae* (CE, 1991).

No Brasil, não existem padrões ou diretrizes com limites para histamina e outras aminas em queijos e produtos lácteos.

## 5.6 AMINAS EM LEITE CRU

O perfil de poliaminas foi estudado em leite de vacas, porcas, cabras, ratas e humano, tendo sido observadas diferentes concentrações (Tabela 8). Os leites de cabra, rata e vaca apresentaram uma maior concentração de espermidina e os leites de porca e humano de espermina. A putrescina foi a amina presente em menor concentração em todas as espécies. No entanto, OKAMOTO et al. (1997) não encontraram aminas em leite de vaca.

NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2002a) encontraram baixas concentrações de poliaminas em leite de cabra. A amina presente em maior concentração nas amostras analisadas foi a espermina, seguida da espermidina. Porém, PLOSZAJ et al. (1997) encontraram uma maior concentração de espermidina.

POLLACK et al. (1992) analisaram a concentração de poliaminas do leite humano e de rata, no período de uma semana a quatro meses e de um a vinte dias de lactação, respectivamente. As concentrações de putrescina e espermina foram similares nos leites humano e de rata, enquanto que no leite de rata foi observado maiores teores de espermidina (Tabela 7). Os teores de poliaminas no leite de rata apresentaram menores variações com o tempo de lactação quando comparado ao leite humano.

**Tabela 7** – Teores de poliaminas em leite de diferentes espécies de mamíferos

Espécie	n	Poliaminas (mg/L)			Fonte
		Espermidina	Espermina	Putrescina	
Humana	4	0,05	0,08	-	SANGUANSEMSRI et al. (1974)
	49	0,72	1,03	0,07	MOREIRA-ARAÚJO (2003)
	5	0,51	0,91	0,05	POLLACK et al. (1992)
	-	0,32	0,65	0,05	SILVA (2008b)
Bovina	10	1,92	0,87	-	MOTYL et al. (1995)
	-	nd	nd	nd	OKAMOTO et al. (1997)
	3	0,09	0,20	0,10	GLORIA et al. (2010)
Caprina	12	5,76	0,64	0,53	PLOSZAJ et al. (1997)
	-	0,35	0,96	nd	NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2002a)
Suína	7	0,67	2,71	-	MOTYL et al. (1995)
Roedor	3	5,17	0,46	0,26	POLLACK et al. (1992)

nd : não detectado; - : não determinado, n=número de amostras.

Estudos realizados por MOREIRA-ARAÚJO (2003) para a determinação do perfil e teores de aminas bioativas em leite humano indicaram a presença da espermina, espermidina, putrescina e agmatina em 100% das amostras analisadas. Os teores totais das aminas avaliadas variaram de 0,07 a 15,92 mg/L; sendo que, de um modo geral, a espermina e a agmatina foram as aminas que apresentaram maiores

concentrações no leite. No colostro a amina predominante foi a espermina, seguida da agmatina e da espermidina.

As amostras de leite humano coletadas em diferentes estádios de lactação apresentaram diferenças significativas nos teores das poliaminas; comprovando, assim, a influência do estágio da lactação na concentração das poliaminas no leite materno. O estado nutricional e a idade das mães também influenciaram os teores de poliaminas do leite humano (MOREIRA-ARAÚJO, 2003).

Conforme os estudos acima relatados, observa-se que o estágio da lactação influencia o perfil das poliaminas no leite, porém os resultados obtidos são discordantes. SANGUANSEMSRI et al. (1974) obtiveram uma maior concentração das poliaminas espermidina e espermina em leite humano na quinta semana de lactação, enquanto que POLLACK et al. (1992) encontraram uma maior concentração das poliaminas no leite humano no período de 15 a 30 dias de lactação e, no leite de rata, a concentração de putrescina foi maior com 4 a 5 dias e a espermidina e a espermina com 18 a 20 dias.

SANGUANSEMSRI et al. (1974) encontraram as poliaminas espermidina e espermina em amostras de leite humano e de vaca, além das diaminas putrescina e cadaverina. Os perfis destas aminas foram similares em ambos os tipos de leite; porém, as concentrações variaram entre as espécies. A presença de espermidina e espermina foi observada na quinta semana de lactação, com concentrações mais elevadas no leite humano quando comparado ao leite de vaca no mesmo tempo de lactação.

LÖSER (2000) detectou a presença de espermina, espermidina e putrescina no leite de vaca, e observou que a concentração das poliaminas sofre variações devido a alguns fatores, como: idade do animal, período de lactação, estado nutricional, fatores genéticos, fatores ambientais e contaminação bacteriana. Segundo este pesquisador, o leite de vaca tem baixas concentrações de poliaminas quando comparado ao leite humano devido à elevada atividade enzimática das DAO e PAO.

MOTYL et al. (1995), estudando o perfil de poliaminas no leite de vaca, verificaram a presença de espermidina e espermina. Fatores como volume de produção e período de lactação influenciaram a concentração das poliaminas. Uma maior concentração das poliaminas foi observada no colostro: a espermidina estava presente em maior concentração (1,92 mg/L), diminuindo com o avanço da lactação e tendendo a aumentar ao final do período. Por outro lado, a concentração de espermina no colostro variou de 0,22 a 1,53 mg/L e, em apenas uma vaca, foi detectada a

presença de espermina no primeiro mês de lactação. A secreção de espermidina teve uma correlação significativamente positiva com o volume de leite produzido.

Segundo MOTYL et al. (1995), a diminuição da espermidina e espermina no leite de vaca durante o período de lactação é devida à ação das poliaminoxidases. Outros fatos interessantes também foram observados neste estudo. Uma correlação positiva foi encontrada entre a concentração de gordura e proteína com os níveis de poliaminas, confirmando a relação entre a intensidade de secreção dos constituintes do leite na glândula mamária e a biossíntese das poliaminas.

GLORIA et al. (2010) analisaram os tipos e teores de amins bioativas em leite cru bovino, recém ordenhado. Foram encontradas as amins espermina (34,8%), putrescina (17,3%), serotonina (15,9%), espermidina (14,7%) e feniletilamina (14,5%). Os resultados indicaram que a espermina foi a amina predominante. Estes resultados estão diferentes dos relatados por MOTYL et al. (1995), que encontraram uma maior concentração de espermidina no leite cru.

Mais estudos são necessários para esclarecer o perfil e teores de amins em leite cru; pois, conforme citado acima, esses dados ainda são controversos na literatura.

## 5.7 AMINAS EM LEITE PROCESSADO

Alguns autores investigaram a presença de amins bioativas em leite bovino processado e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8. NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2000) determinaram as concentrações de amins em leite integral e verificaram a presença das poliaminas espermidina e agmatina. A espermidina estava presente em todas as amostras enquanto que a agmatina foi encontrada apenas em 50% das amostras. A putrescina e a espermina não foram detectadas. As amins biogênicas tiramina, histamina, feniletilamina e triptamina não foram detectadas nas amostras analisadas.

ALMEIDA et al. (2003) relataram a presença das amins putrescina, cadaverina, serotonina, espermidina e espermina em amostras de leite UAT. Do teor total de amins encontrado, em média, 47% correspondiam à serotonina, 19% à espermidina, 17% à espermina, 9% à putrescina e 7% à cadaverina. A serotonina foi a amina predominante.

GLORIA et al. (2010) inocularam *Pseudomonas fluorescens* em leite bovino cru, e esterilizado, armazenando-os em diferentes temperaturas (4, 7 e 10 °C) com o

objetivo de verificar a capacidade desta espécie bacteriana de formar aminas bioativas. No leite esterilizado foi encontrada, além das aminas citadas no leite cru (espermina, espermidina, putrescina, e cadaverina), a feniletilamina. A temperatura afetou a produção de aminas, tendo sido encontrados maiores teores de todas as aminas a 10 °C, quando comparadas às amostras incubadas a 7 °C e a 4 °C.

SANTOS et al. (2003c) avaliaram a formação de aminas bioativas no leite em pó desnatado, pela ação de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* nas temperaturas de 20 °C e 32 °C. Maiores concentrações de aminas foram encontradas nas amostras incubadas à temperatura de 32 °C. Os resultados sugerem que a menor temperatura deve ser mantida, para evitar ou minimizar a formação de aminas.

**Tabela 8** – Teores médios de aminas em diferentes tipos de leite bovino coletados no mercado

Leite	N	Teores de aminas (mg/L)						Fonte
		PUT	CAD	EPD	EPM	AGM	SRT	
Integral	5	nd	nd	0,16	nd	0,08	nd	NOVELLA-RODRIGUÉZ et al. (2000)
UAT (Integral)	30	0,05	0,04	0,11	0,10	nd	0,28	ALMEIDA et al. (2003)
Pó (Desnatado)	5	nd	0,03	0,74	0,19	0,22	nd	SANTOS et al. (2003c)

nd: não detectado. PUT: putrescina; CAD: cadaverina; EPD: espermidina; EPM: espermina; AGM: agmatina; SRT: serotonina.

Avaliando os dados da literatura relatados anteriormente, verifica-se que o perfil e os teores de poliaminas no leite cru e também no processado ainda são controversos. Tais evidências reforçam a necessidade de realização de mais estudos sobre o perfil e teores de aminas bioativas no leite bovino para saber quais as aminas são inerentes ao produto.

## 5.8 AMINAS EM QUEIJOS

Muitos estudos têm sido conduzidos para determinar o conteúdo de aminas em queijos, indicando, principalmente, a presença de histamina, tiramina, triptamina, putrescina, cadaverina e feniletilamina (VALE & GLORIA, 1998; VALSAMAKI et al., 2000; CUSTÓDIO et al., 2007; INNOCENTE et al., 2007).

Conforme indicado na Tabela 9, os teores e tipos de aminas variam com o tipo de queijo e também entre cada tipo. Aminas como histamina e a tiramina foram

encontradas em níveis elevados, capazes de causar efeitos adversos, principalmente em pacientes em tratamento com medicamentos inibidores da MAO.

Estudos realizados por VALE & GLORIA (1998) indicaram a presença de vários tipos de aminas bioativas em queijos Minas, Gorgonzola, Prato, Tilsit, Gouda, Mussarela, Provolone, Parmesão e Parmesão ralado produzidos no Brasil. A espermina foi a amina predominante, presente em 93% das amostras de queijo analisadas. Em seguida, estavam a histamina (65%), a espermidina (64%), a 2-feniletilamina (62%), a putrescina (60%), a cadaverina (59%), a serotonina (44%), a agmatina (38%), a tiramina (37%) e a triptamina (29%). No queijo Mussarela, a histamina foi a amina presente em maior quantidade (nd-11,33 mg/100 g) seguida da tiramina (nd-1,56 mg/100 g). As demais aminas analisadas também foram detectadas, porém em menores teores.

NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2002a) verificaram a influência de duas culturas usadas para produção de queijos a partir de leite de cabra, na formação de aminas biogênicas durante a maturação. As culturas iniciadoras eram formadas por *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* associados e da utilização isolada do último micro-organismo. A amina presente em maior concentração foi a triptamina, seguida da putrescina, em ambos os queijos. Porém, o conteúdo destas foi significativamente menor em queijos produzidos com *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. As aminas agmatina, espermidina e espermina estavam presentes em quantidades similares em ambos os queijos.

LADERO et al. (2010) observaram que queijos obtidos a partir de leite cru apresentaram teores de 16,85 mg/100 g de tiramina, enquanto que os elaborados com leite pasteurizado apresentaram quantidades cinco vezes menores (2,91 mg/100 g). Desta forma, as bactérias do leite cru podem contribuir na formação de aminas.

NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2002b) compararam os efeitos dos tratamentos de alta pressão e pasteurização no leite de cabra, como objetivo de avaliar a formação de aminas bioativas no queijo durante 45 dias de maturação. Os efeitos da alta pressão na formação de aminas foram mínimos, e a diferença entre a concentração de aminas em ambos os tratamentos foi pequena. Os autores concluíram que a qualidade higiênica do leite tem maior efeito na formação de aminas em queijos maturados que o tipo de tratamento aplicado.

Ao avaliar a distribuição de aminas em vários tipos de queijo maturados e não maturados, NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2003) verificaram que a formação de aminas foi maior em queijos maturados. A amina que prevaleceu em todos os tipos de

queijos foi a tiramina, seguida da putrescina ou cadaverina, dependendo do tipo de queijo. Queijos maturados, provenientes de leite cru, têm elevada concentração de cadaverina e putrescina. Segundo KALAČ & KRAUSOVÁ (2005), a concentração de todas as aminas pode alcançar valores elevados em queijos, principalmente o maturado.

**Tabela 9** – Teores de aminas bioativas em diferentes tipos de queijos

Queijos	Teores de aminas bioativas (mg/100 g)						Referências
	TIM	HIM	PUT	CAD	FEM	TRM	
Blue cheese	5,0-158,5	nd -230,0	0,3-25,7	nd-210,1	nd-3,97	nd-110,0	1,4,8
Camembert	7,0-21,0	nd-48,0	-	-	-	nd-6,0	1,4
Cheddar	nd -153,0	nd -212,0	22,0-26,0	21,0-35,0	nd -30,3	nd -30	1,4,6
Gorgonzola	nd-146,0	0,45-84,6	0,17-3,7	nd-23,3	0,07-1,0	nd-2,8	5,6
Gouda	nd-67,0	nd-45,0	nd-345,2	nd-114,2	nd-1,9	nd-20,0	1,5,6
Minas	nd	nd-2,50	nd-2,64	nd-0,30	nd-0,64	nd-0,72	5
Montasio	12,8-39,4	10,1-37,8	12,9-110	0,45-3,02	0,77-2,0	0,18-0,81	7
Mussarela	nd-16,0	nd-11,3	nd-1,4	nd-2,3	nd-0,26	nd-10,0	1,5,6
Parmesão	nd-34,4	nd-78,3	nd-30,2	nd-85,1	nd-3,08	nd-8,62	1,2,4,5,9
Parmesão ralado	0,12-69,7	0,07-52,1	nd-6,30	nd-13,4	nd-1,98	nd-1,35	5,9
Prato	nd-1,75	nd-6,15	nd-3,53	nd-3,39	nd-1,19	nd-0,90	5
Processado	nd-16,0	nd-3,2	nd-6,0	nd-12,0	nd-40,0	nd	3,6
Provolone	nd-44	nd-6,0	nd-8,17	nd-111,0	nd-1,4	nd-1,08	5
Suíço	nd-180,0	nd	-	-	nd -7,8	nd-16,0	1,4
Tipo parmesão	4,64-22,3	4,97-19,9	1,91-16,4	1,16-36,8	0,21-2,97	nd-8,61	9
Queijo de leite de cabra	nd-83,0	nd-8,84	nd-19,2	nd-8,87	nd-1,74	nd-1,17	8

TIM: tiramina; HIM: histamina; PUT: putrescina; CAD: cadaverina; FEM: feniletilamina; TRM: triptamina; nd: não detectado; -: não determinado.

Fonte: [1] VOIGT et al. (1974), [2] HALÁSZ et al. (1994); [3] EL-SAYED (1996), [4] ROIG-SAGUÉS et al. (1998), [5] VALE & GLORIA (1998), [6] PATTONO et al. (2000), [7] INNOCENTE & D'AGOSTIN (2002), [8] NOVELLA-RODRIGUEZ et al. (2003), [9] CUSTÓDIO (2006).

Um estudo foi realizado por MARTUSCELLI et al. (2005) para verificar o perfil de aminas em queijo Italiano Pecorino Abruzzese, fabricado a partir de leite de ovelha. No queijo fabricado com leite cru, sem o uso de cultura iniciadora, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, 2-feniletilamina, espermina e espermidina foram detectadas. A histamina, tiramina e putrescina estavam presentes em maiores concentrações (38, 26

e 9%, respectivamente). No queijo fabricado a partir de leite pasteurizado contendo cultura iniciadora (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus delbruekii ssp. bulgaricus*), feniletilamina (28%), tiramina (23%), e putrescina (15%) foram as aminas presentes em maiores concentrações. A pasteurização não reduziu a quantidade de tiramina. Resultado similar foi encontrado por NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2002b) que avaliaram os efeitos dos tratamentos de alta pressão e pasteurização no leite de cabra.

Segundo DIAZ-CINCO et al. (1992), o tempo e temperatura de estocagem de queijos têm grande influência na concentração de aminas. As concentrações de histamina e tiramina aumentaram com o tempo e altos níveis foram encontrados em queijos estocados a 25 °C quando comparado aos queijos armazenados a 5 °C.

JOOSTEN & NUÑEZ (1996) verificaram que o uso de culturas iniciadoras com capacidade de produção de bacteriocina pode prevenir a produção de histamina em queijos. Porém, mais informações são necessárias para determinar o efeito deste tratamento nas propriedades sensoriais e as conseqüências tecnológicas.

SANTOS et al. (2003c) verificaram que a adição de coalho ao leite desnatado promoveu a formação de espermidina, putrescina e tiramina, enquanto que a adição de NaCl diminuiu a formação de putrescina, histamina e tiramina. STRATTON et al. (1991) e FERNÁNDEZ-GARCÍA et al. (2000) também verificaram que a adição de coalho promoveu a proteólise, a qual pode aumentar a formação de aminas biogênicas.

Em resumo, os tipos e teores de aminas presentes em queijos variam de acordo com o tipo de queijo, tempo de maturação, tipos de micro-organismos presentes, atividade proteolítica e condições do processo de fabricação (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; GLORIA, 2005). O aumento do conteúdo de aminoácidos, provenientes da proteólise, e a atividade descarboxilase de enzimas bacterianas podem favorecer o aumento de aminas biogênicas em queijos (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2002b).

## **6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS APLICADOS À ANÁLISE DE AMINAS**

De uma perspectiva analítica, a determinação de aminas bioativas em alimentos não é uma técnica simples, pois estas substâncias possuem estruturas químicas distintas e estão presentes em faixas de concentração variáveis, às vezes muito baixas, em uma matriz complexa. Técnicas cromatográficas, especialmente a

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são as mais utilizadas, uma vez que fornecem alta resolução, sensibilidade e versatilidade, e o tratamento da amostra é simples (LAVIZZARI et al., 2006).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar o teor de aminos bioativas em produtos alimentícios. Entretanto, pesquisas continuam a serem feitas de forma a desenvolver métodos mais simples, rápidos, sensíveis e de menor custo. As técnicas para determinação de aminos bioativas envolvem as etapas de extração, derivação, separação e quantificação (TAYLOR, 1985). Dependendo da matriz, ou seja, do tipo do alimento a ser analisado, a etapa de extração pode sofrer alterações (MORET & CONTE, 1996).

## 6.1 EXTRAÇÃO

A extração consiste na retirada das aminos da matriz, sendo considerada crítica, pois sua eficiência depende do tipo e natureza das aminos presentes e do alimento analisado (TAMIM et al., 2002). Nesta etapa, dois parâmetros são importantes, um é o solvente usado para extração, que está relacionado à matriz a ser analisada, e o outro é a forma de preparo da amostra (MORET & CONTE, 1996). Nos alimentos, as aminos geralmente ocorrem em misturas complexas e em baixas concentrações (MORET & CONTE, 1996; PROESTOS et al., 2008). Os queijos apresentam matriz complexa devido à alta proporção de gordura e proteínas (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000).

A extração de aminos de matriz sólida pode ser realizada utilizando-se água à temperatura ambiente (INGLES et al., 1985) ou a temperaturas altas (VOIGT et al., 1974), bem como solventes orgânicos como metanol (REUVERS et al., 1986) e etanol (SATO et al., 1970) sendo possível, nestas condições, extrair apenas as aminos livres. Na extração de aminos ligadas a outros componentes da matriz, a extração é feita com reagentes ácidos, como ácido clorídrico (CHANG et al., 1985; SANTOS et al., 2003c; CUSTÓDIO et al., 2007), ácido perclórico (KOEHLER & EITENMILLER, 1978; BELLAGAMBA et al., 1997, NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000), ácido tricloroacético (MOTYL et al., 1995; VALE & GLORIA, 1997) e ácido sulfosalicílico (ALMEIDA et al., 2003; GLORIA et al., 2010).

Vários tipos de solventes ácidos são citados na literatura como extratores de aminos bioativas em leite; porém, ainda não há um consenso de qual é o melhor extrator (Tabela 10). Mais estudos são necessários para verificar qual ácido é o mais adequado para leite.

**Tabela 10** – Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em leite

<b>Amostra</b>	<b>Ácido</b>	<b>Centrifugação</b>	<b>Referência</b>
Leite esterilizado	ASS 1,2 g	10000 x g/20 min a 4 °C	ALMEIDA et al. (2003)
Leite cru e esterilizado	ASS 1,2 g	10000 x g/20 min a 4 °C	GLORIA et al. (2010)
Leite humano, leite de rato e fórmulas infantis	ASS 12%	13000 x g/15 min	POLLACK et al. (1992)
Leite de vaca e porca	TCA 10%	—	MOTYL et al. (1995)
Leite de cabra	TCA 10%	—	PLOSZAJ et al. (1997)
Leite humano e de vaca	HClO <sub>4</sub> 0,4 mol/L	2000 x g/20 min	SANGUANSEMSRI et al. (1974)
Leite cru	HClO <sub>4</sub> 0,6 mol/L	30000 x g/10 min a 4 °C	NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2000)
Leite cru	HClO <sub>4</sub> 10%	10410 x g/20 min	BELLAGAMBA et al. (1997)
Leite em pó reconstituído (10%)	HCl 5 mol/L	10000 x g/20 min a 4 °C	SANTOS et al. (2003c)

- não citado pelo autor. ASS – ácido sulfosalicílico; HCl – ácido clorídrico; HClO<sub>4</sub> – ácido perclórico; TCA – ácido tricloroacético.

De acordo com dados da literatura (Tabela 11), para a extração de aminas em queijos os solventes mais comumente usados são: solventes orgânicos como metanol (AOAC, 1995) e etanol (SATO et al., 1970); ácidos como clorídrico (CHANG, 1985; VALE & GLORIA, 1997; VALE & GLORIA, 1998; GENNARO et al., 2003; MARTUSCELLI et al., 2005; CUSTÓDIO et al., 2007; INNOCENTE et al., 2007; MAZZUCCO et al., 2010), perclórico (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; PINHO et al., 2001) e tricloroacético (VALE & GLORIA, 1997). No entanto, VALE & GLORIA (1997) e CUSTÓDIO et al. (2007) avaliaram a eficiência de diferentes solventes na extração de aminas em queijos e obtiveram melhores resultados quando foi utilizado o ácido clorídrico.

**Tabela 11** – Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em queijos

Amostra	Solvente	Centrifugação	Referência
Queijo Cheddar e Suiço	HCl 0,1 mol/L	12.000 x g /20 min a 4 °C	CHANG et al. (1985)
Queijo Parmesão ralado	HCl 1 mol/L e 0,1 mol/L, TCA 5%, ASS 12%, AA 15 % e HClO <sub>4</sub> 0,4 mol/L	11.180 x g /21 min a 4 °C	CUSTÓDIO et al. (2007)
Queijo Italiano	HCl 0,1 mol/L	12.000 x g /20 min a 4 °C	INNOCENTE et al. (2007)
Toma Piemontese e Pecorino Sardo	HCl 0,1 mol/L	4.000 x rpm/20 min a 4 °C	MAZZUCCO et al. (2010)
Queijos maturados e não maturados	HClO <sub>4</sub> 0,6 mol/L	30000 x g /10 min a 4 °C	NOVELLA-RODRÍGUEZ et al. (2000)
Queijo Parmesão	HCl 0,1 mol/L, TCA 5%, metanol	12.000 x g /20 min a 4 °C	VALE & GLORIA (1997)
Queijo Mussarela, Provolone, Parmesão, Minas, Prato e Gouda	HCl 0,1 mol/L	12.000 x g /20 min a 4 °C	VALE & GLORIA (1998)

AA – ácido acético; ASS – ácido sulfosalicílico; HCl – ácido clorídrico; HClO<sub>4</sub> – ácido perclórico; TCA – ácido tricloroacético.

## 6.2 DETECÇÃO

A detecção de aminas em matrizes complexas é difícil devido ao fato destas geralmente estarem presentes em baixas concentrações. Além disto, a maioria das aminas não apresentam absorção no espectro ultra-violeta (UV) e nem fluorescência, tornando-se necessário um processo de derivação para aumentar a absorbância e, conseqüentemente, aumentar a seletividade e sensibilidade da detecção (VIDAL-CAROU et al., 2003; PROESTOS et al., 2008).

Os reagentes de derivação mais comumente empregados na análise de aminas são: cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno sulfonila (cloreto de dansila) (MALLE et al., 1996; PROESTOS et al., 2008), fluorescamina e *orto*-ftalaldeído (OPA) (VALE & GLORIA, 1997; DALGAARD et al., 2006; LAVIZZARI et al., 2006). O uso de OPA é preferido devido à grande seletividade para aminas e ao aumento da sensibilidade pelo uso do método fluorimétrico (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993).

O uso de derivação pós-coluna é recomendado por ser o período de tempo, entre a formação do complexo e a detecção, curto e padronizado (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993).

### 6.3 SEPARAÇÃO

Para a separação e quantificação das aminas em alimentos, vários métodos têm sido desenvolvidos, entre eles, cromatografia de camada delgada (LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004), cromatografia gasosa (BAKER et al., 1987; ANTOINE et al., 2002), e cromatografia líquida de alta eficiência (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; VALE & GLORIA, 1997; INNOCENTE et al., 2007). A separação e quantificação das aminas bioativas por CLAE oferecem maiores vantagens sobre os outros métodos, pois é mais seletiva e sensível, permitindo a detecção de pequenas quantidades de aminas (TAYLOR, 1985; VALE & GLORIA, 1997; PROESTOS et al., 2008).

GLORIA & DAESCHEL (1995), IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996) utilizaram as colunas Ultrasphere ODS, Novapack C<sub>18</sub> e  $\mu$ Bondapack C<sub>18</sub>, respectivamente, para separar aminas bioativas por cromatografia líquida. A separação pode ser feita por sistema isocrático ou por gradiente de eluição, sendo os solventes mais comumente usados a água, o metanol e a acetonitrila (CHANG et al., 1985).

A introdução do contra-íon como o sal sódico dos ácidos hexanosulfônico, heptanosulfônico ou octanosulfônico na fase móvel utilizada na CLAE de fase reversa melhora a separação das aminas. Isto ocorre devido à neutralização das aminas, aumentando o seu tempo de retenção na coluna (LIMA, 1999). KOEHLER & EITENMILLER (1978) e CHANG et al. (1985) introduziram o par iônico ácido heptanosulfônico e o sal sódico do ácido octanosulfônico, respectivamente, à fase móvel para obter melhor separação pelo sistema isocrático e picos mais bem definidos. CHANG et al. (1985) observaram que a melhor separação obtida para histamina, tiramina e triptamina foi utilizando o sal sódico do ácido octanosulfônico 0,02 mol/L acetonitrila: água (80:20). GLORIA & DAESCHEL (1995) obtiveram melhores resultados para amostras de vinho utilizando a fase móvel A: tampão acetato 0,2 mol/L + sal sódico do ácido octano-sulfônico 10 mmol/L dissolvido em 100 mL de água + acetonitrila: metanol (9:1, v/v).

## 7 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade crescente de otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos,

dentre outros objetivos, tem levado a busca por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos.

Otimização corresponde a tomar algo “tão perfeito, efetivo ou funcional quanto possível”. Desta forma, pode-se definir otimização como sendo um processo baseado em instruções que permitam obter o melhor resultado de uma dada situação. Cientificamente, estas instruções são frequentemente expressas por métodos matemáticos que procuram maximizar ou minimizar alguma propriedade específica do sistema em estudo. É uma escolha da propriedade a ser otimizada e das condições de controle que se encontram grande parte das discussões sobre a qual é a melhor indicação para um desempenho ideal do sistema. Em diversas circunstâncias, a propriedade a ser otimizada é denominada de função objetivo ou resposta (BURTON & NICKLESS, 1987).

Usualmente utilizam-se modelos univariados. Este método de otimização é classificado, como um método sequencial e é também conhecido como método clássico de pesquisa, método do fator único ou estratégia um fator de cada vez. Neste método, fixam-se todos os fatores que estão sendo pesquisados em certo nível, menos um dele. Este último é então variado até que se encontre a melhor resposta, passando então esta condição a ser fixada e um novo fator sofre variação. O processo se repete até que todos os fatores tenham sido adequados para fornecer a melhor resposta. O método univariado é muito bom para sistemas nos quais, variáveis otimizadas são independentes, o que de fato é relativamente raro para sistemas químicos (EIRAS et al., 1994).

Os modelos univariados têm como maior desvantagem a não interação dos efeitos entre as variáveis estudadas. Como consequência, esta técnica não avalia os efeitos dos parâmetros analisados sobre as respostas. Outra desvantagem desse modelo é o número excessivo de experimentos necessários para conduzir a pesquisa, o que leva a um aumento do tempo, consumo de reagente e materiais (BEZERRA et al., 2008).

O Plackett-Burman é uma ferramenta importante em “Delineamento de seleção de variáveis” (*Screening Designs*), e que, apesar da sua importância, constitui meramente um passo intermediário de orientação e encaminhamento para o delineamento final (RODRIGUEZ & IEMMA, 2009).

Quando se tem um número grande de variáveis a serem estudadas, o delineamento Plackett-Burman é útil como estudo preliminar, pois seleciona as variáveis principais que interferem no processo ou o elimina em uma etapa seguinte, que consiste

na otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta (CHAUHAN et al., 2007; REDDY et al., 2008; RODRIGUES & IEMMA, 2009).

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica baseada no planejamento fatorial. Esta foi introduzida em 1950 e tem sido usada com muito sucesso principalmente em processos industriais (DOS SANTOS & MASINI, 2009).

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística empregada para a análise de regressão múltipla utilizando dados quantitativos obtidos a partir de um planejamento adequadamente projetado para resolver equações de variáveis simultaneamente. O uso da metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta importante para obter a condição ótima, pois além da redução do tempo de análise experimental e economia de material, avalia as interações entre as variáveis de interesse que podem interferir no processo de extração (BOX et al., 1978; BAŞ & BOYACI, 2007; AHMAD & GILMOUR, 2010).

O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, no qual as variáveis de interesse, que realmente apresentam influências significativas nas respostas, são avaliadas ao mesmo tempo. Para realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores. Em seguida são realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados (BOX et al., 1978; EIRAS et al., 1994, RODRIGUEZ & IEMMA, 2009).

## PARTE EXPERIMENTAL

Para atender aos objetivos deste trabalho, o conteúdo foi dividido em capítulos os quais estão apresentados a seguir:

- I. Otimização do método de extração para determinação de aminos no leite por CLAE;
- II. Influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminos bioativas do leite cru;
- III. Perfil e teores de aminos bioativas em queijos Mussarela comercializados no mercado de Belo Horizonte;
- IV. Influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminos bioativas do queijo Mussarela.

# **CAPÍTULO I - OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS NO LEITE POR CLAE**

## **1 OBJETIVO**

Os objetivos deste trabalho foram: i) otimizar o método de extração para determinação de aminas no leite cru por cromatografia líquida de alta eficiência e ii) aplicar o método otimizado para avaliar o perfil e teores de aminas em amostras de leite bovino, leite humano e bebida láctea.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

#### **2.1.1 Amostras**

Para otimização do método de extração o *pool* de amostras de leite cru foi cedido pelo Laboratório da Qualidade do Leite (LabUFMG) da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras de leite cru foram coletadas em julho de 2009, congeladas em frascos de 250 mL e descongeladas no momento da análise. Para avaliar o perfil e teores de aminas, foram analisadas treze amostras de leite bovino; cinco amostras de leite humano, cedidas pelo Banco de Leite Humano Dona Mariquinha da Coordenadoria da Vigilância à Saúde subordinada à Secretaria de Saúde da Prefeitura de Betim, MG; e quatorze amostras de bebida láctea, dentre elas cinco eram pasteurizadas (armazenadas sob refrigeração) e nove passaram pelo tratamento Ultra Alta Temperatura (UAT); todas adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. As amostras de leite humano foram coletadas e congeladas à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

## 2.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na análise por CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Toda a água utilizada era ultrapura, obtida do Sistema Milli-Q Plus; esta era posteriormente filtrada em membrana HAWP (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas agmatina (AGM, sal sulfato), cadaverina (CAD, dicloridrato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato), histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), tiramina (TIM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O agente de derivação *orto*-ftalaldeído (OPA) também foi adquirido da Sigma.

## 2.1.3 Soluções

As soluções foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar e os padrões de aminas em tubos hermeticamente fechados, todos foram identificados e armazenados sob refrigeração para a realização das análises, exceto a solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio, que foi mantida a 22 °C.

### 2.1.3.1 Solução padrão das aminas

Para o preparo da solução padrão de cada amina considerou-se a massa da base livre (sem a utilização da massa de cloreto ou sulfato) para resultar numa concentração de 1 g/mL em ácido clorídrico 0,1 mol/L. A partir de alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções individuais, obteve-se 10 mL de solução padrão contendo dez aminas na concentração de 100 µg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 e 2,4 µg/mL. Estas soluções foram utilizadas para o preparo da curva de calibração que foi utilizada para a quantificação das aminas. Apenas quatro (PUT, HIM, EPD e EPM) das dez aminas eram de interesse na otimização do método de extração.

### 2.1.3.2 Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio

Como uma das fases móveis, empregou-se a solução tampão de acetato de

sódio 0,2 mol/L e octanossulfonato de sódio 15 mmol/L, com ajuste de pH para 4,9 em potenciômetro digital (Digimed, SP, Brasil) por meio de ácido acético glacial. Esta solução foi filtrada em membrana HAWP, em éster de celulose, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA) e desgaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil).

### 2.1.3.3 Solução derivante

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultrapura, cujo pH foi ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio.

A esta solução foram adicionados 0,2 g de *orto*-ftalaldeído dissolvidos em 3 mL de metanol previamente filtrado, 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol. A solução derivante foi preparada imediatamente antes do uso, desgaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) e mantida sob abrigo da luz.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Delineamento experimental

#### 2.2.1.1 *Screening* das variáveis que afetam a extração das aminas do leite

Para avaliar a influência das variáveis do procedimento de extração na porcentagem de recuperação das aminas encontradas no leite cru, foi utilizado um delineamento para *screening* do tipo Plackett-Burman (PB), para os ácidos tricloroacético (TCA) e sulfosalicílico (ASS). O delineamento incluiu 12 ensaios (PB 12) e três repetições no ponto central para cada tipo de ácido. Nas Tabelas I.1 e I.2 estão apresentados os valores para cada uma das cinco variáveis independentes estudadas para o TCA e para o ASS, respectivamente. As variáveis estudadas foram selecionadas com base nas condições usadas em estudos prévios e também nas limitações do procedimento de extração.

A temperatura de centrifugação foi de 4 °C, visto que há um consenso na literatura de que esta é a melhor temperatura para extração das aminas em leite (MOTYL et al., 1995; ALMEIDA et al., 2003; SANTOS et al., 2003c).

As amostras foram pesadas (10 g), adicionadas de solução ácida e de solução padrão das aminas com concentração conhecida. Em seguida, foram agitadas em agitador tipo vórtex (Biomatic, Porto Alegre, RS, Brasil) e os extratos foram centrifugados em centrífuga refrigerada modelo MR23i (Jouan S.A., Saint Herblain, França). Na extração com ASS as amostras foram mantidas a 4 °C por 30 minutos após a adição de 6 mL da solução ácida. Os resultados foram reportados em porcentagem de recuperação das aminas putrescina, histamina, espermidina e espermina. Nas amostras de leite bovino, humano e bebidas lácteas foi realizada a extração com ASS, porém sem adição da solução padrão das aminas.

**Tabela I.1** – Valores experimentais e os respectivos níveis codificados para as variáveis independentes usados no delineamento Plackett-Burman para extração das aminas com o ácido tricloroacético (TCA)

Variáveis independentes	Código	Níveis codificados		
		-1	0*	+1
Concentração do ácido (%)	X <sub>1</sub>	5	10	15
Tempo de agitação (segundos)	X <sub>2</sub>	30	60	90
Velocidade de centrifugação (g)	X <sub>3</sub>	6.000	10.000	14.000
Tempo de centrifugação (minutos)	X <sub>4</sub>	5	10	15
Número de extrações	X <sub>5</sub>	1	2	3

\* Ponto central.

**Tabela I.2** – Valores experimentais e os respectivos níveis codificados para as variáveis independentes usados no delineamento Plackett-burman para extração das aminas com o ácido sulfosalicílico (ASS)

Variáveis independentes	Código	Níveis codificados		
		-1	0*	+1
Concentração do ácido (%)	X <sub>1</sub>	4	12	20
Tempo de agitação (segundos)	X <sub>2</sub>	30	60	90
Velocidade de centrifugação (g)	X <sub>3</sub>	6.000	10.000	14.000
Tempo de centrifugação (minutos)	X <sub>4</sub>	5	10	15
Número de extrações	X <sub>5</sub>	1	2	3

\* Ponto central.

### 2.2.1.2 Otimização da condição de extração usando o ácido sulfosalicílico

A partir dos resultados obtidos com os dois delineamentos do tipo Plackett-Burman foi realizado um delinamento central composto rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central, para o solvente ASS. O objetivo foi otimizar os resultados obtidos em relação à porcentagem de recuperação das aminas estudadas no primeiro planejamento. As variáveis consideradas foram o número de extrações sucessivas, o tempo de agitação e a concentração do ASS. Foram mantidos fixos os parâmetros tempo e velocidade de centrifugação em 5 minutos e 14.000 x g, respectivamente.

Na Tabela I.3 estão apresentados os valores experimentais e codificados para cada variável independente usada no DCCR. De acordo com as condições de rotabilidade ( $\alpha = (2^3)^{1/4}$ ),  $\alpha$  deve ser -1,68 e +1,68. Entretanto, para o número de extrações –  $X_1$ , os pontos axiais foram - 2 e + 2, visto que esta é uma variável discreta. Para a concentração do ácido –  $X_3$ ,  $-\alpha$  foi igual a -1,3 correspondente a 1,5% de ASS.

Os resultados experimentais obtidos no DCCR foram ajustados aos modelos da putrescina, histamina, esperdimina e espermina, com as variáveis independentes codificadas, que foram estatisticamente significativas. A melhor condição de extração foi validada utilizando quatro repetições. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e os valores de F calculado ( $F_{cal}$ ) e F tabelado ( $F_{tab}$ ) para os modelos propostos também foram determinados.

**Tabela I.3** – Valores experimentais e níveis codificados das variáveis independentes utilizados no Delineamento central composto rotacional para determinação da condição ótima de extração das aminas com o ácido sulfosalicílico

Variáveis independentes	Código	Níveis das variáveis codificadas				
		$-\alpha^*$ (-1,68)	-1	0**	+1	$+\alpha^*$ (+1,68)
Número de extrações	$X_1$	1	2	3	4	5
Tempo de agitação (segundos)	$X_2$	40	60	90	120	140
Concentração do ácido (%)	$X_3$	1,5	4	12	20	25

\*  $\alpha$  foi diferente de  $\pm 1,68$   $X_1$  e de -1,68 para  $X_3$ .

\*\* ponto central.

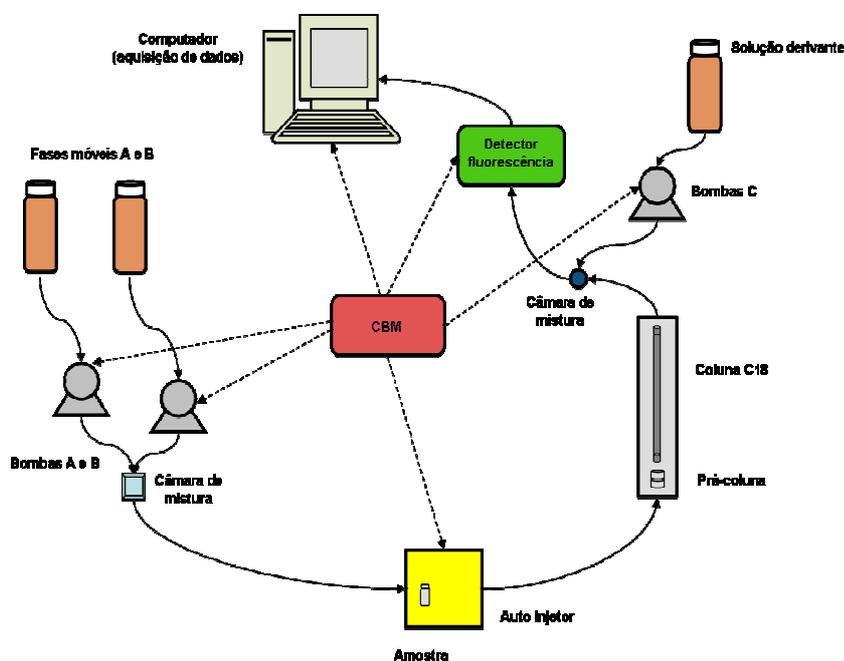
### 2.2.2 Determinação de aminas em leite bovino, leite humano e bebidas lácteas

Foram avaliados o perfil e teores de aminas nas amostras de leite bovino, leite humano, e bebidas lácteas conforme a condição de extração otimizada.

### 2.2.3 Separação e determinação das aminas por CLAE

Após a etapa de extração, os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo e em membranas HAWP em éster de celulose, com 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *orto*-ftalaldeído, conforme descrito por VALE & GLORIA (1997).

Foi utilizado o cromatógrafo (Shimadzu, Kioto, Japão) modelo LC-20AD, com câmara de mistura; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático; detector espectrofluorimétrico (modelo RF-10AXL) a 340 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente, e uma unidade de controle CBM-20A conectada a um microcomputador (*Software* – LC solution). A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna e ligada a um tubo de aço inoxidável de 2 m de comprimento que conectava a câmara ao detector de fluorescência. O fluxo da solução derivante foi de 0,3 mL/min. Na Figura I.1 está disposto um esquema representativo do equipamento utilizado na análise por CLAE com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência.



**Figura I.1** – Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise das aminas bioativas.

Fonte: SILVA (2008a).

Foram utilizadas coluna Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> em fase reversa (300 × 3.9 mm diâmetro interno, 4 µm) e pré-coluna Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters, Milford, MA, EUA). O fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min e o gradiente de eluição está descrito na Tabela I.4. A coluna e a pré-coluna foram mantidas à temperatura de 22 ± 1 °C.

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. No caso de dúvida quanto aos picos correspondentes à determinada amina, a confirmação foi feita por meio da adição de quantidade conhecida de solução padrão da amina à amostra.

**Tabela I.4** – Gradiente de eluição na CLAE-par iônico para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação das aminas

Tempo (min)	Solução tampão (%)	Acetonitrila (%)
0,01	85	15
1	94	6
16	74	26
22	84	16
26	67	33
27	82	18
30	62	38
31,5	85	15
68	85	15

A quantificação das aminas foi realizada por interpolação em curva analítica externa e o valor encontrado na amostra foi multiplicado pelo fator de correção correspondente à amina. Para confirmação da reprodutibilidade da análise, padrões externo foram analisados na concentração de 1,2 µg/mL das 10 aminas bioativas a cada seis amostras.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos planejamentos Plackett-Burman e DCCR foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 SCREENING DAS VARIÁVEIS QUE AFETAM A EXTRAÇÃO DAS AMINAS DO LEITE UTILIZANDO TCA E ASS**

As porcentagens de recuperação obtidas para as aminas bioativas analisadas, utilizando os dois ácidos TCA e ASS estão apresentadas na Tabela I.5. As porcentagens de recuperação variaram de 44,1 a 95,3% para a putrescina, 43,0 a 94,0% para a histamina, 37,3 a 82,8% para a espermidina e 30,5 a 73,6% para a espermina quando foi utilizado o TCA. Para todas as aminas analisadas foram obtidas condições de extração que atenderam o recomendado pelo CODEX (1993), com exceção apenas da espermina.

Para a extração com o ASS (Tabela I.5), as variações nas porcentagens de recuperação foram de 40,1 a 80,6% para a putrescina; 47,2 a 85,2% para a histamina; 40,8 a 85,6% para a espermidina; e 47,2 a 83,7% para a espermina. Para todas as aminas analisadas foram alcançadas condições de extrações satisfatórias.

**Tabela I.5** – Porcentagem de recuperação da extração das aminas putrescina (PUT); histamina (HIM); espermidina (EPD) e espermina (EPM) dos ensaios realizados para os dois delineamentos experimentais Plackett-Burman utilizando-se os ácidos tricloroacético e sulfosalicílico

Ensaio	Variáveis independentes					% de recuperação / Ácido extrator / Aminas							
						Ácido tricloroacético				Ácido sulfosalicílico			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	PUT	HIM	EPD	EPM	PUT	HIM	EPD	EPM
1	1	-1	1	-1	-1	62,1	66,2	56,0	48,7	49,2	60,4	52,8	73,8
2	1	1	-1	1	-1	59,0	60,8	51,1	55,3	53,2	62,2	56,1	77,0
3	-1	1	1	-1	1	95,3	94,0	81,7	71,9	62,1	61,6	55,9	67,9
4	1	-1	1	1	-1	63,6	69,5	61,8	60,0	40,1	47,2	40,8	49,3
5	1	1	-1	1	1	93,0	90,1	81,5	67,6	63,3	75,9	69,2	75,7
6	1	1	1	-1	1	91,2	90,2	82,8	73,6	79,8	85,2	73,8	57,0
7	-1	1	1	1	-1	54,5	53,7	48,2	49,3	56,4	58,3	53,1	64,4
8	-1	-1	1	1	1	61,0	60,0	51,1	52,6	80,6	75,0	85,6	79,1
9	-1	-1	-1	1	1	90,9	93,4	82,3	67,6	63,2	64,9	59,6	65,0
10	1	-1	-1	-1	1	94,5	92,6	82,4	66,8	64,2	78,2	70,2	82,9
11	-1	1	-1	-1	-1	44,1	42,8	37,3	30,5	57,7	60,5	53,6	66,4
12	-1	-1	-1	-1	-1	68,7	70,0	59,0	63,4	50,6	50,9	46,1	47,2
13	0	0	0	0	0	81,2	82,6	69,1	64,8	71,6	76,4	71,1	83,7
14	0	0	0	0	0	76,0	78,7	70,5	55,4	59,0	66,6	56,5	76,8
15	0	0	0	0	0	77,0	80,5	68,1	53,7	61,5	71,0	62,9	80,6

X<sub>1</sub> – Concentração do ácido (%), X<sub>2</sub> – Tempo de agitação (segundos), X<sub>3</sub> – Velocidade de centrifugação (g), X<sub>4</sub> – Tempo de centrifugação (minutos), X<sub>5</sub> – Número de extrações.

Os resultados dos efeitos principais do delineamento Plackett-burman sobre as variáveis dependentes putrescina, histamina, espermidina e espermina para o ácido TCA e ASS estão apresentados na Tabela I.6.

**Tabela I.6** – Efeitos principais na porcentagem de recuperação durante a extração das aminas putrescina; histamina; espermidina e espermina utilizando os ácidos tricloroacético (TCA) e sulfosalicílico (ASS)

Variáveis independentes <sup>a</sup>	Efeitos principais <sup>b</sup> / aminas <sup>c</sup> / ácido extrator							
	PUT		HIM		EPD		EPM	
	TCA	ASS	TCA	ASS	TCA	ASS	TCA	ASS
X <sub>1</sub>	8,2	-3,4	9,3	6,3	9,3	1,5	6,2	4,3
X <sub>2</sub>	-0,7	4,1	-3,4	4,5	-1,7	1,2	-1,8	1,9
X <sub>3</sub>	-3,7	2,7	-2,7	-0,8	-2,0	1,2	0,8	-3,8
X <sub>4</sub>	-5,7	-1,1	-4,7	-2,2	-3,9	2,0	-0,4	2,6
X <sub>5</sub>	<b>29,0</b>	<b>17,6</b>	<b>26,3</b>	<b>16,9</b>	<b>24,7</b>	<b>18,7</b>	<b>15,5</b>	8,3
<b>Média</b>	<b>74,1</b>	<b>60,8</b>	<b>75,0</b>	<b>66,3</b>	<b>65,5</b>	<b>60,5</b>	<b>58,8</b>	<b>69,8</b>

<sup>a</sup> X<sub>1</sub> – Concentração do ácido (%), X<sub>2</sub> – Tempo de agitação (segundos), X<sub>3</sub> – Velocidade de centrifugação (g), X<sub>4</sub> – Tempo de centrifugação (segundos), X<sub>5</sub> - Número de extrações.

<sup>b</sup> em negrito quando  $p < 0,10$ .

<sup>c</sup> PUT – putrescina, HIM – histamina, EPD – espermidina, EPM – espermina.

Dentre as variáveis independentes investigadas, apenas a X<sub>5</sub> foi estatisticamente significativa para as aminas putrescina, histamina e espermidina utilizando os ácidos TCA e ASS. Já para espermina, a variável X<sub>5</sub> foi significativa apenas quando utilizou-se o TCA. Para todas as aminas estudadas, as demais variáveis de extração, não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,10$ ). Este nível de significância foi adotado para minimizar o risco de excluir da etapa seguinte algum fator importante para o processo de extração.

Foi selecionado como ácido extrator o ASS, visto que este promoveu porcentagens de recuperação, conforme recomendado pelo CODEX (1993), para todas as aminas analisadas. Além disso, o número de extrações deve ser levado em consideração no delineamento subsequente, uma vez que este afetou significativamente a porcentagem de recuperação das aminas bioativas.

### 3.2 OTIMIZAÇÃO DA CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO O ÁCIDO SULFOSALICÍLICO

As porcentagens de recuperação das aminas obtidas no DCCR estão indicadas na Tabela I.7. O coeficiente de variação (CV) para as três repetições no ponto central, para todas as respostas, foram inferiores a 15% (0,5 – 4,2%), de acordo com o estabelecido pelo CODEX (1993).

**Tabela I.7** – Valores codificados e as respostas da porcentagem de recuperação da putrescina, histamina, espermidina e espermina com o ácido sulfosalicílico no Delineamento central composto rotacional

Ensaio	Variáveis independentes			% de recuperação das aminas			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	PUT	HIM	EPD	EPM
1	-1	-1	-1	93,7	91,6	89,3	87,7
2	-1	-1	+1	86,6	86,3	80,5	97,3
3	-1	+1	-1	88,7	85,1	80,5	92,6
4	-1	+1	+1	84,9	84,1	75,3	87,5
5	+1	-1	-1	104,6	101,8	94,7	101,5
6	+1	-1	+1	95,2	96,5	86,1	93,1
7	+1	+1	-1	99,2	101,3	94,1	105,6
8	+1	+1	+1	91,4	95,4	85,5	106,6
9	-2	0	0	80,1	79,5	73,9	76,9
10	+2	0	0	96,6	97,2	88,3	106,0
11	0	-1,68	0	98,8	98,6	90,4	103,0
12	0	+1,68	0	95,8	96,0	89,2	89,4
13	0	0	-1,3	96,8	91,2	86,6	99,3
14	0	0	+1,68	92,5	95,5	88,4	101,5
15	0	0	0	89,9	91,0	84,6	100,0
16	0	0	0	90,9	95,1	89,5	106,8
17	0	0	0	90,3	94,0	87,0	108,4

X<sub>1</sub> – Número de extrações, X<sub>2</sub> – Tempo de agitação (seg), X<sub>3</sub> – Concentração do ácido (%).  
PUT – putrescina, HIM – histamina, EPD – espermidina, EPM – espermina.

Com base nos resultados obtidos no DCCR, foi possível construir os modelos para PUT, HIM, EPD e EPM a partir das variáveis codificadas, com os parâmetros estatisticamente significativos (Tabela I.8).

**Tabela I.8** – Modelos construídos para putrescina, histamina, espermidina e espermina a partir das variáveis codificadas com os parâmetros significativos

Aminas	Modelos codificados
Putrescina	$Y_{PUT} = 89,2 + 4,35x_1 - 1,53x_2 + 2,46x_2^2 - 3,04x_3 + 2,18x_3^2$
Histamina	$Y_{HIM} = 94,39 + 5,2x_1 - 1,54x_1^2$
Espermidina	$Y_{EPD} = 87,8 + 3,98x_1 - 1,76x_1^2 - 2,30x_3$
Espermina	$Y_{EPM} = 102,8 + 6,3x_1 - 3x_1^2 - 2,7x_2^2$

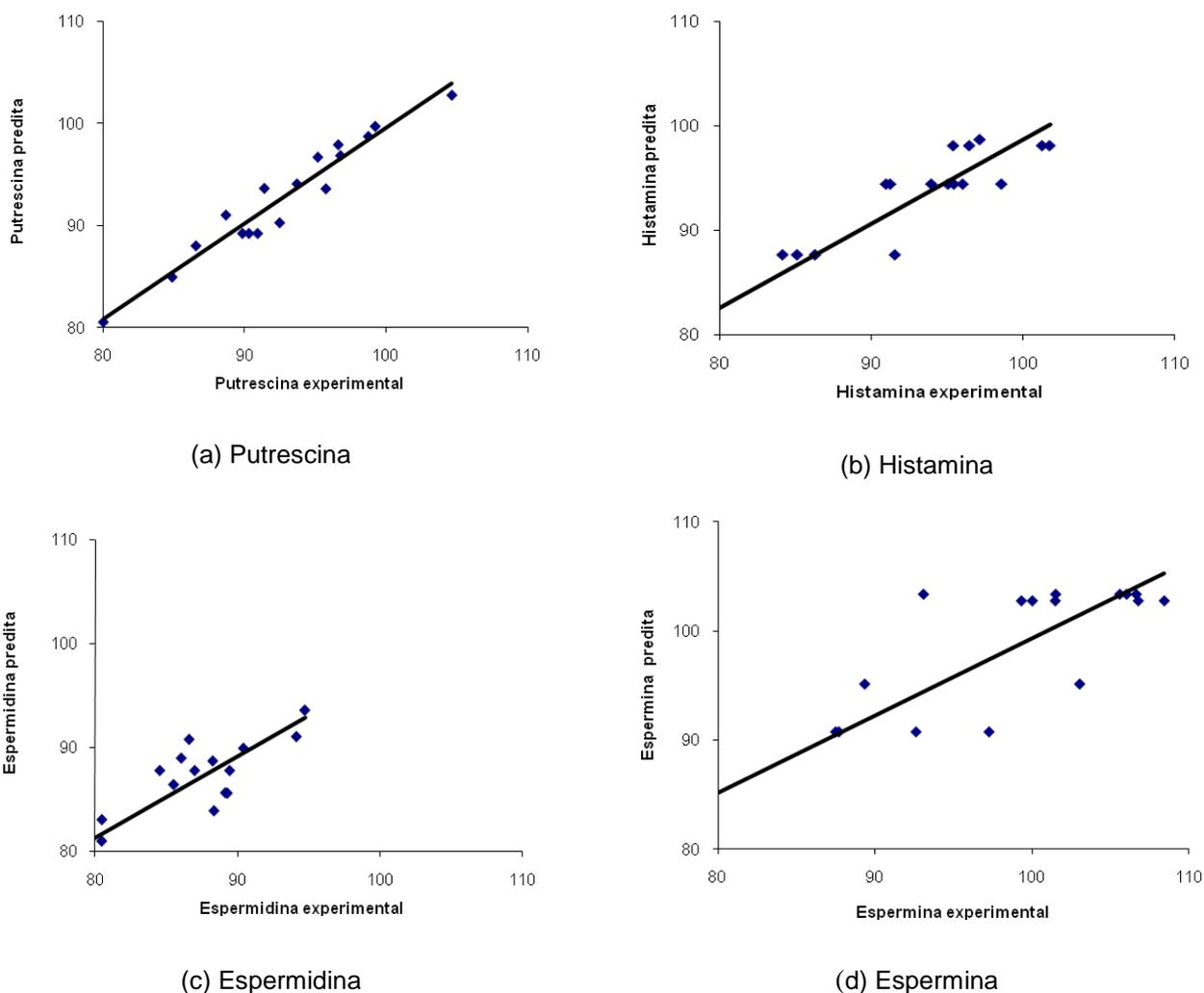
$X_1$  – Número de extrações,  $X_2$  – Tempo de agitação (seg),  $X_3$  – Concentração do ácido (%).

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e os valores  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  para as quatro respostas estão apresentados na Tabela I.9. Os valores de  $R^2$  e  $F_{cal}$  obtidos para a resposta putrescina estão excelentes, no entanto, para as aminas histamina, espermidina e espermina, tais valores foram abaixo do desejado. Entretanto, a porcentagem de variação explicada foi apropriada para descrever o fenômeno. Os valores preditos e experimentais para as aminas putrescina (a), histamina (b), espermidina (c), e espermina (d) estão apresentados na Figura I.2.

**Tabela I.9** – Coeficiente de determinação ( $R^2$ ), F calculado ( $F_{cal}$ ), F tabelado ( $F_{tab}$ ) para as aminas extraídas segundo as condições do Delineamento central composto rotacional

Aminas	$R^2$ (%)	Valores de F	
		$F_{cal}$	$F_{tab}^*$
Putrescina	93,9	33,6	2,45
Histamina	80,5	28,9	2,73
Espermidina	74,0	12,6	2,56
Espermina	70,4	10,3	2,56

\*valores a 10% de significância.



**Figura I.2** – Valores experimentais *versus* valores preditos pelo modelo para as aminas putrescina (a), histamina (b), espermidina (c) e espermina (d).

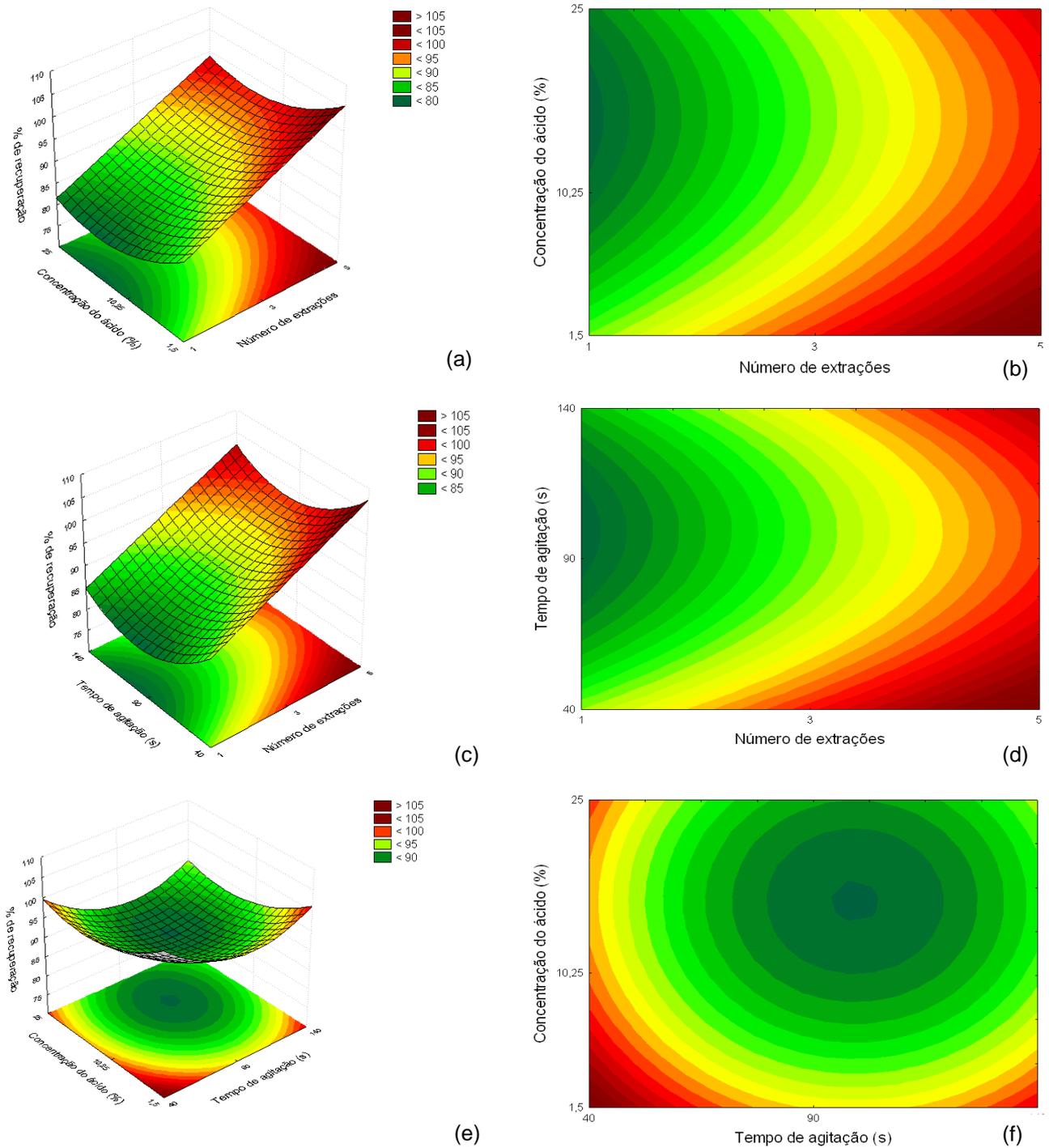
As superfícies de resposta e as curvas de contorno foram construídas com as variáveis significativas (que entraram no modelo), para avaliar as condições das variáveis que levaram a recuperação entre 80 a 110% das quatro aminas.

De acordo com a Figura I.3, pode-se concluir que a porcentagem de recuperação da putrescina foi afetada por todas as variáveis independentes. O aumento no número de extrações sucessivas proporcionou uma maior porcentagem de recuperação da putrescina. A diminuição do tempo de agitação proporcionou uma maior porcentagem de recuperação, bem como as concentrações do ácido sulfosalicílico mais baixas.

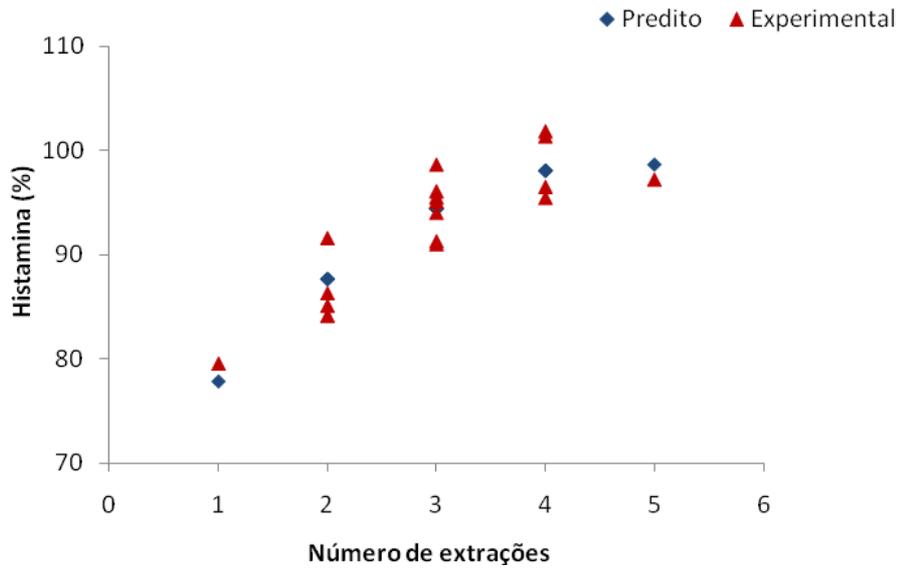
Para a histamina a porcentagem de recuperação só foi afetada pela variável número de extração, indicando quatro extrações sucessivas como a melhor condição para recuperação (Figura I.4).

Conforme apresentado na Figura I.5 para a espermidina, o aumento no número de extrações sucessivas e a menor concentração do ASS proporcionaram uma maior porcentagem de recuperação, enquanto que o tempo de agitação não afetou a porcentagem de recuperação.

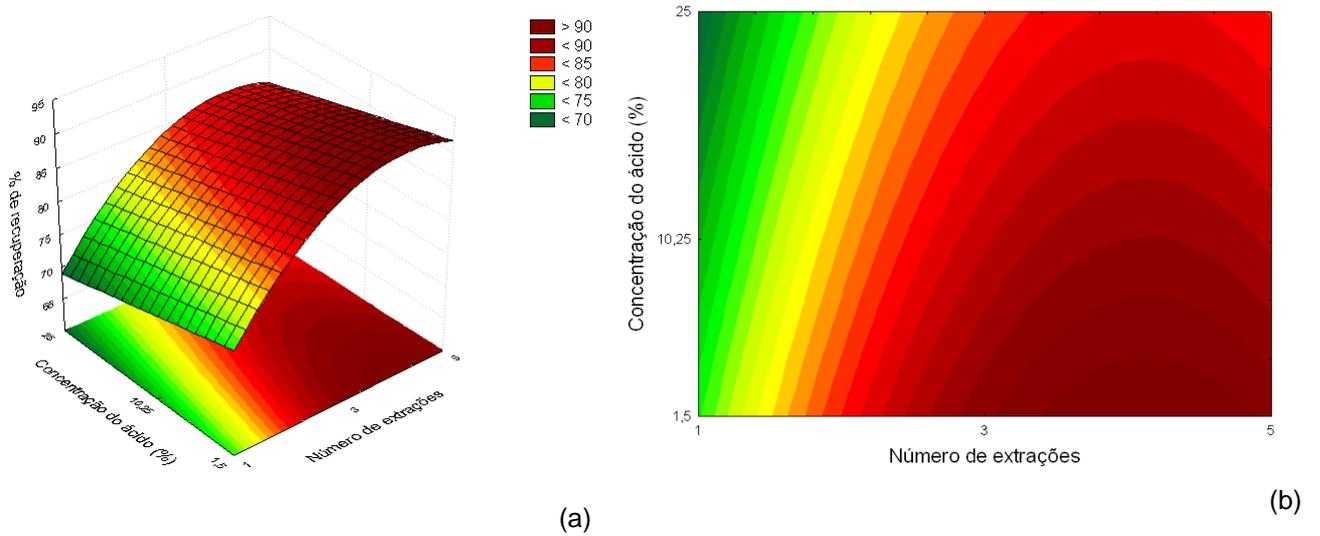
Para a amina espermina, o aumento do número de extrações sucessivas e a diminuição do tempo de agitação indicaram uma maior porcentagem de recuperação, enquanto que a concentração do ácido não apresentou influência significativa (Figura I.6). Como o número de extrações pode diluir o extrato, reduzindo a sensibilidade do método, quatro extrações sucessivas foram utilizadas posteriormente.



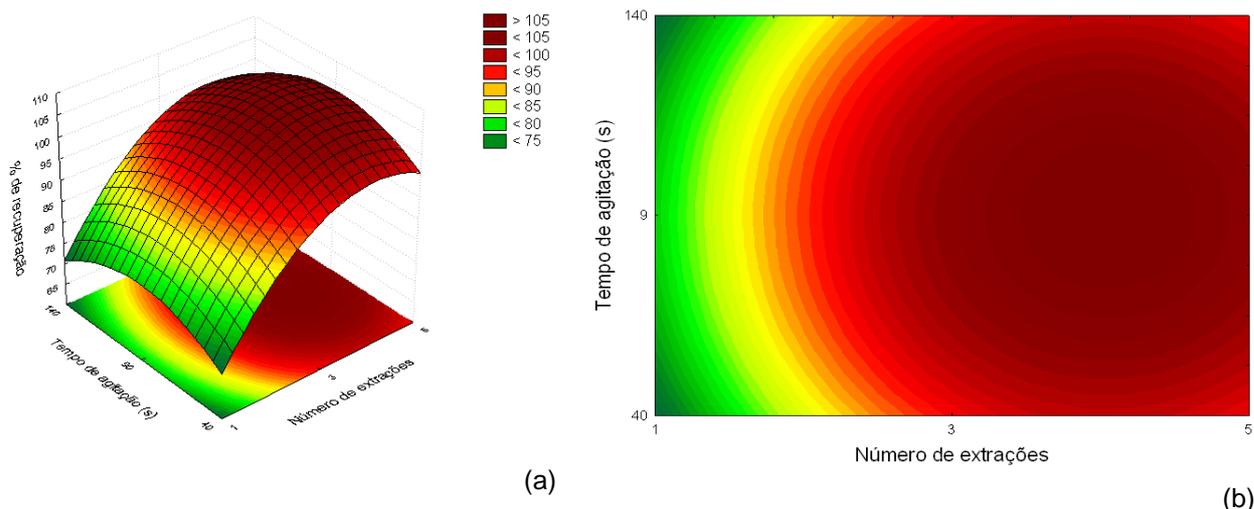
**Figura I.3** - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a putrescina em função do número de extrações e da concentração do ácido (a) e (b), do tempo de agitação e número de extrações (c) e (d), da concentração do ácido e do tempo de agitação (e) e (f).



**Figura I.4** – Porcentagens de recuperação de histamina em função do número de extrações.



**Figura I.5** – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a espermidina em função da concentração do ácido e do número de extrações (a) e (b).



**Figura I.6** – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a espermina em função do tempo de agitação e número de extrações (a) e (b).

A partir das análises das superfícies de resposta foi possível determinar a condição de extração em que se obtém uma porcentagem de recuperação da putrescina, histamina, espermidina e espermina entre 80 e 110%. Tais condições estão apresentadas na Tabela I.10, que mostra, separadamente, os valores em que as variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  proporcionaram maior porcentagem de recuperação das aminas.

Conforme pode ser observado, a melhor condição de extração para se obter uma porcentagem de recuperação das aminas estudadas entre 80 e 110% foi de 4 extrações sucessivas, 40 segundos de agitação em vórtex e concentração do ASS igual a 1,5%.

**Tabela I.10** – Condição de extração onde se obtém maior porcentagem de recuperação das aminas analisadas

Variáveis independentes	Código	Putrescina	Histamina	Espermidina	Espermina
Número de extrações	$X_1$	+1 (4)	+1 (4)	+1 (4)	+1 (4)
Tempo de agitação	$X_2$	- $\alpha$ (40 seg)	Indiferente	- $\alpha$ (40 seg)	-1 (60 seg)
Concentração do ácido	$X_3$	- $\alpha$ (1,5%)	Indiferente	- $\alpha$ (1,5%)	Indiferente

A confirmação dos resultados foi realizada por meio de um ensaio experimental (4 repetições) na condição em que se obtém maior porcentagem de recuperação das aminas. Na Tabela I.11 estão apresentados os valores experimentais e preditos através dos modelos.

As porcentagens de recuperação obtidas para as variáveis dependentes putrescina, histamina, espermidina e espermina encontram-se dentro da faixa desejada, ou seja, entre 80 e 110%, sendo os resultados preditos próximos aos experimentais. Os coeficientes de variação obtidos variaram de 3,5 a 5,8%. Esse resultado sugere que a estratégia seqüencial de delineamentos, utilizada para otimizar as quatro respostas simultaneamente na metodologia de extração das aminas no leite cru foi efetiva.

**Tabela I.11** – Resultados experimentais e preditos obtidos na condição otimizada de extração das aminas

Aminas	(% de recuperação*)	
	Valores esperimentais	Valores preditos
Putrescina	93,2	110,7
Histamina	94,1	98,1
Espermidina	92,8	93,0
Espermina	104,1	98,5

\* Média de quatro repetições. Condição ótima: Tempo de agitação 40 s, quatro extrações sucessivas, concentração do ácido sulfosalicílico de 1,5%, 5 min e 14.000 g de tempo e velocidade de centrifugação, respectivamente.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE AMINAS EM LEITE BOVINO, LEITE HUMANO E BEBIDAS LÁCTEAS

Dentre as amostras de leite bovino analisadas, nenhuma delas foram detectadas as aminas bioativas (< 0,5 mg/L). Estes resultados são similares aos reportados na literatura, os quais sugerem que o leite bovino não é uma boa fonte de aminas livres (SANGUANSERMSRI et al., 1974; MOTYL et al., 1995).

Nas amostras de leite humano foi encontrada a amina espermidina, em concentrações variando de < 0,5 mg/L a 0,84 mg/L e traços de putrescina e espermina. MOREIRA-ARAÚJO (2003) obteve um teor médio de 0,72 mg/L de espermidina, porém SILVA (2008b) encontrou um teor inferior aos obtidos neste trabalho, de 0,32 mg/L.

Nas bebidas lácteas, foi encontrada apenas a amina putrescina em quantidades variando de < 0,5 mg/L a 0,58 mg/L. A presença de putrescina pode indicar a contribuição de outros ingredientes da fórmula nos teores destas aminas, ou a presença de micro-organismos que sintetizam e liberam enzimas capaz de produzi-las (LANDETE et al., 2008).

## 4 CONCLUSÕES

O método para a extração das aminas em leite foi otimizado. As variáveis dependentes, as quais afetaram significativamente as respostas utilizando os ácidos tricloroacético e sulfosalicílico foram selecionadas no delineamento Plackett-Burman. Foram fixados para o planejamento seguinte, cinco minutos e 14.000 g como o tempo e velocidade de centrifugação, respectivamente. O ácido sulfosalicílico proporcionou melhores porcentagens de recuperação que o ácido tricloroacético. O DCCR foi utilizado para otimizar as variáveis dependentes com o ácido sulfosalicílico. Neste planejamento, a condição ótima para a extração das aminas foi de 40 segundos de agitação, quatro extrações sucessivas e 1,5% de ácido sulfosalicílico. Esta condição proporcionou porcentagem de recuperação  $\geq 92,8\%$  e coeficiente de variação  $\leq 5,8\%$ . No leite bovino as aminas não foram detectadas ( $< 0,05$  mg/L), enquanto que no leite humano foi encontrada a espermidina em teores variando de  $< 0,5$  mg/L a 0,84 mg/L. Nas bebidas lácteas foi encontrada a amina putrescina, em quantidades variando de  $< 0,5$  mg/L a 0,58 mg/L.

# **CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA QUALIDADE E NO PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS DO LEITE CRU**

## **1 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes contagens de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminos bioativas do leite cru. Os objetivos específicos foram: i) avaliar a qualidade do leite cru com diferentes contagens de células somáticas em relação aos seguintes parâmetros: composição centesimal, pH, acidez e contagem bacteriana total; ii) determinar o perfil e teores de aminos no leite com diferentes níveis de contagens de células somáticas; e iii) investigar a possibilidade de utilizar aminos como índice da qualidade de leite cru em relação a contagem de células somáticas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

#### **2.1.1 Amostras**

As amostras de leite cru foram cedidas pelo Laboratório da Qualidade do Leite (LabUFMG) da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras de leite foram coletadas em julho de 2009 e selecionadas de acordo com as seguintes faixas de contagem de células somáticas (CCS): baixa (< 400.000 CS/mL), média (401.000 a 750.000 CS/mL) e alta (> 751.000 CS/mL). Foram analisadas cinco amostras de cada faixa de CCS estabelecida.

#### **2.1.2 Reagentes, soluções e solventes**

Os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na análise por CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os

solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Toda a água utilizada era ultrapura, obtida do Sistema Milli-Q Plus; esta era posteriormente filtrada em membrana HAWP (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões de aminas e as soluções tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio e derivante foram preparados conforme descrito no Capítulo I.

## **2.2 MÉTODOS**

### **2.2.1 Determinação da contagem de células somáticas, composição centesimal e contagem bacteriana total**

As análises de contagem de células somáticas (CCS) e composição centesimal foram realizadas no analisador eletrônico Bentley Combi System 2300® (Bentley Instruments®, Chaska, EUA), composto por uma unidade do equipamento Bentley 2000 trabalhando conjuntamente com uma unidade do equipamento Somacount 300. A contagem de células somáticas foi realizada por citometria de fluxo e a composição centesimal por absorção de energia na faixa do infravermelho. As amostras contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) foram aquecidas a 40 °C por 20 minutos, agitadas e colocadas no equipamento para serem analisadas. Os resultados foram automaticamente impressos ao final da análise em g/100 g da amostra para composição centesimal e CS/mL para contagem de células somáticas. Para calibração do equipamento foram utilizadas amostras padrão de origem canadense. Um laudo contendo os resultados das análises de referência dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais e das contagens de células somáticas era enviado juntamente com as amostras padrão.

A análise de contagem bacteriana total (CBT) foi realizada nas amostras de leite cru contendo o conservante azidiol por citometria de fluxo no equipamento eletrônico BactoCount IBC 150® (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Minnesota, EUA). A contagem individual de bactérias foi transformada em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) após transformação estatística automática baseada numa curva de calibração previamente elaborada (BENTLEY Instruments®, 2002).

### **2.2.2 Determinação do pH**

O pH das amostras de leite cru foi determinado utilizando um potenciômetro

digital (Digimed DM20, SP, Brasil) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 em temperatura ambiente (BRASIL, 2006).

### **2.2.3 Determinação da acidez titulável**

A determinação da acidez titulável foi realizada conforme metodologia descrita pela AOAC (1995).

### **2.2.4 Determinação das aminos bioativas**

As aminos foram extraídas com ácido sulfosalicílico e os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo e em membranas HAWP em éster de celulose, de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Em seguida, foi realizada a injeção e análise em CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *orto*-ftalaldeído, conforme descrito no Capítulo I.

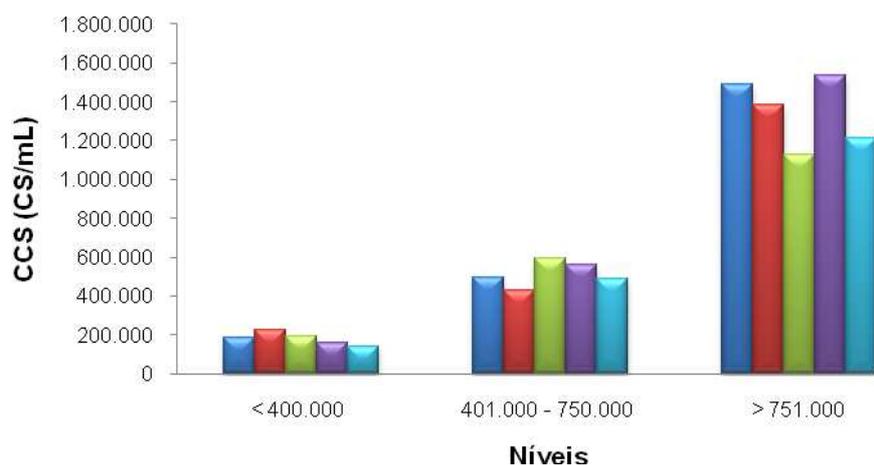
## **2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa estatístico Minitab® versão 15 (Minitab Inc, State College, PA, EUA).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, CONTAGEM BACTERIANA TOTAL, PH E ACIDEZ**

Os resultados obtidos na determinação da CCS das amostras de leite cru estão apresentados na Figura II.1. Os valores de CCS variaram de 142.000 a 228.000 CS/mL; de 427.000 a 596.000 CS/mL; e de 1.126.000 e 1.535.000 CS/mL para os níveis baixo, médio e alto, respectivamente.



**Figura II.1** – Valores das contagens de células somáticas (CCS) obtidos nas amostras de leite cru.

Os resultados das análises de composição centesimal, CBT, pH e acidez estão apresentados na Tabela II.1. Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2002), dentre os parâmetros físico-químicos utilizados para avaliar a qualidade do leite cru encontram-se: gordura (mín 3,0 g/100 g), proteínas (mín 2,9 g/100 g) e acidez (0,14 a 0,18 g/100 mL de ácido láctico). Todas as amostras analisadas estavam em conformidade em relação a estes requisitos.

Os valores obtidos para CBT foram transformados em escala logarítmica em base 10 para realização da análise estatística (Tabela II.1). Não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para CBT entre as amostras com diferentes CCS. O limite máximo permitido para CBT em amostras de leite cru é de 750.000 UFC/mL (BRASIL, 2002). Das amostras investigadas, 20% estavam com valores entre 750.000 e 1.000.000 UFC/mL. Estes valores de CBT podem estar associados a saúde da glândula mamária, às condições inadequadas de manejo no rebanho, à higiene na obtenção do leite, da sala de ordenha, aos equipamentos e utensílios usados e as condições de estocagem e transporte do leite (FONSECA & SANTOS, 2000; HOLM et al., 2004; ANDRADE et al., 2009). Ou seja, um leite com baixa CCS nem sempre garante uma boa qualidade microbiológica.

Observa-se que a CCS não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) a maioria dos constituintes do leite, com exceção da lactose. ANDREATTA (2006) e COELHO (2007) encontraram um maior teor de proteína e gordura para as amostras com CCS alta, no entanto a lactose apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). BUENO et al. (2005) observaram uma redução na concentração de sólidos totais e proteínas com o aumento da CCS. Porém, SILVA-PADRA et al. (2000) também não encontraram diferença

significativa entre os teores de sólidos totais em amostras de leite mastístico e não mastístico.

**Tabela II.1** – Composição centesimal, contagem bacteriana total (CBT), pH e acidez das amostras de leite cru com diferentes níveis de contagens de células somáticas

Características	Valores médios (média ± DP) por faixa de contagem de células somáticas (CS/mL)		
	< 400.000	401.000 a 750.000	> 751.000
Acidez *	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
pH	6,78 ± 0,04	6,82 ± 0,03	6,82 ± 0,17
Gordura (g/100 g)	3,96 ± 0,28	3,85 ± 0,57	4,37 ± 0,20
Proteína (g/100 g)	3,32 ± 0,13	3,35 ± 0,08	3,41 ± 0,13
Lactose (g/100 g)	4,44 <sup>a</sup> ± 0,05	4,34 <sup>ab</sup> ± 0,02	4,29 <sup>b</sup> ± 0,08
Sólidos totais (g/100 g)	12,64 ± 0,37	12,44 ± 0,73	13,00 ± 0,20
CBT (log UFC/mL)	5,66 ± 0,26	5,40 ± 0,51	5,60 ± 0,17

\* g/100 mL de ácido láctico; DP – desvio-padrão. Valores para cada linha com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

Em relação aos teores de gordura, não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nas amostras com diferentes níveis de CCS. Estes resultados estão diferentes dos obtidos por PEREIRA et al. (1999), BUENO et al. (2005), ANDREATTA (2006) e COELHO (2007), que encontraram maiores teores de gordura nas amostras com CCS alta, e HARMON (1994), que mencionou uma redução do teor de gordura com o aumento da CCS. A diminuição na concentração de gordura pode ser ocasionada pela menor síntese de gordura pelas células epiteliais devido a infecção da glândula mamária (KITCHEN, 1981). Porém, se a redução da produção de leite for mais acentuada que o decréscimo da produção de gordura, ocorrerá concentração deste componente (KITCHEN, 1981; MACHADO et al., 2000).

Em relação aos teores de proteína total, também não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes faixas de CCS. No entanto, ANDREATTA (2006) encontrou uma maior concentração de proteína, nas amostras com alta CCS. O aumento do teor da proteína total proporcional a CCS, pode ser devido à alteração da permeabilidade da membrana da glândula mamária, permitindo assim a passagem de proteínas do sangue para o leite. Este aumento não deve ser considerado favorável a qualidade visto que durante o processamento industrial do leite, estas proteínas são perdidas, enquanto a concentração de caseína, que realmente é de interesse é reduzida (BRITO & BRITO, 2010).

Em relação a concentração de lactose, houve uma diminuição significativa

( $p < 0,05$ ) nas amostras com alta CCS. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SILVA-PADRA et al. (2000) e BUENO et al. (2005). A redução na concentração de lactose pode ser justificada pela menor síntese ocasionada pela destruição do tecido secretor, à perda de lactose da glândula para a corrente sanguínea decorrente do aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue e à utilização da lactose pelos patógenos intramamários (SHUSTHER et al., 1991).

Em relação aos valores de pH e acidez titulável, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os níveis de CCS. Estes resultados estão de acordo com SHELDRAKE et al. (1983), DELLA LIBERA et al. (2001), ANDREATTA (2006) e COELHO (2007).

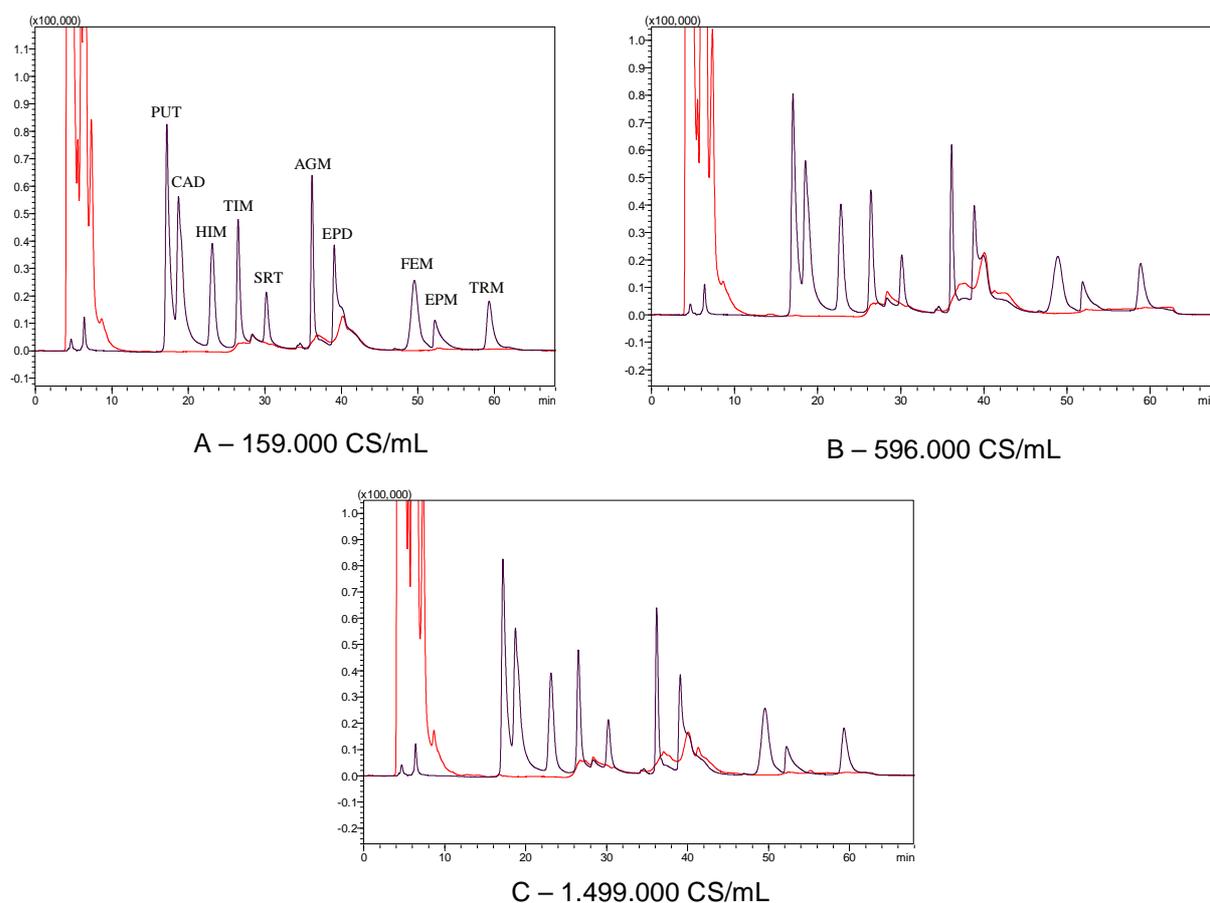
### **3.2 PERFIL E TEORES DAS AMINAS BIOATIVAS**

Dentre as amostras de leite cru investigadas, em nenhuma delas foi encontrada a presença de teores quantificáveis de aminas livres ( $\geq 0,5$  mg/L). Estes resultados sugerem que a contagem de células somáticas não afetou de forma significativa o perfil e teores de aminas no leite cru.

OKAMOTO et al. (1997) também não encontraram aminas no leite bovino. Porém, ALMEIDA et al. (2003) encontraram baixos teores de putrescina (0,05 mg/L), cadaverina (0,04 mg/L), espermidina (0,11 mg/L), espermina (0,10 mg/L) e serotonina (0,28 mg/L) no leite UAT. No leite cru recém ordenhado, GLORIA et al. (2010) encontraram putrescina (0,10 mg/L), espermidina (0,09 mg/L) e espermina (0,20 mg/L).

Exemplos de cromatogramas obtidos para os leites com CCS  $< 400.000$  CS/mL (A), 401.000 a 750.000 CS/mL (B) e  $> 751.000$  CS/mL (C) estão apresentados na Figura II.2.

Os dados obtidos para leite cru sugerem que este alimento não seria fonte de aminas bioativas. Desta forma, a presença e os teores de aminas não poderia ser utilizado como parâmetro para predizer a qualidade do leite cru em relação a contagem de células somáticas.



**Figura II.2** – Cromatogramas de amostras de leite cru com contagens de células somáticas (CS/mL) < 400.000 (A), 401.000 a 750.000 (B) e > 751.000 (C). \_\_ Solução padrão de aminas (1,2 µg/mL), \_\_ amostra de leite cru. PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, TIM – tiramina, SRT – serotonina, AGM – agmatina, EPD – espermidina, FEM – feniletilamina, EPM – espermina, TRM – triptamina. CLAE - par iônico em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação com *orto*-ftalaldeído.

## 4 CONCLUSÕES

A contagem de células somáticas pode trazer prejuízos a qualidade do leite, principalmente em relação ao teor de lactose. A contagem de células somáticas não afetou o perfil e teores de aminas no leite cru. Desta forma, o perfil e teores de aminas não seriam bons parâmetros para predizer a qualidade do leite cru em relação à contagem de células somáticas.

# **CAPÍTULO III - PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJOS MUSSARELA COMERCIALIZADOS NO MERCADO DE BELO HORIZONTE**

## **1 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade e o perfil e os teores de aminos bioativas em queijos Mussarela disponíveis no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Os objetivos específicos foram: i) determinar o perfil e teores de aminos bioativas livres; ii) determinar a umidade e o pH; e iii) correlacionar os teores de aminos com os parâmetros pH e umidade de queijos Mussarela.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

#### **2.1.1 Amostras**

As amostras de queijo Mussarela foram adquiridas, de outubro de 2009 a agosto de 2010, no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Foram analisadas três lotes de dez diferentes marcas de queijo Mussarela, sendo oito proveniente de leite bovino (A, B, C, D, E, F, G e H) e duas de leite bubalino (I e J).

#### **2.1.2 Reagentes e solventes**

Os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na análise por CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Toda a água utilizada era ultrapura, obtida do Sistema Milli-Q Plus; esta era posteriormente filtrada em membrana HAWP (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminos histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT,

dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), agmatina (AGM, sal sulfato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O agente de derivação *orto*-ftalaldeído (OPA) também foi adquirido da Sigma.

### 2.1.3 Soluções

As soluções foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar e os padrões de aminas em tubos hermeticamente fechados, todos foram identificados e armazenados sob refrigeração para a realização das análises, exceto a solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio, que foi mantida a 22 °C.

#### 2.1.3.1 Solução padrão das aminas

Para o preparo da solução padrão de cada amina considerou-se a massa da base livre (sem a utilização da massa de cloreto ou sulfato) para resultar numa concentração de 1 mg/mL em ácido clorídrico 0,1 mol/L. A partir de alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções individuais, obteve-se 10 mL de solução padrão contendo dez aminas na concentração de 100 µg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; e 12,0 µg/mL. Estas soluções foram utilizadas para o preparo de duas curvas de calibração que foram utilizadas para a quantificação das aminas. Para as curvas com baixas e altas concentrações de aminas foram utilizadas as soluções padrões nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; e 2,4 µg/mL e de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; e 12,0 µg/mL, respectivamente.

#### 2.1.3.2 Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio

Como uma das fases móveis, empregou-se a solução tampão de acetato de sódio 0,2 mol/L e octanossulfonato de sódio 15 mmol/L, com ajuste de pH para 4,9 em potenciômetro digital (Digimed, SP, Brasil) por meio de ácido acético glacial. Esta solução foi filtrada em membrana HAWP, em éster de celulose, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA) e degaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil).

### 2.1.3.3 Solução derivante

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultrapura, cujo pH foi ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio.

A esta solução foram adicionados 0,2 g de *orto*-ftalaldeído dissolvidos em 3 mL de metanol previamente filtrado, 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol. A solução derivante foi preparada imediatamente antes do uso, desgaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) e mantida sob abrigo da luz.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Determinação das aminas bioativas

#### 2.2.1.1 Extração

O método de extração das aminas foi baseado em CUSTÓDIO et al. (2007) com modificações. A modificação do método foi apenas na quantidade de amostra que utilizou-se 10 g de queijo. Para preparo das amostras, os queijos foram cortados em pedaços, quarteados e triturados. Em seguida, 10 g de amostra foram adicionadas de 15 mL de HCl 1 mol/L e agitadas em agitador orbital (TE-140 Tecnal, SP, Brasil) a 250 rpm, por 10 minutos. A mistura foi centrifugada ( $11.180 \times g$  à 4 °C por 21 min) em centrífuga refrigerada modelo MR23i (Jouan S.A., Saint Herblain, França) e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo. O resíduo sólido foi extraído mais duas vezes com 15 mL de HCl 1 mol/L usando os mesmos procedimentos descritos acima. Juntou-se os filtrados e o volume foi acertado para 50 mL adicionando HCl 1 mol/L.

#### 2.2.1.2 Separação e determinação das aminas por CLAE

Após a etapa de extração, os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo e em membranas HAWP em éster de celulose, com 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por

fluorimetria após derivação pós-coluna com *orto*-ftalaldeído, conforme descrito por VALE & GLORIA (1997).

Foi utilizado o cromatógrafo (Shimadzu, Kioto, Japão) modelo LC-20AD, com câmara de mistura; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático; detector espectrofluorimétrico (modelo RF-10AXL) a 340 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente, e uma unidade de controle CBM-20A conectada a um microcomputador (*Software* – LC solution). A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna e ligada a um tubo de aço inoxidável de 2 m de comprimento que conectava a câmara ao detector de fluorescência. O fluxo da solução derivante foi de 0,3 mL/min

Foram utilizadas coluna Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> em fase reversa (300 × 3,9 mm diâmetro interno, 4 µm) e pré-coluna Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters, Milford, MA, EUA). O fluxo da fase móvel foi de 0,5 L/min e o gradiente de eluição está descrito na Tabela III.1. A coluna e a pré-coluna foram mantidas à temperatura de 22 ± 1 °C.

**Tabela III.1** – Gradiente de eluição na CLAE-par iônico para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação das aminas

Tempo (min)	Solução tampão (%)	Acetonitrila (%)
0,01	85	15
2	93	7
15	93	7
18	71	29
23	88	12
35	88	12
39	71	29
45	85	15
65	85	15

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. No caso de dúvida quanto aos picos correspondentes à determinada amina, a confirmação foi feita por meio da adição de quantidade conhecida de solução padrão da amina à amostra.

A quantificação das aminas foi realizada por interpolação em curva analítica externa e o valor encontrado na amostra foi multiplicado pelo fator de correção correspondente à amina. As soluções de padrão externo foram analisadas nas concentrações de 1,2 e 6,0 µg/mL a cada seis amostras, para quantificação das

aminas em concentrações baixa e alta, respectivamente.

### **2.2.2 Determinação do pH**

O pH dos queijos foi determinado utilizando um potenciômetro digital (Digimed DM20, SP, Brasil) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 em temperatura ambiente, conforme método descrito por BRASIL (2006).

### **2.2.3 Determinação do teor de umidade**

O teor de umidade foi determinado pelo método de estufa à 105 °C, conforme o método descrito pela AOAC (1995).

## **2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

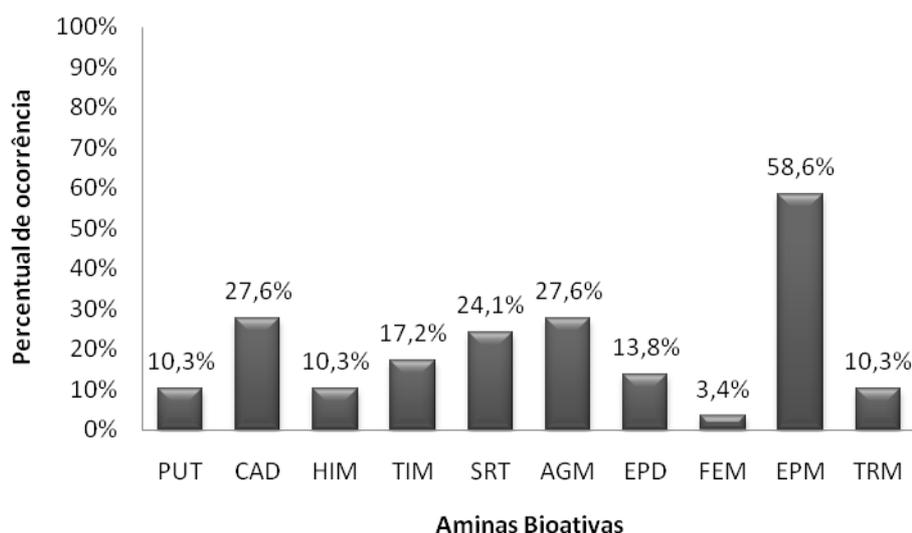
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os coeficientes de correlação de Spearman foram obtidos utilizando o programa estatístico SAEG, versão 9.1. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA**

Foram encontradas as dez aminas bioativas pesquisadas nas amostras de queijo Mussarela coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG (Figura III.1). Os percentuais de ocorrência das aminas variaram de 3,4 a 58,6%. VALE & GLORIA (1998) avaliaram o perfil e teores de aminas bioativas em amostras de queijo Mussarela e os percentuais de ocorrência foram superiores aos obtidos neste trabalho, variando de 15 a 100%.



**Figura III.1** – Percentual de ocorrência das aminas bioativas nas amostras de queijo Mussarela adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG. PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, TIM – tiramina, SRT – serotonina, AGM – agmatina, EPD – espermidina, FEM – feniletilamina, EPM – espermina, TRM – triptamina.

As aminas que tiveram maiores percentuais de ocorrência foram a espermina (58,6%), seguida da agmatina e cadaverina (27,6%). No estudo realizado por VALE & GLORIA (1998), a amina que apresentou maior percentual de ocorrência também foi a espermina (100%), mas seguida da histamina (69%). A cadaverina, a putrescina, e a espermidina foram encontradas em 62% das amostras e a agmatina foi encontrada em menor percentual (15%), resultado diferente do obtido neste trabalho.

A feniletilamina foi a amina que apresentou menor percentual de ocorrência (3,4%), entretanto VALE & GLORIA (1998) encontraram esta amina em 54% das amostras analisadas.

As aminas putrescina, histamina, tiramina, serotonina, espermidina e triptamina apresentaram percentuais de ocorrência de 10,3, 10,3, 17,2, 24,1, 13,8 e 10,3% respectivamente.

### 3.2 TEORES DE AMINAS BIOATIVAS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA

Dentre as dez marcas de queijo analisadas, em apenas uma marca não foi detectada a presença de aminas bioativas (a marca A). As marcas B, D e F foram as que apresentaram maiores teores totais das aminas variando de 70,3 a 85,4 mg/Kg;

37,7 a 81,1 mg/Kg e 59,8 a 63,2 mg/Kg, respectivamente. As amostras C, E e H, apresentaram os menores teores totais de aminos variando de 0,0 a 0,8 mg/Kg; 0,0 a 0,9 mg/Kg e 0,0 a 1,1 mg/Kg, respectivamente. Nas amostras G, I e J os teores totais foram intermediários, com valores variando de 8,3 a 8,5 mg/Kg; 1,2 a 7,1 mg/Kg e 9,1 a 18,1 mg/Kg, respectivamente.

Na Tabela III.2 estão apresentados os teores de aminos bioativas encontrados nas diferentes marcas de queijo Mussarela. A histamina foi encontrada em duas marcas, sendo uma proveniente de leite bovino (F) e a outra de leite bubalino (J), com os teores variando de 20,3 a 24,1 mg/Kg e < 0,5 a 3,0 mg/Kg, respectivamente.

VALE & GLORIA (1998) encontraram teores de histamina superiores aos obtidos neste trabalho para queijo Mussarela proveniente de leite bovino, variando de  $\leq 0,7$  a 113,3 mg/kg. No entanto, VOIGT et al. (1974) não detectaram histamina em queijo Mussarela ( não detectado < 50 mg/Kg). Ainda não existem, padrões ou diretrizes para aminos em queijos e produtos lácteos, no entanto um limite de 10 mg/100 g de histamina e tiramina e 3 mg/100 g de feniletilamina em alimentos é sugerido por HALÁSZ et al. (1994).

Em relação a tiramina, os teores obtidos para as marcas D e F, proveniente de leite bovino e bubalino, variaram de 1,2 a 8,2 mg/Kg e < 0,5 a 1,3 mg/Kg, respectivamente. Estes valores são inferiores aos obtidos por VALE & GLORIA (1998), que variaram de  $\leq 0,7$  a 15,6 mg/Kg e superiores aos obtidos por MORET et al. (1992) que variaram de 2,0 a 4,0 mg/Kg. VOIGT et al. (1974) encontraram a tiramina no teor de 160 mg/Kg, superior aos citados na literatura e obtidos neste trabalho.

As aminos putrescina e cadaverina foram encontradas apenas nas marcas proveniente de leite bovino, com teores variando de < 0,5 a 1,3 e < 0,5 a 3,5 mg/Kg, respectivamente. Estas aminos em teores elevados são indesejáveis visto que são encontradas em produtos em decomposição e putrefação, podendo causar sabor pútrido (GLORIA, 2005). Nas Mussarelas analisadas por VALE & GLORIA (1998), os valores obtidos para putrescina e cadaverina variam de  $\leq 0,7$  a 13,7 e de  $\leq 0,7$  a 23,0 mg/Kg, respectivamente.

**Tabela III.2** – Teores de aminos bioativas em queijos Mussarela adquiridos no mercado de Belo Horizonte, MG no período de outubro de 2009 a agosto de 2010

Marca		Teores de aminos bioativas (mg/Kg)									
		PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM
A	Faixa	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Mediana	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B	Faixa	nd – 1,29	0,55 – 3,52	nd	nd	nd	nd – 1,42	nd – 1,11	nd	64,4 – 84,0	nd – 5,88
	Mediana	0,54	0,88	nd	nd	nd	0,00	0,00	nd	68,37	0,00
C	Faixa	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd – 0,79
	Mediana	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,00
D	Faixa	nd – 0,78	0,52 – 0,81	nd	1,17 – 8,16	0,64 – 7,68	nd – 2,40	nd – 0,57	nd	28,7 – 70,7	nd
	Mediana	0,00	0,52	nd	4,86	6,47	1,98	0,00	nd	56,6	nd
E	Faixa	nd	nd	nd	nd	nd – 0,86	nd	nd	nd	nd	nd
	Mediana	nd	nd	nd	nd	0,00	nd	nd	nd	nd	nd
F	Faixa	nd	nd	20,3 – 24,1	nd	nd	nd – 0,55	nd – 0,55	nd	38,5 – 39,0	nd
	Mediana	nd	nd	22,2	nd	nd	0,27	0,27	nd	38,7	nd
G	Faixa	nd	nd	nd	nd	2,79 – 3,13	nd	nd – 1,14	nd	4,33 – 5,50	nd
	Mediana	nd	nd	nd	nd	3,00	nd	0,00	nd	5,35	nd
H	Faixa	nd	nd – 0,56	nd	nd	nd	nd – 0,54	nd	nd	nd	nd
	Mediana	nd	0,55	nd	nd	nd	0,00	nd	nd	nd	nd
I	Faixa	nd	nd	nd	nd – 1,32	nd	nd	nd	nd	1,22 – 5,78	nd
	Mediana	nd	nd	nd	0,74	nd	nd	nd	nd	2,48	nd
J	Faixa	nd	nd	nd – 3,00	nd	nd	1,07 – 4,21	nd	nd – 3,12	8,04 – 13,9	nd
	Mediana	nd	nd	0,00	nd	nd	1,13	nd	0,00	9,16	nd

PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, TIM – tiramina, SRT – serotonina, AGM – agmatina, EPD – espermidina, FEM – feniletilamina, EPM – espermina, TRM – triptamina. nd: não detectado (< 0,5 mg/Kg).

A espermina foi encontrada em seis marcas analisadas, sendo quatro proveniente de leite bovino (4,3 a 84,0 mg/Kg) e duas de leite bubalino (1,2 a 13,9 mg/Kg). Já a espermidina foi encontrada em quatro marcas de Mussarela provenientes de leite bovino com teores médios variando de < 0,5 a 1,1 mg/Kg. VALE & GLORIA (1998) encontraram as aminos espermina e espermidina em teores variando de 0,7 a 13,1 mg/Kg e < 0,5 a 10,6 mg/kg, respectivamente. Estas aminos são desejáveis no produto visto que desempenham diferentes funções metabólicas e fisiológicas importantes no organismo. As poliaminas estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e de proteínas, na estabilização das membranas, e são essenciais no crescimento e duplicação das células (BARDÓCZ et al., 1993; JEEVANANDAM et al., 1997; MOINARD et al., 2005). Estas aminos também têm implicações na renovação e funcionalidade do trato digestório e na maturação da mucosa intestinal (BARDÓCZ, 1993; MOINARD et al., 2005).

A triptamina foi encontrada em duas amostras de queijo Mussarela proveniente de leite bovino em teores variando de < 0,5 a 5,88 mg/Kg. VOIGT et al. (1974) encontraram esta amina no teor de 100 mg/Kg.

As aminos bioativas estavam presentes em baixos teores, comparados aos valores obtidos por VALE & GLORIA (1998) que avaliou os teores destas aminos em queijos Mussarela do mercado de Belo Horizonte, MG em 1996. Estes resultados sugerem uma melhoria da qualidade dos queijos Mussarela. Já em relação aos queijos Mussarela analisados na Itália por MORET et al. (1992) as aminos estavam presentes em teores superiores, visto que estes autores encontraram as aminos em quantidades traço (< 0,5 mg/Kg), com exceção apenas da tiramina, cujos teores variaram de 2,0 a 4,0 mg/Kg.

Em relação a espermina, os teores obtidos foram superiores aos encontrados por VALE & GLORIA (1998). A presença desta amina nos queijos é desejável, visto que esta pode ter vários efeitos benéficos para a saúde. Além disso, a espermina tem grande potencial como antioxidante (TAKLE & MOERKOERE, 2008), podendo aumentar a vida de prateleira dos queijos.

### 3.3 UMIDADE E PH NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA

Os teores de umidade nas amostras proveniente de leite bovino (A a H) variaram de 44,8 a 48,1 g/100 g (Tabela III.3). Estes valores encontram-se de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira, máximo de 60 g/100 g (BRASIL, 1997). O valor médio obtido por VALE & GLORIA (1998) foi de 45,8 mg/100 g, semelhante ao encontrado neste trabalho. Porém, estudo realizado por CANDIA et al. (2007) com queijos Mussarela na Itália, encontraram valores de umidade mais elevados, oscilando de 53,0 a 64,0 g/100 g.

**Tabela III.3** – Valores de umidade e pH das amostras de queijo Mussarela proveniente de leite bovino (A, B, C, D, E, F, G e H) e leite bubalino (I e J) adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de outubro de 2009 a agosto de 2010

Marcas	Características físico-químicas		
		Umidade (g/100g)	pH
A	Faixa	46,0 – 50,0	5,71 – 5,93
	Média ± DP	48,1 ± 2,0	5,78 <sup>ab</sup> ± 0,13
B	Faixa	42,5 – 47,7	5,61 – 5,71
	Média ± DP	45,5 ± 2,7	5,64 <sup>bc</sup> ± 0,06
C	Faixa	46,0 – 48,4	5,97 – 6,05
	Média ± DP	46,9 ± 1,3	6,00 <sup>a</sup> ± 0,04
D	Faixa	45,4 – 50,0	5,61 – 5,92
	Média ± DP	47,3 ± 2,4	5,77 <sup>ab</sup> ± 0,16
E	Faixa	44,8 – 48,0	5,74 – 6,05
	Média ± DP	46,6 ± 1,6	5,89 <sup>ab</sup> ± 0,15
F	Faixa	44,2 – 45,4	5,69 – 5,72
	Média ± DP	44,8 ± 0,8	5,71 <sup>bc</sup> ± 0,02
G	Faixa	42,1 – 46,3	5,45 – 5,56
	Média ± DP	44,8 ± 2,4	5,49 <sup>bc</sup> ± 0,06
H	Faixa	46,0 – 48,8	5,85 – 5,97
	Média ± DP	47,0 ± 1,6	5,90 <sup>a</sup> ± 0,06
I	Faixa	40,7 – 46,9	5,80 – 5,89
	Média ± DP	44,1 ± 3,2	5,83 <sup>ab</sup> ± 0,05
J	Faixa	43,0 – 46,9	5,61 – 5,66
	Média ± DP	44,7 ± 2,0	5,64 <sup>bc</sup> ± 0,03

DP – desvio padrão. Médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (Teste Tukey;  $p > 0,05$ ).

Para amostras provenientes de leite bubalino (I e J) os teores de umidade foram de 44,1 e 44,7 g/100 g, respectivamente. Os valores foram próximos aos obtidos para as amostras provenientes de leite bovino e também se encontram dentro do estabelecido pela legislação (BRASIL, 1997).

Em relação aos teores de umidade, não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as marcas de queijo Mussarela pesquisadas (Tabela III.3).

MARCHIORI (2006) comparou o teor de umidade de queijo Mussarela proveniente de leite bubalino e bovino e os resultados obtidos foram de 52,0 e 57,60 mg/100 g, respectivamente. VERRUMA-BERNARDI et al. (2000) encontraram teores médios de umidade semelhantes aos obtidos neste trabalho, 45,7 e 47,7 mg/100 g em Mussarelas produzidas com leite bubalino a partir do método tradicional e acidificação direta, respectivamente.

Os valores de pH das amostras de queijo Mussarela proveniente de leite bovino (A a H) variaram de 5,49 a 6,00 (Tabela III.3). Estes valores encontram-se acima dos valores sugeridos por FURTADO & LOURENÇO-NETO (1994), de 5,1 a 5,3. A legislação brasileira não estabelece um valor de pH como requisito de qualidade para queijo Mussarela (BRASIL, 1997).

VALE & GLORIA (1998) encontraram um pH médio de 5,81 nas amostras de queijo Mussarela. Este valor está próximo aos obtidos por COSTABEL et al. (2007) que variaram de 5,38 a 5,56. CANDIA et al. (2007) também analisaram amostras de Mussarela e os resultados encontrados foram próximos aos obtidos neste trabalho, variando de 5,41 a 6,29. Porém, OLIVIERI (2004) encontrou um valor de pH de 5,0 em amostras comerciais da cidade de Piracicaba, SP, inferior aos obtidos neste trabalho e aos valores reportados na literatura. Foi encontrada diferença significativa nos valores de pH ( $p < 0,05$ ) entre as marcas de queijo Mussarela pesquisadas. As marcas A, C, D, E, H e I apresentaram valores superiores de pH.

### **3.4 CORRELAÇÃO DOS TEORES DE UMIDADE E PH COM AS AMINAS BIOATIVAS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MUSSARELA**

As correlações entre os teores de aminos e os teores de umidade e pH, utilizando a correlação de Spearman a 5% de probabilidade, estão apresentadas na Tabela III.4. A umidade não se correlacionou com nenhuma das aminos bioativas

analisadas. Entretanto, o pH teve correlação negativa com o teor total de aminos e com a serotonina, a espermidina e a espermina.

Para investigar se as aminos bioativas são influenciadas pelos mesmos fatores foi avaliada a correlação entre as mesmas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela III.5. Foi observada correlação positiva entre as aminos putrescina e cadaverina. Estas aminos são encontradas geralmente em produtos que não foram obtidos em condições higiênico-sanitárias adequadas. Inclusive, os nomes destas derivam do fato das mesmas terem sido encontradas em produtos em decomposição ou putrefação (GLORIA, 2005). A espermina foi a amina que se correlacionou com um maior número de aminos (putrescina, cadaverina, tiramina, agmatina e espermidina). A correlação entre as poliaminas espermina e espermidina poder ser devido ao fato da espermina ser formada pela adição de um grupo aminopropil derivado da metionina à espermidina (GLORIA, 2005). Observou-se também correlação entre a feniletilamina e a histamina; e a tiramina e a serotonina. Estas correlações se devem, possivelmente, ao fato destas aminos serem formadas a partir de aminoácidos livres presentes nas amostras, as quais são convertidos em aminos pela ação das enzimas sintetizadas e liberadas pelas bactérias.

**Tabela III.4** – Correlação entre os teores de umidade e pH com os teores de aminos bioativas

Parâmetros	Coeficiente de correlação entre umidade e pH com as aminos bioativas										
	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM	TOTAL
<b>Umidade</b>	0,015	0,124	-0,124	-0,114	0,092	-0,143	-0,182	0,158	-0,276	-0,233	-0,270
	0,469	0,255	0,256	0,274	0,313	0,224	0,167	0,201	0,072	0,109	0,077
<b>pH</b>	-0,322	-0,139	-0,186	0,098	<b><u>-0,339</u></b>	-0,141	<b><u>-0,337</u></b>	-0,181	<b><u>-0,609</u></b>	0,014	<b><u>-0,592</u></b>
	0,044	0,231	0,162	0,303	0,036	0,228	0,037	0,170	0,001	0,442	0,001

Coeficiente de correlação em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade. PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, TIM – tiramina, SRT – serotonina, AGM – agmatina, EPD – espermidina, EPM – espermina, FEM – feniletilamina, TRM – triptamina. Os valores abaixo do coeficiente de correlação são as probabilidades obtidas.

**Tabela III.5** – Correlação entre os teores de aminas bioativas para as marcas de queijo Mussarela analisadas

Parâmetros	Aminas bioativas										
	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM	TOTAL
<b>PUT</b>		<b><u>0,670</u></b> 0,001	-0,115 0,272	0,123 0,257	0,126 0,253	-0,206 0,138	0,226 0,116	-0,064 0,367	<b><u>0,530</u></b> 0,003	0,401 0,017	<b><u>0,531</u></b> 0,003
<b>CAD</b>			-0,206 0,138	0,279 0,070	0,161 0,197	0,231 0,111	0,215 0,128	-0,115 0,272	<b><u>0,498</u></b> 0,004	0,219 0,123	<b><u>0,559</u></b> 0,002
<b>HM</b>				-0,154 0,208	-0,189 0,159	0,224 0,119	0,178 0,173	<b><u>0,513</u></b> 0,003	0,311 0,050	-0,092 0,313	0,304 0,053
<b>TIM</b>					<b><u>0,432</u></b> 0,011	0,226 0,116	0,090 0,317	-0,086 0,325	<b><u>0,373</u></b> 0,024	-0,123 0,257	<b><u>0,343</u></b> 0,035
<b>SER</b>						0,045 0,407	0,208 0,136	-0,105 0,289	0,279 0,070	-0,152 0,211	<b><u>0,350</u></b> 0,032
<b>AGM</b>							0,006 0,487	0,287 0,065	<b><u>0,456</u></b> 0,008	-0,165 0,191	<b><u>0,466</u></b> 0,007
<b>EPD</b>								-0,075 0,345	<b><u>0,313</u></b> 0,049	<b><u>0,312</u></b> 0,049	<b><u>0,354</u></b> 0,030
<b>FEM</b>									0,117 0,268	-0,051 0,393	0,114 0,273
<b>EPM</b>										0,054 0,389	<b><u>0,968</u></b> 0,000
<b>TRM</b>										- -	0,125 0,255

Coefficiente de correlação em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade. PUT – putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, TIM – tiramina, SRT – serotonina, AGM – agmatina, EPD – espermidina, EPM – espermina, FEM – feniletilamina, TRM – triptamina. Os valores abaixo do coeficiente de correlação são as probabilidades obtidas.

## 4 CONCLUSÕES

Foram encontradas as dez aminas bioativas pesquisadas nas amostras de queijo Mussarela avaliadas. A espermina, agmatina e cadaverina foram as que apresentaram os maiores percentuais de ocorrência. Os teores totais de aminas variaram de 0,8 a 77,3 mg/Kg.

Todas as aminas biogênicas apresentaram teores inferiores aos limites sugeridos pela literatura como capazes de causar efeitos adversos a saúde, podendo ser consideradas de boa qualidade em relação aos teores destas aminas.

Para todas as amostras analisadas os teores de umidade estavam dentro do valor máximo estabelecido pela legislação e não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as marcas pesquisadas. Os valores de pH foram próximos aos encontrados na literatura, sendo que as marcas A, C, D, E, H e I apresentaram os maiores valores de pH. Apenas o pH teve correlação negativa com as aminas serotonina, espermina e espermidina. A espermina correlacionou com as aminas putrescina, cadaverina, tiramina, agmatina e espermidina. Observou-se também correlação entre a feniletilamina e a histamina; e a tiramina e a serotonina.

# **CAPÍTULO IV - INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NA QUALIDADE E NO PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM QUEIJO MUSSARELA**

## **1 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da contagem de células somáticas na qualidade e no perfil e teores de aminos bioativas em queijo Mussarela. Os objetivos específicos foram: i) agrupar amostras de leite cru em função da contagem de células somáticas determinados pelo *Wisconsin mastitis test* e analisador eletrônico e caracterizá-las quanto aos parâmetros: composição centesimal, pH, acidez, contagem bacteriana total, micro-organismos proteolíticos e as aminos bioativas; ii) elaborar queijos Mussarela com os diferentes grupos de leite cru e coletar amostras para determinar a influência da contagem de células somáticas e das condições do processamento no pH, acidez e micro-organismos proteolíticos dos leites pasteurizados e na composição centesimal, pH, acidez e perfil e teores de aminos dos soros gerados, e dos queijos produzidos, e iii) determinar a influência da contagem de células somáticas e das condições de processamento nas características físico-químicas, atividade proteolítica e no perfil e teores de aminos dos queijos Mussarela durante o armazenamento refrigerado (4 °C) por 60 dias.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

#### **2.1.1 Amostras**

Foram coletadas amostras de leite cru de propriedades particulares e do estábulo da UFV localizados na região de Viçosa, MG. As amostras foram coletadas em latões de 50 L previamente higienizados e encaminhadas a sala de elaboração de queijos da Usina Piloto do Laticínios da UFV. As alíquotas das amostras utilizadas na

determinação da composição centesimal, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total foram mantidas à 4 °C e encaminhadas em caixa de isopor contendo gelo em gel ao Laboratório da Qualidade do Leite (LabUFMG) da Escola de Veterinária da UFMG em um máximo de cinco dias.

As amostras de leite cru foram coletadas de acordo com a seguinte faixa de células somáticas: < 400.000 CS/mL (baixa), 401.000 a 750.000 CS/mL (média) e > 751.000 CS/mL (alta), totalizando um volume de 50 L para cada produção de queijo Mussarela.

### 2.1.2 Reagentes, solventes e soluções

Os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na análise por CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Os solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Toda a água utilizada era ultrapura, obtida do Sistema Milli-Q Plus; esta era posteriormente filtrada em membrana HAWP (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões de aminas e as soluções tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio e derivante foram preparados conforme descrito no Capítulo III.

O reagente do *Wisconsin mastitis test* foi diluído em água destilada (1:1) e utilizado com o prazo máximo de cinco dias conforme recomendado pelo manual do fabricante (Hexis Científica<sup>®</sup>, Jundiaí, SP).

### 2.1.3 Coadjuvantes tecnológicos

Foram utilizados para elaboração dos queijos, solução de cloreto de cálcio (40% p/v), cultura lática termofílica TCC-20 (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus*) e coalho em pó de origem bovina (HaLa 1175), ambos da Christian Hansen<sup>®</sup> (Hørsholm, Dinamarca).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Elaboração dos queijos Mussarela

As amostras de leite cru com diferentes níveis de CCS foram utilizadas na elaboração dos queijos Mussarela, na seção de queijos da Usina Piloto do Laticínios

FUNARBE da UFV. Os queijos foram processados separadamente em tanques de acordo com FURTADO & LOURENÇO-NETO (1994), conforme representado na Figura IV.1.

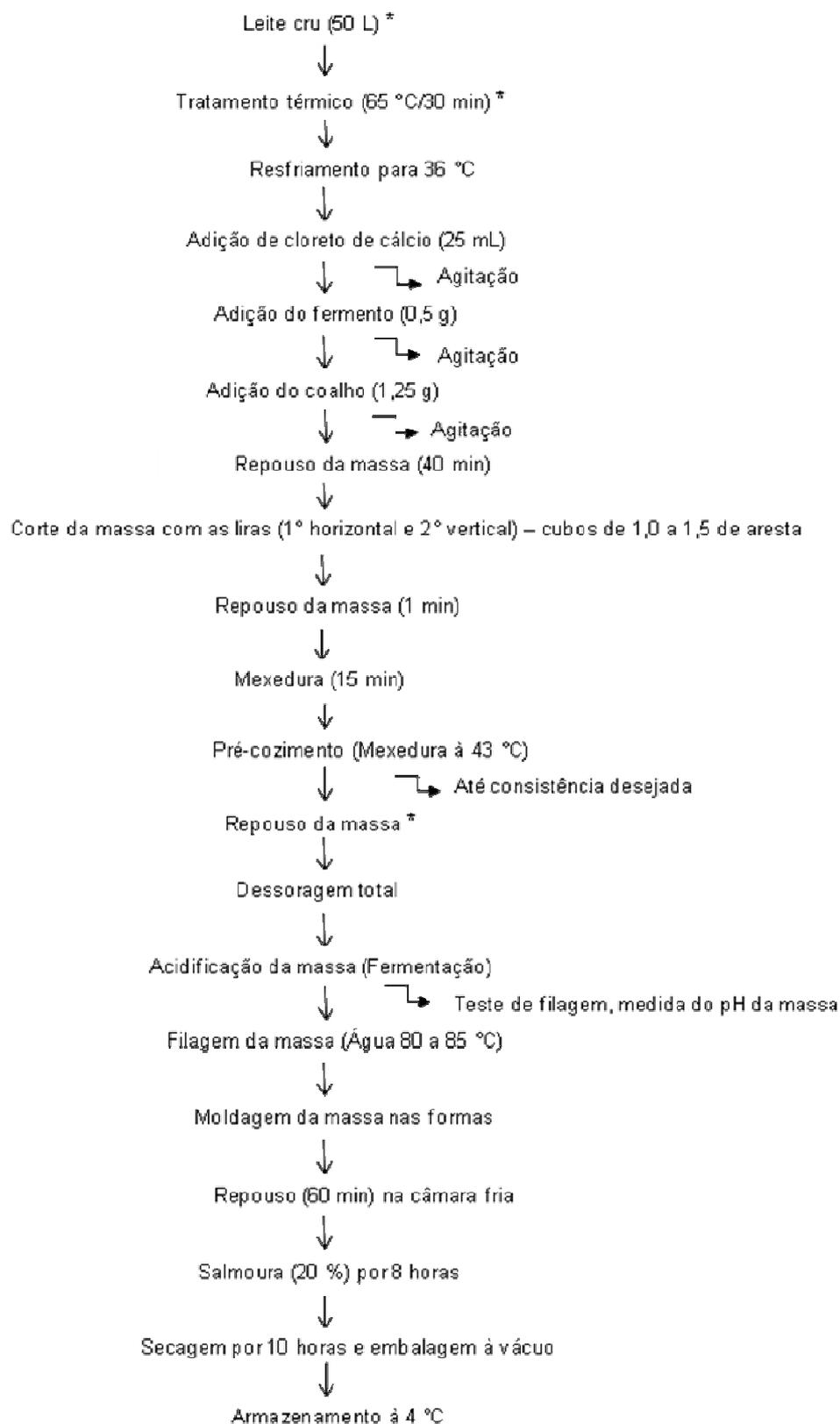
O conteúdo de leite de cada mistura (50 L) utilizado na elaboração dos queijos, foi vertido, após filtragem, em tanques com capacidade de 200 L (Figuras IV.2A e IV.2B). Foram retiradas amostras de leite cru para as análises físico-químicas, microbiológicas, CCS e amins bioativas, tendo sido utilizados frascos estéreis para as análises microbiológicas. Nos tanques de fabricação, os leites sofreram tratamento térmico à 65 °C por 30 minutos, seguido de resfriamento imediato, para cerca de 36 °C (Figura IV.2C). Neste momento foram coletadas amostras do leite pasteurizado para realização das análises de acidez, pH e micro-organismos proteolíticos.

Após tratamento térmico foram adicionados aos leites pasteurizados solução de cloreto de cálcio (40% p/v), fermento láctico e, por último, o coalho. A massa foi mantida em repouso por 40 minutos (Figura IV.4D). Após a coagulação, foi feito o corte da massa com as liras horizontais e verticais de forma a obter grãos de 1 a 1,5 cm de aresta, e, em seguida, foi feito repouso por 1 minuto (Figura IV.2E). Foi realizada mexedura lenta por 15 minutos à 36 °C (Figura IV.2F), e, consecutivamente, a temperatura foi elevada para 43 °C e prosseguindo-se a mexedura até a consistência desejada da massa ( $\pm$  50 minutos). Em seguida, foi feita a amostragem do soro para análises de pH, acidez titulável, amins bioativas e composição centesimal e posterior dessoragem total (Figura IV.2G). Após o dessoramento, a massa permaneceu fermentando no tanque até o ponto de filagem ( $\pm$  5 horas) (Figura IV.2H).

Antes da filagem foi feita a determinação do pH da massa para confirmar se estava na faixa ideal (5,1 a 5,3). O processo de filagem foi realizado com água à 80 - 85 °C, em tanque de aço inox (Figura IV.2I). A massa filada foi moldada manualmente e transferida para formas de 1 Kg em formato de paralelepípedo (Figura IV.2J). Após enformagem os queijos permaneceram na câmara fria por uma hora.

Após o período de uma hora, os queijos foram transferidos para tanque contendo salmoura a 20% (pH 5,29, 18 °C), e permaneceram submersos por oito horas (Figura VI.2K). Posteriormente, os queijos foram mantidos em prateleiras de plástico em câmara fria ( $11 \pm 1$  °C) por dez horas (Figura VI.2L). No final, as amostras foram cortadas em pedaços similares e embaladas em polietileno à vácuo e mantidas em estufa BOD por 60 dias à 4 °C (Figuras IV.2M e IV.2N).

O procedimento de elaboração dos queijos foi repetido três vezes para cada tratamento (leite cru com CCS baixa, média e alta), totalizando um volume de leite de 450 litros.



**Figura VI.1** – Fluxograma do processo de elaboração do queijo Mussarela.

\* Coleta de amostras.



**Figura IV.2** – Etapas do processo de elaboração do queijo Mussarela.



**Figura IV.2** (continuação) – Etapas do processo de elaboração do queijo Mussarela.

### **2.2.2 Determinação da contagem de células somáticas pelo *Wisconsin mastitis test***

Para determinação da CCS das amostras de leite cru, foram retiradas alíquotas de 2 mL, em duplicata, à temperatura ambiente. As amostras foram colocadas em tubos de plástico e misturadas ao reagente diluído (2 mL). O teste rápido foi realizado conforme descrito no manual do fabricante (Hexis Científica<sup>®</sup>, Jundiaí, SP) no local da coleta do leite cru.

### **2.2.3 Determinação da contagem de células somáticas e composição centesimal**

As análises de composição centesimal e CCS das amostras de leite cru, foram realizadas no analisador eletrônico CombiScope FTIR-400<sup>®</sup> (Delta Instrument; Drachten, Holanda). Este equipamento é composto por uma unidade do LactoScope e do SomaScope, para determinação da composição centesimal e contagem de células somáticas, respectivamente. As amostras contendo o conservante bronopol foram aquecidas à 40 °C por 20 minutos, agitadas e colocadas no equipamento para serem analisadas. Os resultados foram automaticamente impressos ao final da análise em g/100 g da amostra para composição centesimal e CS/mL para CCS.

Para calibração do equipamento foram utilizados padrões fornecidos pelo *Dairy Quality Control Inc.* (DQCI Services) (Minneapolis, Estados Unidos). O analisador eletrônico foi calibrado segundo as instruções contidas no manual de operações do equipamento (DELTA, 2009).

### **2.2.4 Determinação da contagem bacteriana total**

A análise de contagem bacteriana total das amostras de leite cru contendo o conservante azidiol foram realizadas por citometria de fluxo no equipamento eletrônico BactoCount IBC 150<sup>®</sup> (Bentley Instruments Incorporated<sup>®</sup>, Chaska, Minnesota, EUA). A contagem individual de bactérias foi transformada em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL), após transformação estatística automática baseada em uma curva de calibração previamente elaborada (BENTLEY Instruments<sup>®</sup>, 2002).

## 2.2.5 Determinação dos parâmetros físico-químicas e microbiológicos

Análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nas amostras de leite cru, leite pasteurizado, soro e queijo Mussarela utilizando-se os métodos de referência (Tabelas IV.1 e IV.2). As análises de acidez, pH, umidade, proteína e nitrogênio solúvel em pH 4,6 e TCA 12% nos queijos foram realizadas com 1, 15, 30, 45 e 60 dias de estocagem à 4 °C. A determinação da gordura foi feita apenas com 1 dia de estocagem.

**Tabela IV.1** – Tipos de análises físico-químicas e microbiológicas feitas nas amostras de leite cru, leite pasteurizado e soro e as respectivas referências

<b>Análises laboratoriais</b>	<b>Referências</b>
Acidez titulável	BRASIL (2006) <sup>1,2,3</sup>
pH	BRASIL (2006) <sup>1,2,3</sup>
Gordura	AOAC (1995) <sup>1,3</sup>
Nitrogênio total	IDF – FIL (1993) <sup>1,3</sup>
Umidade	AOAC (1995) <sup>1,3</sup>
Micro-organismos proteolíticos	APHA (1994) <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> – Leite cru; <sup>2</sup> – Leite pasteurizado; <sup>3</sup> – Soro.

Para realização das análises físico-químicas os queijos foram cortados em pedaços, realizou-se o procedimento de quarteamento e, em seguida foram triturados.

**Tabela IV.2** – Tipos de análises físico-químicas e microbiológicas feitas nas amostras de queijo Mussarela e as respectivas referências

<b>Análises laboratoriais</b>	<b>Referências</b>
Acidez titulável*	AOAC (1995)
pH*	AOAC (1995)
Gordura***	AOAC (1995)
Umidade*	AOAC (1995)
Nitrogênio total*	IDF – FIL (1993)
Nitrogênio Solúvel em pH 4,6 e TCA 12%*	IDF – FIL (1993)
Micro-organismos proteolíticos **	APHA (1994)

\* Análises realizadas nos queijos com 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento; \*\* 15 e 45 dias de armazenamento; \*\*\* 1 dia de armazenamento. TCA – ácido tricloroacético.

Os índices de extensão e profundidade da proteólise foram obtidos conforme as equações (1) e (2) abaixo:

$$\text{Índice da extensão da proteólise} = \frac{\% \text{ Nitrogênio solúvel em pH } 4,6 \times 100}{\% \text{ Nitrogênio total}} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{Índice da profundidade da proteólise} = \frac{\% \text{ Nitrogênio solúvel em TCA } 12\% \times 100}{\% \text{ Nitrogênio total}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde: TCA – ácido tricloroacético.

### 2.2.6 Determinação dos micro-organismos proteolíticos

As análises de micro-organismos proteolíticos das amostras de leite cru, pasteurizado e queijo Mussarela foram feitas no Laboratório de Leite e Derivados da UFV. Os métodos utilizados para os leites cru e pasteurizado estão descritos na Tabela IV.1 e para o queijo Mussarela na Tabela IV.2.

Para a determinação dos micro-organismos proteolíticos, as amostras de leite cru foram diluídas a  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  e para leite pasteurizado a  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Para análise dos queijos, foi pesado assepticamente 25 g da amostra em saco plástico estéril, adicionou-se 225 mL de solução de citrato 2% e, em seguida, foi realizada a homogeneização até dispersão e solubilização da amostra. Posteriormente, foram feitas as seguintes diluições:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ .

As diluições sucessivas para todas as amostras foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,1% previamente esterelizados. Foram utilizadas placas descartáveis e cerca de 15 mL de ágar leite (ágar-padrão) acrescido de leite em pó reconstituído a 10%, preparado recentemente, fundido e resfriado. Após transferências das alíquotas para as placas foi feito o espalhamento do inócuo com auxílio da alça de Drigalski (técnica da semeadura em superfície). As placas foram incubadas em BOD à 32 °C por 72 horas, em aerobiose. As contagens das colônias rodeadas por zonas claras foram realizadas segundo técnica padrão, em placas com 25 a 250 colônias. Os resultados foram expressos em UFC/mL para as amostras de leite e UFC/g para os queijos. As análises foram realizadas em duplicata. Os materiais foram esterilizados em autoclave Phoenix vertical (Araraquara, São Paulo, SP).

### 2.2.7 Determinação das aminas bioativas

As análises de aminas bioativas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos (LBqA) da Faculdade de Farmácia da UFMG. As amostras de leite cru, soro e queijo Mussarela foram congeladas e mantidas em temperaturas inferiores a -

18 °C até o momento da análise. Para extração das aminas bioativas das amostras de leite cru e soro foi utilizado o método otimizado conforme apresentado no Capítulo I e para os queijos Mussarela o método foi baseado em CUSTÓDIO et al. (2007) com modificações, conforme descrito no Capítulo III. Após a etapa de extração, os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo e em membranas HAWP em éster de celulose, com 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *orto-ftalaldeído*, conforme descrito no Capítulo III.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental para leite cru, leite pasteurizado e soro, foi o de blocos ao acaso, tendo como efeito do tratamento, a contagem de células somáticas e o efeito do bloco, os processamento de três queijos Mussarela. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

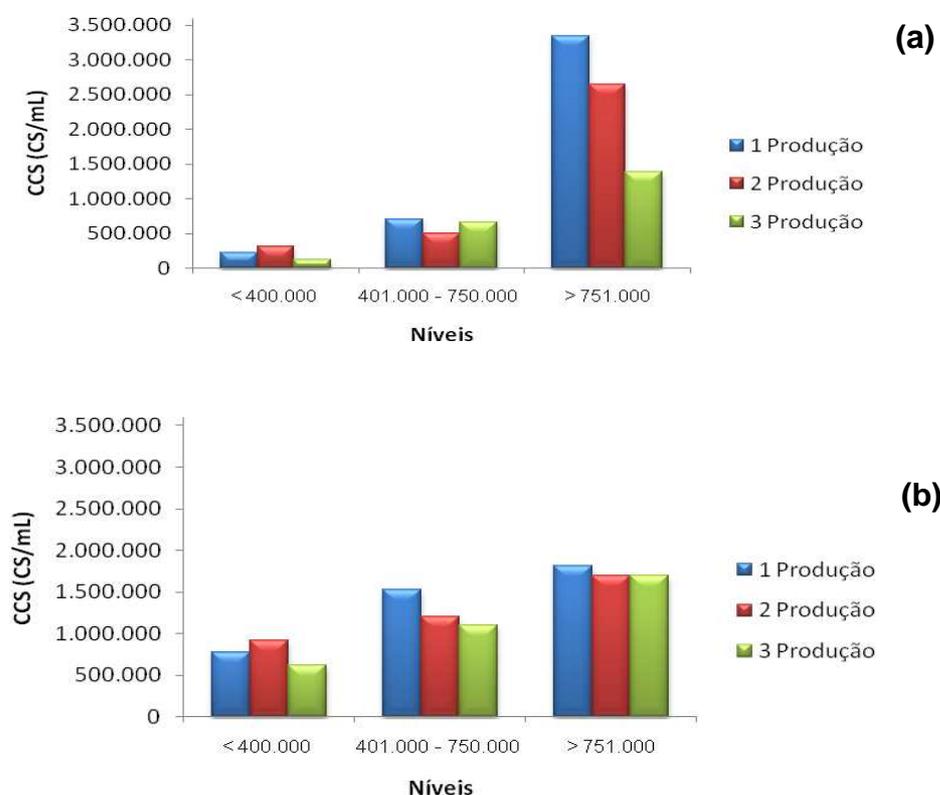
Para os queijos foi utilizado um delineamento experimental em parcelas subdivididas em blocos, considerando-se a contagem de células somáticas como efeito principal, os dias de análise, como subparcelas e os processamentos como blocos com três produções para o queijo Mussarela. Para a análise estatística das características avaliadas, que envolvem medidas repetidas no tempo, foi realizado um estudo de regressão e as diferenças foram testadas pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Para as aminas bioativas, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Friedmam, para avaliar as diferenças entre os tratamentos e os dias de análise, respectivamente, ao nível de 5% de significância. Os programas estatísticos utilizados foram o SISVAR e o SAEG, versão 5.0 e 9.0, respectivamente.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, PH, ACIDEZ, CONTAGEM BACTERIANA TOTAL E AMINAS BIOATIVAS DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU COM DIFERENTES CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS

As contagens de células somáticas obtidas nas amostras de leite cru utilizando o equipamento eletrônico e o *Wisconsin mastitis test* estão descritas nas Figuras IV.3a e IV.3b, respectivamente. As amostras analisadas pelo equipamento eletrônico com faixas de CCS baixa, média e alta apresentaram valores variando de 120.000 a 313.000 CS/mL, de 502.000 a 706.000 CS/mL e de 1.386.000 a 3.342.000 CS/mL, respectivamente. Entretanto, pelo *Wisconsin mastitis test*, as amostras apresentaram valores superiores aos obtidos pelo equipamento eletrônico para amostras com CCS baixa e média e inferiores aos encontrados para a faixa de CCS alta.



**Figura IV.3** – Contagens de células somáticas das amostras de leite cru utilizadas para elaboração dos queijos Mussarela de acordo com o equipamento eletrônico (a) e o *Wisconsin mastitis test* (b).

Os resultados obtidos na determinação da composição centesimal utilizando os métodos de referência e eletrônico, os parâmetros pH e acidez e a contagem bacteriana total para as amostras de leite cru com diferentes contagens de células somáticas estão apresentados na Tabela IV.3.

Pode-se observar que os resultados encontrados para proteína e gordura utilizando os métodos eletrônico e de referência foram próximos e não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras com diferentes níveis de CCS. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no Capítulo II. O método eletrônico por infravermelho, utilizado neste trabalho e pela Rede de Laboratórios da Qualidade do leite para determinação dos componentes do leite, é prático e econômico pela possibilidade de analisar um grande número de amostras, enquanto os métodos de referência são mais demorados (SILVEIRA et al., 2004). Os resultados obtidos sugerem que o método eletrônico foi adequado para avaliar a qualidade do leite em relação aos seus componentes, visto que os resultados foram semelhantes aos obtidos pelo método de referência.

**Tabela IV.3** – Composição centesimal, pH, acidez e contagem bacteriana total (CBT) do leite cru com diferentes contagens de células somáticas, utilizando os métodos eletrônico e de referência

Características	Valores médios (média $\pm$ DP) por faixa de contagem de células somáticas (CS/mL)		
	< 400.000	401.000 a 750.000	> 751.000
Gordura (g/100 g)*	3,50 $\pm$ 0,90	3,50 $\pm$ 0,50	3,60 $\pm$ 0,60
Gordura (g/100 g)**	3,44 $\pm$ 0,84	3,29 $\pm$ 0,27	3,67 $\pm$ 0,55
Proteína (g/100 g)*	3,20 $\pm$ 0,30	3,20 $\pm$ 0,30	3,20 $\pm$ 0,10
Proteína (g/100 g)**	3,29 $\pm$ 0,24	3,04 $\pm$ 0,13	3,26 $\pm$ 0,22
EST (g/100 g)*	11,96 $\pm$ 1,30	11,90 $\pm$ 0,36	12,33 $\pm$ 0,59
SNG (g/100 g) **	8,73 $\pm$ 0,25	8,34 $\pm$ 0,19	8,36 $\pm$ 0,07
Lactose (g/100 g)**	4,56 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14	4,37 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05	4,12 <sup>b</sup> $\pm$ 0,09
Acidez*	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01
pH*	6,89 <sup>b</sup> $\pm$ 0,08b	6,86 <sup>b</sup> $\pm$ 0,18b	7,22 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03
CBT (log UFC/mL) **	5,26 $\pm$ 0,73	5,41 $\pm$ 0,76	6,19 $\pm$ 0,24

Resultados relativos a média de três repetições. Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey;  $p > 0,05$ ). DP – desvio – padrão; EST – extrato seco total; SNG – sólidos não gordurosos, Acidez: g/100 mL de ácido láctico. \* método de referência; \*\* método eletrônico.

Em relação a concentração de lactose, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas amostras com alta CCS comparada as de baixa CCS. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no Capítulo II e aos encontrados por KLEI et al. (1998), que

avaliaram os teores de lactose em leites desnatado com CCS baixa (83.000 CS/mL) e alta (1.187.000 CS/mL) utilizados na elaboração de queijos Cottage.

Os valores obtidos para acidez nas amostras com diferentes níveis de CCS não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), porém o pH para o nível de CCS alta foi superior aos encontrados para CCS baixa e média. Vários autores mostraram que os leites com CCS alta apresentaram pH mais alto, assim como diminuição da acidez (KLEI et al., 1998; MATIOLI et al., 2000; MAZAL et al., 2007; VIANNA et al., 2008).

Os resultados obtidos para contagem bacteriana total (CBT) das amostras de leite cru foram transformados em escala logarítmica em base 10 para realização da análise estatística (Tabela IV.3). Não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para contagem bacteriana total entre os níveis de CCS. Este resultado está de acordo com o reportado no Capítulo II. Porém, as amostras com CCS alta apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela IN 51 (BRASIL 2002). A análise da CBT baseada em citometria de fluxo utilizada neste trabalho é usualmente aplicada para determinação da contagem bacteriana total, porém esta técnica não diferencia as espécies bacterianas, conseqüentemente, não fornece informações das causas da elevação dessa contagem no leite (HOLM et al., 2009). Além disso, não há distinção entre as células vivas e as células mortas (FONSECA, 2005).

Os resultados das contagens de micro-organismos proteolíticos (log UFC/mL) para as amostras de leite cru estão apresentados na Tabela IV.4. Duas amostras apresentaram contagens de colônias entre 25 e 250, sendo uma com CCS baixa (6,95) e a outra com CCS alta (7,45). Nas demais amostras analisadas foram obtidos apenas valores estimados de log UFC/mL, visto que as contagens foram inferiores ou superiores ao intervalo de precisão e repetibilidade estabelecido (BRASIL, 2003). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade para leite cru e leite pasteurizado (BRASIL, 2002) não estabelece limites para contagens de micro-organismos proteolíticos, porém houve a necessidade desta determinação neste trabalho visto que estes micro-organismos podem vir a contribuir na formação das aminas bioativas, pela liberação de enzimas termorresistentes com atividade proteolítica.

**Tabela IV.4** – Micro-organismos proteolíticos em amostras de leites cru com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CCS)

Amostras	CCS (CS/mL) / Micro-organismos proteolíticos (log UFC/mL)		
	< 400.000	401.000 a 750.000	> 751.000
	5,60*	8,74*	6,11*
Leite cru	6,95	5,30*	5,00*
	7,30*	5,30*	7,45

\* estimado.

Na análise por CLAE para determinação das aminos nas amostras de leite cru foram encontradas as aminos putrescina, cadaverina, espermidina e espermina nos teores variando de < 0,3 a 1,2 mg/L (Tabela IV.5). Estes resultados são semelhante aos citados na literatura, os quais relataram baixos teores de aminos em leite cru (OKAMOTO et al., 1997; ALMEIDA et al., 2003; GLORIA et al., 2010).

**Tabela IV.5** – Perfil e teores de aminos bioativas nas amostras de leite cru com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CCS)

Leite cru / CCS (CS/mL)	Aminos bioativas (mg/L)			
	PUT	CAD	EPD	EPM
< 400.000	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd
401.000 a 750.000	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd
> 751.000	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	1,2

PUT – putrescina, EPD – espermidina (nd < 0,3 mg/L), CAD – cadaverina (nd < 0,5 mg/L), EPM – espermina (não detectado - nd < 1,2 mg/L).

### 3.2 ACIDEZ, PH E MICRO-ORGANISMOS PROTEOLÍTICOS DAS AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO

Os resultados do pH e acidez das amostras de leite pasteurizado obtidas durante a elaboração dos queijos Mussarela estão apresentados na Tabela IV.6. Os valores de pH e acidez para os leites pasteurizados, confirmam os resultados das amostras de leite cru, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para os valores de pH.

**Tabela IV.6** – Valores de acidez e pH do leite pasteurizado utilizado na elaboração dos queijos, de acordo com as faixas de contagem de células somáticas

Características	Valores médios (média ± DP) por faixa de contagem de células somáticas (CS/mL)		
	< 400.000	401.000 a 750.000	> 751.000
Acidez	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
pH	6,86 <sup>b</sup> ± 0,07	6,86 <sup>b</sup> ± 0,19	7,20 <sup>a</sup> ± 0,03

Resultados relativos a média de três repetições. Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey;  $p > 0,05$ ). DP – desvio-padrão. Acidez - g/100 mL de ácido láctico.

Os resultados das contagens de micro-organismos proteolíticos (log UFC/mL) para as amostras de leite pasteurizado estão apresentados na Tabela IV.7. Apenas uma amostra com CCS média apresentou contagens no intervalo de precisão e repetibilidade estabelecido. Para as demais amostras os valores foram estimados conforme descrito por BRASIL (2003). Observa-se uma redução nas contagens de micro-organismos proteolíticos (média de 3 ciclos logarítmicos) quando comparados aos resultados obtidos para as amostras de leite cru. Estes resultados mostram que o tratamento térmico reduziu a contagem de micro-organismos proteolíticos dos leites pasteurizados utilizados na elaboração dos queijos Mussarela.

**Tabela IV.7** – Micro-organismos proteolíticos em amostras de leite pasteurizado com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CS/mL)

Amostras	CCS (CS/mL) / Micro-organismos proteolíticos (log UFC/mL)		
	< 400.000	401.000 a 750.000	> 751.000
Leite	2,40*	4,60	< 2,00
pasteurizado	4,00*	2,00*	< 2,00
	2,74*	3,08*	2,90*

\* estimado.

### 3.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, PH, ACIDEZ E AMINAS BIOATIVAS DAS AMOSTRAS DE SORO

Os resultados das análises de composição centesimal, pH e acidez realizadas nas amostras de soro provenientes da elaboração de queijos Mussarela estão apresentados na Tabela IV.8. Os valores obtidos para os teores de gordura e proteína não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Em relação aos valores de pH, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras com diferentes níveis de CCS.

As perdas de gordura nas amostras de soro com CCS baixa, média e alta foram de 12,7, 12,4 e 14,2%, respectivamente. Estes valores encontram-se dentro da média nacional de 10 a 15% (O RENDIMENTO, 2010). As perdas de proteína foram de 25,1, 25,4 e 28,1% para as amostras com CCS baixa, média e alta, respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa para perdas de gordura e proteína entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por COONEY et al. (2000), ANDREATTA (2006), COELHO (2007) e MAZAL et al. (2007). A transição de gordura e proteína para o soro pode ser influenciada por vários fatores, como: a rapidez do corte da massa e o tamanho dos grão, bem como a intensidade da agitação feita imediatamente após o corte. Além destes fatores, a temperatura de pasteurização do leite, seu teor de cálcio e proteínas, acidez, pH e temperatura de adição do coalho, que afetam o processo de coagulação, também pode ter influência nas perdas de gordura e proteína. Entretanto, estas perdas podem ser minimizadas através da coagulação bem controlada do leite e de um corte cuidadoso da coalhada (O RENDIMENTO, 2010).

**Tabela IV.8** – Composição centesimal, pH e acidez dos soros de queijo Mussarela produzidos a partir de leite com diferentes contagens de células somáticas

Características	Valores médios (média ± DP) por faixa de contagem de células somáticas (CS/mL)		
	< 400.000	401.000 a 750.000	> 751.000
Gordura (g/100 g)	0,40 ± 0,10	0,40 ± 0,2	0,50 ± 0,2
Proteína (g/100 g)	0,80 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,90 ± 0,07
EST (g/100 g)	6,77 ± 0,23	6,99 ± 0,38	6,76 ± 0,75
Acidez	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01
pH	6,68 <sup>b</sup> ± 0,15	6,68 <sup>ab</sup> ± 0,27	7,18 <sup>a</sup> ± 0,14

Resultados relativos a média de três repetições. Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey;  $p > 0,05$ ). DP – desvio-padrão; EST – extrato seco total; Acidez: g/100 mL de ácido láctico.

Em relação aos teores das aminas bioativas nas amostras de soro de queijo Mussarela, os resultados foram semelhantes aos obtidos nas amostras de leite cru. Foi encontrada a espermina em duas amostras provenientes de leite com CCS média e uma com CCS baixa nos teores variando de 1,2 a 1,4 mg/L. Nas demais amostras a espermina não foi detectada (Tabela IV.9). As aminas putrescina, espermidina e cadaverina não foram detectadas, < 0,3; < 0,3 e < 0,5 mg/L, respectivamente. SIQUEIRA (2000) avaliou as aminas bioativas em amostras de soro de queijos Prato, Mussarela, Minas Frescal e Minas Padrão e a amina predominante foi a espermidina,

sendo que o soro de queijo Mussarela foi o que apresentou maiores teores e variedade das aminas pesquisadas. Foram detectadas as aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, agmatina, espermidina, serotonina, feniletilamina e triptamina.

**Tabela IV.9** – Perfil e teores de aminas bioativas nas amostras de soro de queijo Mussarela produzidos a partir de leite com diferentes contagens de células somáticas (CCS)

Soro / CCS (CS/mL)	Aminas bioativas (mg/L)			
	PUT	CAD	EPD	EPM
< 400.000	nd	nd	nd	1,2
	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd
401.000 a 750.000	nd	nd	nd	1,3
	nd	nd	nd	1,4
	nd	nd	nd	nd
> 751.000	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	nd

PUT – putrescina, EPD – espermidina (nd < 0,3 mg/L), CAD – cadaverina (nd < 0,5 mg/L), EPM – espermina (não detectado - nd < 1,2 mg/L).

### 3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, E PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS DOS QUEIJOS MUSSARELA PRODUZIDOS

Na Tabela IV.10 estão apresentados os resultados da composição centesimal, pH e acidez dos queijos Mussarela elaborados a partir de leites com diferentes CCS após um dia de elaboração. Pode-se observar que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros avaliados, ou seja, a CCS do leite cru não teve influência significativa na qualidade final dos queijos Mussarela. Estes resultados encontram-se dentro do esperado, visto que as amostras de leite cru utilizadas na elaboração dos queijos também não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação a estes parâmetros, com exceção apenas para o pH que foi superior para as amostras de leite com CCS alta. Além disso, nas amostras de soro também não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os teores de gordura, proteína e sólidos totais.

Em relação aos teores de umidade, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijo Mussarela o teor de umidade deve ser no máximo 60 g/100 g e gordura em extrato seco no mínimo 35 g/100 g (BRASIL, 1997); todas as amostras

estavam de acordo com a legislação. Os resultados obtidos neste trabalho, concordam com os encontrados por COELHO (2007) e ANDREATTA et al. (2009) que também não observaram diferença significativa entre os parâmetros pH, acidez e composição centesimal dos queijos Mussarela.

**Tabela IV.10** – Composição centesimal, pH e acidez dos queijos Mussarela produzidos com leite de diferentes faixas de contagem de células somáticas (CCS)

CCS (CS/mL)	Umidade (g/100 g)	Acidez	pH	Proteína (g/100 g)	Gordura (g/100 g)*
< 400.000	45,68 ± 3,83	0,61 ± 0,10	5,60 ± 0,21	20,9 ± 1,10	49,9 ± 5,51
401.000 a 750.000	46,26 ± 0,30	0,54 ± 0,16	5,42 ± 0,12	19,8 ± 0,19	49,9 ± 2,95
> 751.000	48,29 ± 1,03	0,61 ± 0,04	5,68 ± 0,17	21,6 ± 2,86	49,1 ± 5,28

Acidez: g/100 mL de ácido láctico. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros avaliados (Teste de Tukey;  $p > 0,05$ ). \* em extrato seco.  $n = 3$  para cada faixa de CCS.

Os teores de aminas bioativas nos queijos produzidos com leites de diferentes grupos de contagem de células somáticas, um dia após a elaboração, estão apresentados na Tabela IV.11. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos teores de aminas entre os tratamentos. Nas amostras com CCS baixa foi encontrada apenas a espermina, no teor médio de 4,4 mg/Kg. Como nas amostras de leite cru e soro não foi detectada esta amina ( $< 1,2 \mu\text{g/mL}$ ), sua presença pode ser devido ao processo de concentração durante a elaboração dos queijos ou formação por decomposição térmica (BARDÓCZ, 1995).

Nas amostras com CCS média foram encontradas apenas as poliaminas espermidina e espermina. Foi observada a presença da espermina também nas amostras de leite cru, porém em pequenas quantidades. Nos queijos com alta CCS foram encontradas as aminas tiramina, espermina e triptamina, com teores médios de 3,0; 14,4 e 0,5 mg/Kg. A tiramina e a triptamina podem ter sido formadas por decomposição térmica durante a elaboração dos queijos ou pela ação de descarboxilases sobre os aminoácidos, tirosina e triptofano, respectivamente (BARDÓCZ, 1995).

A histamina, amina mais envolvida em casos de intoxicação em queijos (CINQUINA et al., 2004b), não foi encontrada nas amostras analisadas, indicando que os queijos estavam próprios para o consumo não sendo capazes de causar intoxicação histamínica. A putrescina e cadaverina, não foram detectadas ( $< 0,5 \text{ mg/Kg}$ ) nas

amostras de queijo, sugerindo uma boa qualidade higiênico-sanitária durante a elaboração.

**Tabela IV.11** – Perfil e teores de aminos bioativas nos queijos produzidos com leites de diferentes faixas de contagem de células somáticas

Contagem de células somáticas (CS/mL)		Teores de aminos (mg/Kg)			
		TIM	EPD	EPM	TRM
<b>&lt; 400.000</b>	Faixa	nd	nd	3,10-5,77	nd
	Média	nd	nd	4,44	nd
<b>401.000 a 750.000</b>	Faixa	nd	nd-0,62	2,55-9,64	nd
	Média	nd	0,21	6,77	nd
<b>&gt; 751.000</b>	Faixa	nd -5,03	nd	13,23-15,28	nd-1,38
	Média	3,00	nd	14,38	0,46

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as aminos encontradas (Teste de Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ ). nd – não detectado ( $< 0,5$  mg/Kg).

### 3.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICRO-ORGANISMOS PROTEOLÍTICOS E PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS DOS QUEIJOS MUSSARELA DURANTE O ARMAZENAMENTO

Na Tabela IV.12 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas das amostras de queijos Mussarela durante o período de 60 dias de armazenamento. Foi observada uma interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a CCS e o tempo de armazenamento para os parâmetros acidez e proteína. Para a umidade todas as amostras estavam com os valores dentro do limite sugerido pela legislação (BRASIL, 1997). A acidez titulável nas amostras com CCS baixa apresentaram uma redução significativa com 15 dias de armazenamento, porém a partir de 30 dias não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Para as demais faixas de CCS não houve diferença significativa entre os dias de armazenamento. Em relação aos tratamentos observou-se uma diferença significativa na acidez das amostras com CCS baixa nos dias 15 e 30 de análise.

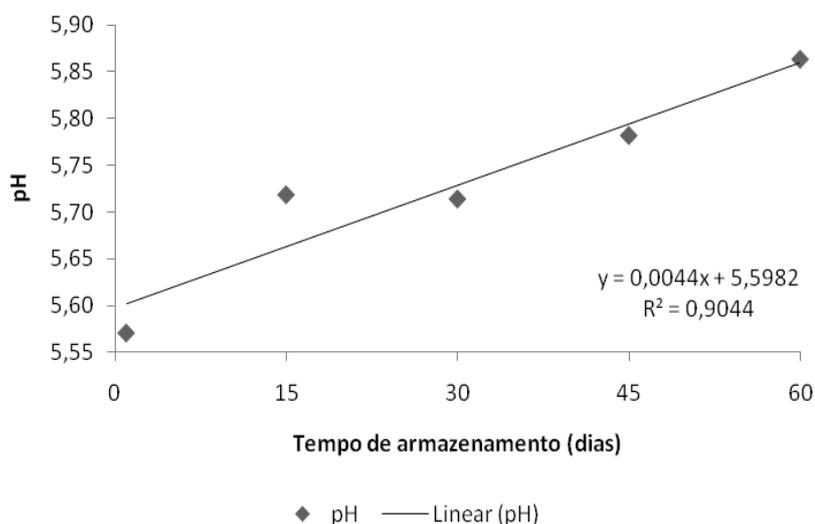
**Tabela IV.12** – Valores de umidade, acidez, pH e proteína nas amostras de queijo Mussarela com diferentes contagens de células somáticas no período de 60 dias de armazenamento

Contagem de células somáticas (CS/mL)	Média* ± DP				
	1 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<b>Umidade (g/100 g)</b>					
< 400.000	45,68 ± 3,83	45,66 ± 3,64	45,84 ± 3,17	45,53 ± 2,99	45,72 ± 2,66
401.000 a 750.000	46,26 ± 0,30	46,62 ± 0,56	46,16 ± 0,82	46,42 ± 0,46	46,74 ± 0,82
> 751.000	48,29 ± 1,03	48,56 ± 2,47	48,89 ± 2,30	49,42 ± 1,53	50,80 ± 2,37
CV (%)	2,03				
Regressão	não significativa				
<b>Acidez (g/100 mL de ácido láctico)</b>					
< 400.000	0,61 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,30 ± 0,12 <sup>b,B</sup>	0,27 ± 0,08 <sup>b,B</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>AB</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>b,AB</sup>
401.000 a 750.000	0,54 ± 0,16	0,68 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,32 <sup>ab</sup>	0,50 ± 0,08	0,42 ± 0,08 <sup>b</sup>
> 751.000	0,61 ± 0,04	0,67 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,06	0,82 ± 0,11 <sup>a</sup>
CV (%)	21,3				
Regressão	não significativa				
<b>pH</b>					
< 400.000	5,61 ± 0,21	5,73 ± 0,61	5,72 ± 0,18	6,01 ± 0,17	6,05 ± 0,26
401.000 a 750.000	5,42 ± 0,12	5,61 ± 0,17	5,85 ± 0,11	5,73 ± 0,17	5,78 ± 0,34
> 751.000	5,69 ± 0,17	5,81 ± 0,26	5,58 ± 0,47	5,61 ± 0,05	5,72 ± 0,01
Média	5,57 <sup>B</sup>	5,72 <sup>AB</sup>	5,71 <sup>AB</sup>	5,78 <sup>AB</sup>	5,86 <sup>A</sup>
CV (%)	3,31				
Regressão	Linear				
<b>Proteína (g/100 g)</b>					
< 400.000	20,9 ± 1,10	20,8 ± 1,39	20,7 ± 1,33	22,1 ± 1,15	21,7 ± 1,53
401.000 a 750.000	19,8 ± 0,19	19,8 ± 1,73	21,2 ± 0,77	21,3 ± 1,09	20,6 ± 0,43
> 751.000	21,6 ± 2,86 <sup>AB</sup>	22,1 ± 2,59 <sup>AB</sup>	23,2 ± 4,11 <sup>A</sup>	19,7 ± 0,15 <sup>B</sup>	20,6 ± 0,59 <sup>AB</sup>
CV (%)	5,61				
Regressão	não significativa				

\*valores obtidos a partir de três repetições. DP – desvio-padrão. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (Teste Tukey;  $p < 0,05$ ).

Em relação aos valores de pH, foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos dias de armazenamento (Tabela IV.12). Os valores foram maiores com 60 dias de estocagem. Não houve interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre a CCS e os dias de armazenamento para este parâmetro, porém observou-se um efeito linear positivo durante o período de armazenamento. Para cada aumento de um dia de armazenamento verifica-se um acréscimo de 0,004 nos valores de pH (Figura IV.4). Este aumento nos valores de pH se deve a liberação de aminoácidos de caráter básicos decorrentes da proteólise secundária (PIZAIA et al., 2003). ANDREATTA (2006) e COELHO (2007) encontraram resultado similar para as amostras de queijos Mussarela elaboradas a partir de leites com diferentes CCS. Os valores de pH foram semelhantes aos encontrados nas amostras de queijo Mussarela obtidas no mercado de Belo Horizonte, conforme apresentado no Capítulo III.

Os teores de proteína nas amostras com CCS alta aumentaram nos queijos analisados com 30 dias e reduziram com 45 dias de armazenamento, porém não foi observada diferença significativa entre os demais dias de estocagem ( $p > 0,05$ ). Esta redução do teor de proteínas nas amostras com 45 dias pode ser devido a atuação dos micro-organismos proteolíticos sobre este componente dos queijos.



**Figura IV.4** – Valores de pH dos queijos Mussarela em função dos dias de armazenamento.

Os resultados da extensão e profundidade da proteólise dos queijos Mussarela durante o período de 60 dias de armazenamento estão apresentados na Tabela IV.13. Os índices de extensão e profundidade da proteólise não sofreram interação entre a CCS e os dias de armazenamento, porém tiveram efeito significativo para CCS e para

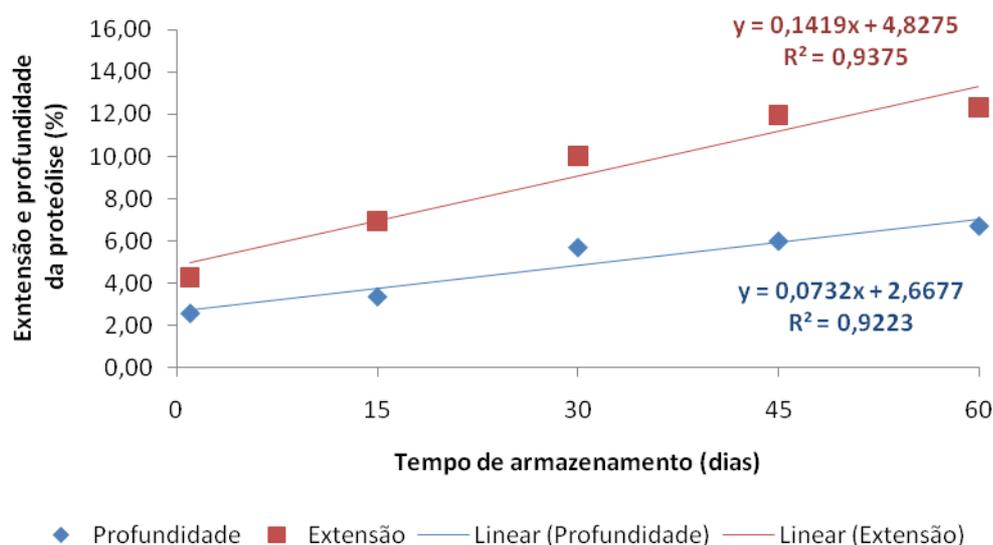
o tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ). Os valores médios foram superiores para as amostras com CCS média e alta, sugerindo uma contribuição da CCS para o desenvolvimento da extensão e profundidade da proteólise nestes queijos. A principal enzima responsável pela proteólise em queijos é a plasmina, a qual mantém a sua atividade proteolítica mesmo depois da pasteurização (ZACHOS et al., 1992). No entanto, no leite com elevada CCS, observa-se um aumento de enzimas proteolíticas, especialmente, a plasmina e o seu precursor inativo, o plasminogênio. Além dessas, enzimas originadas das células somáticas e dos leucócitos podem contribuir para a atividade proteolítica no leite. CONSIDINE et al. (2002) estudaram a catepsina-G que é uma das principais proteases liberadas pelos polimorfonucleares. Foi demonstrado a capacidade da enzima em hidrolizar as  $\alpha_{S1}$ - e  $\beta$ -caseínas com produção de peptídeos similares aos liberados pela plasmina, concluindo que a catepsina-G pode contribuir de maneira significativa para a proteólise que ocorre no leite com CCS alta.

Em relação ao tempo de armazenamento houve um efeito linear positivo significativo da extensão e profundidade da proteólise ( $p < 0,05$ ). O aumento da extensão e profundidade para cada dia de armazenamento foi de 0,142 e 0,073%, respectivamente (Figura IV.5). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por ANDREATA (2006), que também não encontrou interação significativa entre a CCS e os dias de armazenamento e observou um efeito linear positivo ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo de armazenamento. COELHO (2007) também avaliou o efeito da CCS na qualidade do queijo Mussarela e observou uma maior profundidade e extensão da proteólise em queijos elaborados com leite contendo níveis de CCS superiores a 400.000 CS/mL. MAZAL et al. (2007) também observaram frações nitrogenadas solúveis em pH 4,6 e em TCA 12% maiores nos queijos Prato com CCS alta, concordando com os resultados obtidos neste trabalho para queijo Mussarela.

**Tabela IV.13** – Valores de índice de extensão e profundidade da proteólise nas amostras de queijo Mussarela com diferentes contagens de células somáticas no período de 60 dias de armazenamento

Contagem de células somáticas (CS/mL)	Média* ± DP					Média
	1 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	
<b>Extensão da proteólise</b>						
< 400.000	1,43 ± 0,94	4,39 ± 1,86	8,73 ± 1,58	9,82 ± 0,37	9,62 ± 0,71	6,80 <sup>b</sup>
401.000 a 750.000	4,62 ± 2,59	8,08 ± 1,13	9,61 ± 2,35	11,52 ± 3,99	12,83 ± 2,33	9,33 <sup>a</sup>
> 751.000	6,85 ± 0,86	8,41 ± 0,98	11,71 ± 1,50	14,56 ± 0,85	14,50 ± 1,25	11,21 <sup>a</sup>
<b>Média</b>	4,30 <sup>C</sup>	6,96 <sup>B</sup>	10,02 <sup>A</sup>	11,97 <sup>A</sup>	12,32 <sup>A</sup>	
<b>CV (%)</b>						19,76
<b>Regressão</b>						Linear
<b>Profundidade da proteólise</b>						
< 400.000	0,29 ± 0,49	2,90 ± 2,53	5,14 ± 3,06	5,06 ± 0,93	5,01 ± 1,50	3,68 <sup>b</sup>
401.000 a 750.000	3,40 ± 1,36	3,12 ± 1,66	6,07 ± 1,08	6,73 ± 2,86	6,54 ± 1,75	5,17 <sup>ab</sup>
> 751.000	4,11 ± 1,93	4,13 ± 0,92	5,89 ± 1,46	6,21 ± 0,47	8,59 ± 1,69	5,79 <sup>a</sup>
<b>Média</b>	2,59 <sup>C</sup>	3,38 <sup>BC</sup>	5,70 <sup>AB</sup>	6,00 <sup>A</sup>	6,71 <sup>A</sup>	
<b>CV (%)</b>						37,25
<b>Regressão</b>						Linear

\*Valores obtidos a partir de três repetições. DP – desvio-padrão. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (Teste Tukey;  $p < 0,05$ ).



**Figura IV.5** – Índices de extensão e profundidade da proteólise dos queijos Mussarela em função dos dias de armazenamento.

Os resultados das contagens de micro-organismos proteolíticos para as amostras de queijo Mussarela com 15 e 45 dias de armazenamento estão apresentados na Tabela IV.14.

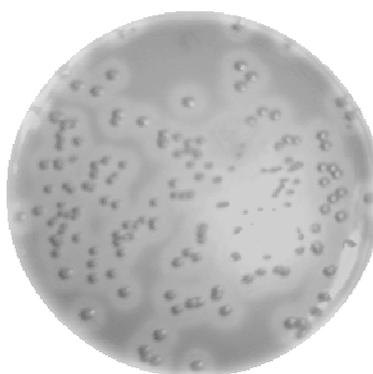
**Tabela IV.14** – Micro-organismos proteolíticos em amostras de queijos Mussarela com 15 e 45 dias de armazenamento, elaborados a partir de leites com diferentes níveis de contagens de células somáticas (CCS)

Amostras	Dia	CCS (CS/mL) / Micro-organismos proteolíticos (log UFC/g)		
		< 400.000	401.000 a 750.000	> 751.000
Queijos Mussarela	15	< 1,00	< 1,00	1,00*
		2,00*	1,54*	1,74*
		< 1,00	3,30*	1,93*
	45	4,93*	5,81	2,75
		1,95*	3,15*	3,92
		1,60*	4,11*	3,40

\* estimado.

Nas amostras com CCS baixa, média e alta analisadas com 15 dias de armazenamento, todos os valores de log UFC/g foram estimados, ou seja, o número de contagens de colônias foram inferiores aos valores esperados. Os queijos com alta CCS analisados com 45 dias apresentaram valores de log UFC/g dentro do intervalo de precisão e repetibilidade estabelecido (BRASIL, 2003). O valor médio do log UFC/g

obtido para estas amostras foi de 3,36. Uma amostra com CCS média apresentou valor de 5,81 (log UFC/g) e nas demais amostras os valores obtidos foram estimados. Os queijos Mussarela com 45 de armazenamento apresentaram uma maior contagem de micro-organismos proteolíticos. Estes micro-organismos são capazes de sintetizar enzimas com atividade proteolítica liberando aminoácidos que podem contribuir na formação das aminas nos queijos (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2002b). Um exemplo de colônias típicas de micro-organismos proteolíticas obtidos em uma das amostras de queijo Mussarela está apresentado na Figura IV.6.



**Figura IV.6** – Exemplo de colônias típicas de micro-organismos proteolíticos obtidas em uma amostra de queijo Mussarela utilizando o meio ágar-padrão acrescido de leite em pó reconstituído a 10%.

Os resultados das aminas bioativas durante o período de armazenamento de 60 dias dos queijos Mussarela elaborados a partir de leites com diferentes níveis de CCS estão apresentados na Tabela IV.15. Dentre as dez aminas bioativas pesquisadas foram encontradas apenas tiramina, serotonina, espermidina, espermina e triptamina. A espermidina foi encontrada apenas nos queijos com CCS baixa e média, com teor variando de < 0,5 a 0,6 mg/Kg. Nas amostras analisadas no Capítulo III, os teores de espermidina obtidos foram semelhantes, variando de < 0,5 a 1,1 mg/Kg.

Não foi encontrada diferença significativa para as aminas pesquisadas em relação aos tratamentos ( $p > 0,05$ ). Estes resultados indicam que a contagem de células somáticas do leite cru teve pouco efeito sobre a formação das aminas bioativas nos queijos Mussarela. ANTILA et al. (1984) avaliaram a influência da CCS do leite cru na formação das aminas em queijo Emmental. Estes autores reportaram que os queijos elaborados a partir de leite com CCS baixa ( $1,1$  a  $1,4 \times 10^5$  CS/mL) apresentaram um teor médio de aminas maior quando comparado aos queijos elaborados a partir de leite com CCS alta ( $7,8$  a  $10 \times 10^6$  CS/mL). Os teores totais das

aminas durante seis meses de maturação variaram de 1,5 a 157,0 mg/100 g e 1,8 a 102,0 mg/100 g, para os queijos com CCS baixa e alta, respectivamente.

Em relação aos teores de serotonina, foi encontrada diferença significativa entre os dias de estocagem ( $p < 0,05$ ) apenas para os queijos com CCS alta. Observou-se um aumento significativo a partir de 45 dias de armazenamento. A presença de micro-organismos proteolíticos nos queijos com 45 dias de estocagem podem ter colaborado na formação desta amina. Na síntese da serotonina, o triptofano é transformado pela enzima triptofano hidrolase em 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela enzima aminoácido aromático descarboxilase em 5-hidroxitriptamina ou serotonina (GLORIA, 2005).

A tiramina foi encontrada apenas nas amostras com CCS alta e média. Esta amina não é desejável nos queijos Mussarela, pois quando ingerida em altos níveis pode causar aumento na pressão sanguínea pela vasoconstrição periférica. Em pacientes em tratamento com inibidores da MAO, a tiramina pode causar enxaqueca, induzir hemorragia cerebral e parada cardíaca (SMITH, 1980-1981; GLORIA & VIEIRA, 2007). Os resultados obtidos sugerem a presença de enzimas com capacidade descarboxilante sobre a tirosina nos queijos com CCS média e alta.

A espermina foi detectada em todas as amostras analisadas, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores obtidos nos diferentes tempos de análise para todas as faixas de CCS. Em CCS baixa, os maiores teores de EPM foram obtidos a partir de 45 dias de estocagem, já nos intervalos de CCS média e alta o aumento foi observado a partir de 15 dias de armazenamento. Esta amina se encontra amplamente distribuída em todos tecidos, porém nas células elas podem ser encontradas tanto na forma ligada a macromoléculas (principalmente ácidos nucléicos) quanto em sua forma livre (SEILER, 1990). Nos queijos Mussarela, provavelmente o aumento nos teores de espermina se deve a presença de micro-organismos com capacidade de sintetizar e liberar esta amina para o meio externo (SOUZA, 2008).

A triptamina estava presente nas amostras com CCS baixa e alta com teores variando de  $< 0,5$  a 1,6 e  $< 0,5$  a 7,3 mg/Kg, respectivamente. Estes resultados sugerem a presença de micro-organismos com capacidade de sintetizar enzima descarboxilase sobre o aminoácido triptofano, contribuindo para a formação de triptamina. Porém, mais estudos com relação ao isolamento das espécies bacterianas presentes nestes tipos de queijos seriam necessários.

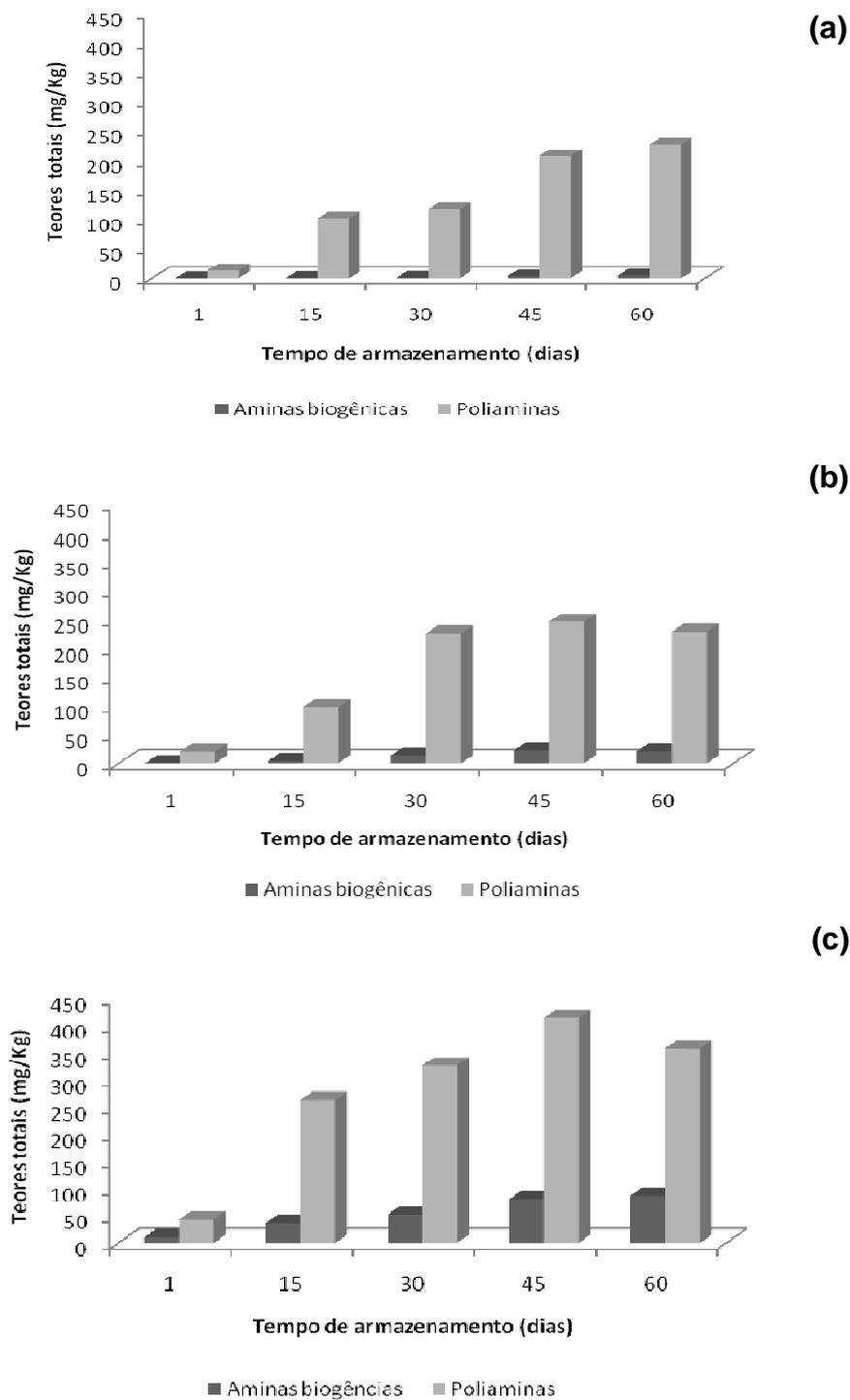
**Tabela IV.15** – Teores de aminos bioativas (mg/Kg) em amostras de queijo Mussarela elaborado a partir de leite com diferentes contagens de células somáticas durante o período de armazenamento de 60 dias

Contagem de células somáticas (CS/mL)		Teores de aminos (mg/Kg)				
		1 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
		<b>Tiramina</b>				
< 400.000	Faixa	nd	nd	nd	nd	nd
	Mediana	nd	nd	nd	nd	nd
401.000 a 750.000	Faixa	nd	nd	nd- 6,04	nd-8,70	nd-8,20
	Mediana	nd	nd	1,70	1,97	2,36
> 751.000	Faixa	nd-5,03	0,83-15,09	nd-16,61	nd-26,49	nd-28,04
	Mediana	3,97	7,98	9,03	15,50	17,41
		<b>Serotonina</b>				
< 400.000	Faixa	nd	nd	nd	nd-2,43	nd-3,16
	Mediana	nd	nd	nd	0,00	0,00
401.000 a 750.000	Faixa	nd	nd-4,09	nd-6,12	nd-12,13	nd-10,67
	Mediana	nd	0,00	0,00	0,00	0,00
> 751.000	Faixa	nd	nd-6,03	3,44-11,18	5,04-20,06	5,15-20,62
	Mediana	0,00 <sup>b</sup>	3,49 <sup>b</sup>	5,06 <sup>a</sup>	5,23 <sup>a</sup>	6,99 <sup>a</sup>
		<b>Espermidina</b>				
< 400.000	Faixa	nd	nd	nd	nd	nd-0,56
	Mediana	nd	nd	nd	nd	0,00
401.000 a 750.000	Faixa	nd-0,62	nd	nd	nd	nd
	Mediana	0,00	nd	nd	nd	nd
> 751.000	Faixa	nd	nd	nd	nd	nd
	Mediana	nd	nd	nd	nd	nd
		<b>Espermina</b>				
< 400.000	Faixa	3,10-5,77	7,89-65,82	10,76-92,40	11,49-106,75	24,08-107,40
	Mediana	4,46 <sup>b</sup>	29,03 <sup>b</sup>	15,01 <sup>b</sup>	90,50 <sup>a</sup>	95,19 <sup>a</sup>
401.000 a 750.000	Faixa	2,55-9,64	8,88-57,10	12,96-167,28	20,44-166,44	36,45-133,04
	Mediana	8,10 <sup>b</sup>	32,36 <sup>a</sup>	45,93 <sup>a</sup>	59,50 <sup>a</sup>	58,42 <sup>a</sup>
> 751.000	Faixa	13,23-15,28	52,67-132,79	94,54-136,85	90,25-201,72	98,20-156,25
	Mediana	14,64 <sup>b</sup>	77,70 <sup>a</sup>	95,15 <sup>a</sup>	121,99 <sup>a</sup>	103,35 <sup>a</sup>
		<b>Triptamina</b>				
< 400.000	Faixa	nd	nd-0,71	nd-1,10	nd-1,05	nd -1,64
	Mediana	nd	0,00	0,00	0,00	0,00
401.000 a 750.000	Faixa	nd	nd	nd	nd	nd
	Mediana	nd	nd	nd	nd	nd
> 751.000	Faixa	nd-1,38	nd-3,94	nd-5,51	nd-6,82	nd-7,34
	Mediana	0,00	0,00	0,89	1,41	1,61

Medianas com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelos Testes de Kruskal Wallis e Friedman, respectivamente. nd - não detectado ( $< 0,5$  mg/Kg).

Os teores totais das aminos biogênicas e poliaminas (mg/Kg) nas amostras de queijo elaboradas com leite contendo CCS baixa (a), média (b) e alta (c) estão apresentados na Figura IV.7. Observa-se que as poliaminas foram as aminos predominantes nos queijos em todos os tratamentos, durante todo o período de

armazenamento. Estas amins são importantes devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana e pelo efeito antioxidante, podendo aumentar a vida de prateleira dos queijos (KALAIČ & KRAUSOVÁ, 2005; TAKLE & MOERKOERE, 2008). As amostras de queijo provenientes de leites com alta CCS apresentaram teores totais das amins biogênicas e poliaminas superiores aos obtidos nas amostras provenientes de leite com CCS baixa e média. As amins biogênicas em altas concentrações, são indesejáveis nos queijos, visto que, podem causar efeitos adversos a saúde humana (GLORIA, 2005).



**Figura IV.7** – Teores totais (mg/Kg) de aminas biogênicas e poliaminas nos queijos Mussarela obtidos a partir de leite com contagens de células somáticas baixa (a), média (b) e alta (c), durante o período de armazenamento de 60 dias.

## 4 CONCLUSÕES

A contagem de células somáticas influenciou a qualidade do leite, afetando principalmente os teores de lactose e os valores de pH. As amostras com CCS alta apresentaram valores inferiores de lactose e superiores de pH.

Das aminas bioativas investigadas no leite cru foi encontrada apenas a espermina no teor de 1,2 mg/L. Não foi encontrada diferença significativa para a CBT entre as faixas de CCS.

Nas amostras de soro a CCS teve influência nos mesmos parâmetros das amostras de leite e a amina encontrada foi apenas a espermina (1,4 mg/L) nas amostras com CCS média.

O processo de elaboração dos queijos não influenciou nos parâmetros físico-químicos e aminas bioativas. Nas amostras de queijos Mussarela houve interação significativa entre a CCS e o tempo de armazenamento para os parâmetros acidez e proteína. Foi observado um aumento linear do pH e dos índices de extensão e profundidade da proteólise com o tempo de armazenamento.

Dentre as aminas investigadas foram encontradas a tiramina, serotonina, espermidina, espermina e triptamina nos queijos mussarela. Estes resultados sugerem que a CCS não teve efeito significativo na formação destas aminas. As amostras com alta CCS apresentaram os maiores teores totais de aminas biogênicas e poliaminas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em: <http://www.abiq.com.br>. Acesso em: 15 de julho de 2010.
- ABREU, A.S. Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vaca Jersey. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, 97p. (Dissertação de Mestrado).
- AHMAD, T.; GILMOUR, S.G. Robustness of subset response surface designs to missing observations. *J. Stat. Plann. Infer.*, v. 140, p. 92-103, 2010.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; RUSSO, D.E.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; SEVI, A. Influence of milk quality and production protocol on proteolysis and lipolysis in Monti Dauni Meridionali Caciocavallo cheese. *J. Dairy Res.*, v. 77, p.385-391, 2010.
- ALMEIDA, A.A.P.; SILVEIRA, T.M.L., GLORIA, M.B.A. Aminas bioativas em leite integral UHT comercializado na região de Belo Horizonte, MG. *Rev. ILCT.* v. 58, p. 235-238, 2003.
- ANDRADE, L.M.; FARO, L.R.; CARDOSO, V.R.; ALBUQUERQUE, L.G.; CASSOLI, L.C.; MACHADO, P.F. Efeitos genéticos e de ambiente sobre a produção de leite e a contagem de células somáticas em vacas holandesas. *R. Bras. Zootec.*, v. 36, p. 343-349, 2007.
- ANDRADE, U.V.C.; HARTMANN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *ARS Veterinaria*, v.25, p. 129-135, 2009.
- APHA, American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products. 17th ed. New York: American Public Health Association; 1994.
- ANDREATTA, E. Avaliação da qualidade dos queijos Minas Frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas. Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2006, 110p. (Tese de doutorado).
- ANDREATTA, E.; FERNANDES, A.M.; DOS SANTOS, M.V.; LIMA, C.G.; MUSSARELLI, C.; MARQUES, M.C.; OLIVEIRA, C.A.F. de. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.62, p.166, 170, 2007.
- ANDREATTA, E.; FERNANDES, A.M.; DOS SANTOS, M.V.; MUSSARELLI, C.; MARQUES, M.C.; GIGANTE, M.L.; OLIVEIRA, C.A.F. Quality of minas frescal

- cheese prepared from milk with different somatic cell counts. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.44, p.320-326, 2009.
- ANTILA, P.; ANTILA, V.; MATTILA, J.; HAKKARAINEN, H. Biogenic amines in cheese. II. Factors influencing the formation of biogenic amines, with particular reference to the quality of the milk used in cheese making. *Milchwiss.*, v. 39, p. 400-404, 1984.
- ANTOINE, F.R.; WEI, C.; OTWELL, W.S.; SIMS, C.A.; LITTELL, R.C.; HOGLE, A.D.; MARSHALL, M.R. Gas chromatographic analysis of histamine in Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 4754-4759, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Washington, v.1-2, 1995.
- AUDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Aust J Dairy Tech*, v.53, p.28-36, 1998.
- BAKER, G.B.; WONG, J.T.F.; COUNTS, R.T.; PASUTTO, F.M. Simultaneous extraction and quantitation of several bioactive amines in cheese and chocolate. *Chromatographia*, v. 19, p. 317-331, 1987.
- BARBANO, D.M.; RASMUSSEN, R.R.; LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 369-388, 1991.
- BARBANO, D. The role of milk quality and mastitis control in addressing future dairy food marketing opportunities in a global economy. NMC Regional meeting Proceedings. Bloomington, p. 1-5, 2004.
- BARBOSA, S.B.P.; MONARDES, H.G.; CUE, R.I.; RIBAS, P.N.; BATISTA, A.M.V. Avaliação da contagem de células somáticas na primeira lactação de vacas holandesas no dia do controle mensal. *R. Bras. Zootec.*, v.36, p.94-102, 2007.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food: implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.*, v.4, p. 66-71, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARRY, J.G; DONNELLY, W.J. Casein compositional studies II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. *J. Dairy Res.*, v. 48, p. 437-446, 1981.
- BAŞ, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.*, v. 78, p. 836-845, 2007.
- BAUZA, T.; BLAISE, A.; TEISSEDRE, P.L.; CABANIS, J.C. Les amines biogènes du vin, *Métabolisme et toxicité*. *Bull. L'O.I.V.*, p. 43-67, 1995.

- BELLAGAMBA, F.; MORETTI, V.M.; MENTASTI, T.; ALBEETINI, A.; LUZZANA, U.; VALFRÈ, F. High-performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivatives using a column-switching technique. *J. Chromatogr. A*, v. 791, p. 79-84, 1997.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. BactoCount 150 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49p.
- BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v.76, p. 965-977, 2008.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 53, p. 33-41, 1999.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. *Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building*. New York, USA: Wiley, 1978.
- BRAGA, G.C.; BRIETZKE, A.L.; ARAÚJO, J.S.; GARCIA, R.C.; PEIXOTO, E.C.T.M. Contagem de células somáticas em leite formal de produtores de Marechal Cândido Rondon – PR. *Arch. Vet. Sci.*, v. 11, p. 80-85, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146 (1). Diário Oficial, Brasília, 07 de março de 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 364. Diário Oficial, Brasília, 04 de setembro de 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51. Diário Oficial, Brasília, 18 de setembro de 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62. Diário Oficial, Brasília, 26 de agosto de 2003 (Anexo IV).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68. Diário Oficial, Brasília, 12 de dezembro de 2006.
- BRITO, J.R.F. Células somáticas no leite: uma revisão. *CBLQ em Revista* v. 1, p. 11-17, 2003.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. O efeito da mastite no leite. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/revista.htm>. Acesso em: 20 de julho de 2010.
- BUENO, V.F.F.B.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P. NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Cienc. Rural*, v. 3, p. 848-854, 2005.

- BURTON, K.W.C.; NICKLESS, G. Optimization via simplex. Part I. Background, definitions and a simple application. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, v.1, 135-149, 1987.
- CANDIA, S.; De ANGELIS, M.; DUNLEA, E.; MINERVINI, F.; McSWEENEY, P.L.H.; FACCIA, M.; GOBBETTI, M. Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheese. *Int. J Food Microbiol.*, v.119, p.182-191, 2007.
- CARVALHO, G.L.O.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.F.; JÚNIOR, J.E.F.L.; FARIA, C.G.; VICENTINI, N.M.; SOUZA, G.N. Avaliação dos componentes do leite e contagem de células somáticas de rebanhos bovinos localizados na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia. In: IV Congresso Brasileiro da Qualidade do Leite. Florianópolis, 2010.
- CHANDER, H.; BATISH, V.K.; BABU, S.; SINGH, R.S. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.*, v.54, p. 940-942, 1989.
- CHANG, S.F.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.S. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophane. *J. Dairy Sci.*, v. 68, p. 2840-2846, 1985.
- CHAUHAN, K.; TRIVED, U.; PATEL, K.C. Statistical screening of medium components by Plackett – Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresour. Technol.*, v. 98, p.98-103, 2007.
- CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; SEVERONI, A.; ABBALE, F. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1032, p. 73-77, 2004a.
- CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; BACCELLIERE, R.; COZZANI, R. Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *J. Chromatogr. A*, v. 1032, p. 79-85, 2004b.
- CE (Conformite Europeene). Directiva de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas aplicables a la produccion y puesta en el Mercado de los productos pesqueros (91/439/EEC). *Diario Oficial de la Comunidades Europeas*, v. 286, p. 15-34, 1991.
- CODEX ALIMENTARIUS. Volume 3. Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos. 2 ed. Roma. 1993.
- COELHO, K.O. Efeito da contagem de células somáticas no leite sobre o rendimento e qualidade do queijo Mussarela. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2007, 58p. (Tese de doutorado).

- CONSIDINE, T.; GEARY, S.; KELLY, A.L.; McSWEENEY, P.L.H. Proteolytic specificity of cathepsin G on bovine alphas 1- and beta caseins. *Food Chem.*, v. 76, p. 59-67, 2002.
- COONEY, S.; TIERNAN, D.; JOYCE, P.; KELLY, A. Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese. *J. Dairy Res.*, v. 67, p. 301-307, 2000.
- COSTABEL, L.; PAULETTI, M.S.; HYNES, E. Proteolysis in Mozzarella Cheeses manufactured by different industrial processes. *J. Dairy Sci.* v. 90, p. 2103-2112, 2007.
- CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTLINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas Holandesas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, p.19-24, 2008.
- CUSTÓDIO, F.B. Estudo da eficiência e seletividade de diferentes métodos de extração, purificação e detecção na determinação de histamina e tiramina em queijo ralado. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia – UFMG, 2006, 160p. (Tese de doutorado).
- CUSTÓDIO, F.B.; TAVARES, E.; GLORIA, M.B.A. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. *J. Food Compos. Anal.*, v.20, p. 280-288, 2007.
- DALGAARD, P.; MADSEN, H.L.; SAMIEIAN, N.; EMBORG, J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J. App. Microbiol.*, v. 101, p. 80-95, 2006.
- 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. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 114-126, 2003.
- DELLA LIBERA, A.M.M.P; ARAUJO, W.P.; COSTA, E.O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J.F.P.; BENATTI, L.A.T. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.2, p.42-47, 2001.
- DELTA Instruments Inc. Operating Guidelines Combi, 2009.
- DIAZ-CINCO, M.E.; GRAJEDA, P.; LOZANO-TAYLOR, J.; MEJÍA, E.G. Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationship to histamine and tyramine. *J. Food Sci.*, v. 57, p.355-365, 1992.

- DOS SANTOS, A.C.V.; MASINI, J.C. Applying sequential injection analysis (SIA) and response surface methodology for optimization of Fenton-based processes. *Talanta*, v. 77, p. 1081-1086, 2009.
- EDWARDS, S.T.; SANDINE, W.E. Public health significance of amines in cheese. *J. Dairy Sci.*, v. 64, p. 2431-2438, 1981.
- EIRAS, S.P.; CUELBAS, C.J.; DE ANDADE, J.C. Um estudo comparativo sobre a eficiência de estratégias quimiométricas de otimização. *Quim. Nova*, v.17, p.216-219, 1994.
- EL-SAYED, M.M. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *Int. Dairy J.*, v. 6, p. 1079-1086, 1996.
- ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H.F. Dietary polyamines. *Food Chem.*, v. 78, p.273-280, 2002.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0424.ph>. Acesso em: 01 de julho de 2010.
- FDA (Food and Drug Administration). Decomposition and histamine – raw frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related species; availability of revised compliance policy guide. *Federal Registration*, v. 149, p. 39754-39756, 1995.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; TOMILLO, J.; NUÑEZ, M. Formation of biogenic amines in raw milk hispánico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J. Food Protect.*, v. 63, p. 1551-1555, 2000.
- FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.M.; ROSIM, R.E.; LIMA, C.G.; OLIVEIRA, C.A.F. Casein fractions of ultra high temperature milk with different somatic cell counts. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 43, p.149-152, 2008.
- FERREIRA, D.N. Influência do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento e na qualidade da Mussarela de reduzido teor de gordura produzida por acidificação direta. Campinas: UNICAMP. 2004. 108p. (Dissertação de Mestrado).
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- FONSECA, C.S.P. Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 2005, 62p. (Dissertação de Mestrado).
- FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Dairy chemistry and biochemistry, London: Blackie Academic and Professional, 1998. 478p.

- FURTADO, M.M.; LOURENÇO-NETO, J.P.M. Tecnologia de Queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos. 1ªed. São Paulo: Dipemar, 118p., 1994.
- FURTADO, M.M. Manual prático da Mussarela (Pizza Cheese). Campinas: Master Graf, 70 p. 1997.
- GARCIA-MORENO, C.; GOMEZ-CERRO, M.A.; NOGALES-ALARCON, A.; MARINE-FONT, A. Serotonina em alimentos. *Alimentaria*, v. 93, p. 21-28, 1978.
- GASQUES, J.G.; BASTOS, E.T.; GATTO, L.F.S. Agronegócio – Brasil 2009/10 a 2019/20. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 27 de julho de 2010.
- GENNARO, M.C.; GIANOTTI, V.; MARENGO, E.; PATTONO, D.; TURI, R.M. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on the contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chem.*, v. 82, p.545-551, 2003.
- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Protect.*, v. 60, p. 732-738, 1997.
- GLORIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A. Metodologia para a determinação de aminas biogênicas em bebidas. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 9, 1995, João Pessoa. Livro de Resumos. João Pessoa: UFP, 1995, p. 137.
- GLORIA, M.B.A. Bioactive amines. IN: Hui; L.L. Nollet. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed. Marcel Dekker, v.4, p. 1-38, 2005.
- GLORIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. *Food*, v.1, p. 258-270, 2007.
- GLORIA, M.B.A.; SARAIVA, P.R.L.; RIGUEIRA, J.C.S.; BRANDÃO, S.C.C. Bioactive amines changes in raw and sterelised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. *Int J Dairy Technol.*, v.63, p. 1-7, 2010.
- GRANDISSON, A.S; FORD, G.D. Effects of variations in somatic cell count on the rennet coagulation properties of milk and on the yield composition and quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, v. 53, p. 645-655, 1986.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 5, p. 42-49, 1994.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factor affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

- HARMON, R.J.; RENEAU, J.K. Factors affecting somatic cell counts in milk. In: MAGALHÃES, H.R.; FARO, L.E.; CARDOSO, V.L.; PAZ, C.C.P.; CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. *R. Bras. Zootec.*, v. 35, p. 415-421, 2006.
- HILLARY, A.R.; PEGG, A.E. Decarboxylases involved in polyamines biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1647, p. 161-166, 2003.
- HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *J. Appl. Microbiol.*, v.97, p.935-941, 2004.
- INGLES, D.L.; BACK, J.F.; GALLIMORE, D.; TINDALE, R.; SHAW, K.J. Estimation of biogenic amines in food. *J. Sci. Food Agric.*, v.36, p. 402-406, 1985.
- INOCENTE, N.; D'AGOSTIN, P. Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *J. Food Protect.*, v. 65, p. 1498-1501, 2002.
- INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivation of acid extract. *Food Chem.*, v. 101, p. 1285-1289, 2007.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. FIL-IDF 20 B. Milk. Determination of nitrogen content (Kjeldhal method). Brussels: IDF, 1993.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post column derivatization. *J AOAC Int.*, v. 76, p.1027-1032, 1993.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; HERNÁNDEZ-JOVER, T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in European beers. *J. Agric. Food Chem.*, v. 44, p. 3159-3163, 1996.
- JEEVANANDAM, M.; HOLADAY, B.S.; BEGAY, C.K.; PETERSEN, S.R. Nutrition efficacy of a spermidine supplemented diet. *Nutrition*, v. 13, p. 788-794, 1997.
- JOOSTEN, H.M.L.; NUÑEZ, M. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 62, p.1178-1181, 1996.
- KALAČ, P.; ŠVECOVÁ, S.; PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chem.*, v. 77, p. 349-351, 2002.

- KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.*, v. 90, p. 219-230, 2005.
- KALAČ, P.; GLORIA, M.B.A. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. *Transworld Research Network*, v.37/661, p. 268-309, 2009.
- KINDSTEDT, P.S. Mozzarella and pizza cheese. In: Fox, P.F. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. London: Elsevier Applied Publ. Science. p. 337-362, 1993.
- KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.*, v. 48, p. 167-188, 1981.
- KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 1205-1213, 1998.
- KOEHLER, P.E.; EITENMILLER, R.R. High pressure liquid chromatographic analysis of tyramine, phenylethylamine and tryptamine in sausage, cheese and chocolate. *J. Food Sci.*, v. 43, p. 1245-1247, 1978.
- LACERDA, L.M.; MOTA, R.A.; DE SENA, M.J. Contagem de células somáticas, composição e contagem bacteriana total do leite de propriedades leiteiras nos municípios de Miranda do Norte, Itapecurú – Mirim e Santa Rita, Maranhão. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, p.209-215, 2010
- LADERO, V.; MARTINEZ, N.; MARTIN, M.C.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, M.A. qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Res. Int.* v.43, p.289-295, 2010.
- LANDETE, J.M.; RIVAS, B.D.L.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Crit. Rev. Food Sci.*, v. 48, p. 697-714, 2008.
- LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMAN, C. Comparison of a capillary eletrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *J. Chromatogr. B*, v. 779, p. 229-239, 2002.
- LANGONI, H. Estudos sobre contagem de células somáticas (CCS) no Brasil – Uma revisão. In: *Perspectiva e Avanços da qualidade do leite no Brasil, Anais de Congresso*, Goiânia, 2006.

- LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. New solvent system for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *J. Chromatogr. A*, v. 1045, p. 223-232, 2004.
- LAVIZZARI, T.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1129, p. 67-72, 2006.
- LEUSCHNER, R.G.K.; KURIHARA, R.; HAMMES, W.P. Effect os enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 44, p. 15-20, 1998.
- LIMA, A.S. Metodologia para a determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência - par iônico. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 1999. 77p. (Dissertação de Mestrado).
- LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. *British J. Nutr.*, v. 84, p.S55- S58, 2000.
- MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M.; GALTON, D.M.; RUDAN, M.A.; BOOR, K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 264-274, 2000.
- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIÉS, G.A. Efeito da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. *Rev. ILCT*. v. 54, p.10-16, 1999.
- MACHADO, P.F.M.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição de leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, p. 2765-3768, 2000.
- MAGALHÃES, H.R.; FARO, L.E.; CARDOSO, V.L.; PAZ, C.C.P.; CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 35, p. 415-421, 2006.
- MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.*, v. 79, n. 1, p. 43-49, 1996.
- MAYER, H.K.; FIECHTER, G.; FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination biogenic amines in cheese. *J. Chromatogr. A.*, v. 1217, p. 3251-3257, 2010.
- MARCHIORI, J.M.G. Qualidade nutricional dos queijos Mussarela orgânico e convencional elaborados com leite de búfala e de vaca. Araraquara: Faculdade de

- Ciências Farmacéuticas. Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara, SP. 2006, 54p. (Dissertação de Mestrado).
- MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of *enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Letters Appl. Microbiol.*, v. 31, p.169-173, 2000.
- MARINO, R.; CONSIDINE, T.; SEVI, A.; McSWEENEY, P.L.H.; KELLY, A.L. Contribution of proteolytic activity associated with somatic cells in milk to cheese ripening. *Int. Dairy J.*, v.15, p. 1026-1033, 2005.
- 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. *Int. Dairy J.*, v.15, p. 571-578, 2005.
- MATIOLI, G.P.; PINTO, S.M.; DE ABREU, L.R.; XAVIER, L. TEIXEIRA, L.A.M. Influência do leite proveniente de vacas mastísticas no rendimento de queijo Minas Frescal. *Rev. ILCT*, v. 54, p.38-45, 2000.
- MATIOLI, G.P. Influência da contagem de células somáticas na qualidade do leite e nas propriedades do queijo Minas Padrão ao longo da maturação. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2005, 100p. (Tese de Doutorado).
- MAZAL, G.; VIANNA, P.C.B.; SANTOS, M.V.; GIGANTE, M.L. Effect os somatic cell count on Prato cheese composition. *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 630-636, 2007.
- 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. J. Agric. Food Chem.*, v. 58, p. 127-134, 2010.
- McMAHON, D.J.; OBERG, C.J.; McMANUS, W. Functionality of Mozzarella cheese. *Aust J Dairy Tech*, v.48, p.99-104, 1993.
- MILKPOINT. Demanda global por lácteos aumentou 15 % em 5 anos. 15 dez/2008. Disponível em: [www.milkpoint.com.br](http://www.milkpoint.com.br). Acesso em: 16 de julho de 2010.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.*, v. 24, p.184-197, 2005.
- MOREIRA-ARAÚJO, R.S.R. Determinação dos tipos e teores de aminas bioativas no leite humano em diferentes fases de lactação e o efeito do processamento. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia – UFMG, 2003, 78p. (Relatório de Pós-Doutorado).

- MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M. C.; MUÑOZ, R. Screening of biogenic amine production by lactic bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 84, p. 117-123, 2003.
- MORET, S.; BORTOLOMEAZZI, R.; FERUGLIO, M. LERCKER, G. Amine biogeniche in formaggi italiani. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, v. 43, p.187-198, 1992.
- MORET, S.; CONTE, L.S. High performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods: An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatogr. A*, v. 729, p.363-369, 1996.
- MOTYL, T.; PLOSZAJ, T.; WOJTASIK, A.; KUKULSKA, W.; PODGURNIAK, M. Polyamines in cow's and sow's milk. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 111B, p. 427-433, 1995.
- MURPHY, S.C. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, v. 72, p. 620-626, 1989.
- MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy Food Environ. Sanit.*, v. 20, p. 606-611, 2000.
- NORO, G. GONZÁLEZ, F. H. D.; Campos, R. ; Dürr, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. *R. Bras. Zootec.* v.35, p. p.1129-1135, 2006.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 5117-5123, 2000.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; TRUJILLO-MESA, A.J.; VIDAL-CAROU, M.C. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 2471-2471, 2002a.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; TRUJILLO-MESA, A.J.; VIDAL-CAROU, M.C. Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressured milks. *J. Food Sci.*, v. 67, p. 2940-2944, 2002b.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M.C. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J. Food Sci.*, v. 68, p. 750-756, 2003.
- OLIVIERI, D.A. Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijos Mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*Bubalus bubalis*). Piracicaba: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2004, 61p. (Dissertação de Mestrado).

- OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UDAKA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermentes foods. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v. 61, p. 1582-1584, 1997.
- O RENDIMENTO na fabricação de queijos: Métodos para avaliação e comparação - Parte I. <http://www.cienciadoleite.com.br/?action=1&a=135&type=0>. Acesso em: 06 de novembro de 2010.
- PATTONO, D.; BOTTERO, M.T.; CIVERA, T.; GRASSI, M.A.; TURI, R.M. Presenza di amine biogene nei formaggi fusi e grattugiati. *Ind. Alimentari*, v. 39, p. 1403-1410, 2000.
- PEREIRA, A.R.; SILVA-PADRA, L.F.; MOLON, L.K.; MACHADO, P.F.; BARANCELLI, G. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I - gordura e proteína. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 36, p. 121-124, 1999.
- PEREIRA, C.I.; BARRETO CRESPO, M.T.; SAN ROMÃO, M.V. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 68, p. 211-216, 2001b.
- PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, v. 27, p. 293-300, 2004.
- PIZAIA, P.D.; SPADOTI, L.M.; NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J.R.F.; ROIG, S.M. Composição, proteólise, capacidade de derretimento e formação de "blisters" do queijo mussarela obtido pelos métodos tradicional e de ultrafiltração. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 23, p. 485-49, 2003.
- PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. *Mastitis: counter attack*. Naperville: Babson Bros. Co., 1991, 150p.
- PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade de leite I, Curitiba. Anais. Curitiba: Biblioteca da UFPR, p. 28-35, 1998.
- PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; MENDES, E.; OLIVEIRA, B.M.; FERREIRA, M. Effect of temperature on evolution of free amino acids and biogenic amines contents during storage of Azeitão cheese. *Food. Chem.*, v.75, p.287-291, 2001.
- PLOSZAJ, T.; RYNIOWICZ, Z.; MOTYL, T. Polyamines in goat's colostrum and milk. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 118B, p. 45-52, 1997.
- POLLACK, P.F.; KOLDOVSKY, O.; NISHIOKA, K. Polyamines in human and rat milk and in infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 56, p.371-375, 1992.

- PRADO, J.E.; PEREZ, J.L.; GOMES, R.; TARDAGUILA, J.; MARTINEZ, M.; SERRANO, C.E. Review: physico-chemical quality of Manchego cheese. *Alimentaria*, v.281, p.81-82, 1996.
- PROESTOS, C.; PAUL, L.; KOMAITIS, M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumm dansylation and fluorimetric detection. *Food Chem.*, v. 106, p. 1218-1224, 2008.
- RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on kappa-casein. *J. Dairy Res.*, v. 67, p. 625-630, 2000.
- REDDY, L.V.A.; WEE, Y.J.; YUN, J.S.; RYU, H.W. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol.*, v.99, p. 2242–2249, 2008.
- REUVERS, T.B.A.; MARTIN DEPOZUELO, M.; RAMOS, M.; JIMENEZ, R. A rapid ion-pair HPLC procedure for the determination of tyramine in dairy products. *J. Food Sci.*, v.51, p.84-86, 1986.
- RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF, Jr.W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. *R. Bras. Agrociência*. v. 9, p. 287-290, 2003.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 2ª ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2009.
- ROIG-SAGUÉS, A.X.; MOLINA, A.P.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 215, p. 96-100, 2002.
- RUEGG, P.L. Relationship between bulk tank milk somatic cell count and antibiotic residues. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings: National Mastitis Council, p. 28-35, 2005.
- SANGUANSEMSRI, J.; GYÖRGY, P.; ZILLIKEN, F. Polyamines in human and cow's milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, p. 859-865, 1974.
- SANTOS, M.V. Efeito da mastite sobre a qualidade de leite e derivados lácteos. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, 2., Ribeirão Preto, 2002. Anais: São Paulo: Instituto Fernando Costa, p.179-188, 2002.

- SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 2491-2503, 2003a.
- SANTOS, M.V.; MA, Y.; CAPLAN, Z.; BARBANO, D.M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 1601-1607, 2003b.
- SANTOS, W.C.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; GLORIA, 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 Chem.*, v.81, p. 595-606, 2003c.
- SATO, H.; SAKAMURA, S.; OBATA, Y. The isolation and characterization of N-methyltyramine and hordenine from sawa miller seeds. *Agr. Biol. Chem.*, v. 34, p.1254-1255, 1970.
- SIQUEIRA, I.M.C. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de quatro tipos de soro de queijo. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia – UFMG, 2000, 104p. (Dissertação de Mestrado).
- SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.E.; GONZALEZ, R.N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.*, v. 34, p.579-596, 2003.
- SEILER, N. Polyamine Metabolism. *Digestion*, v. 46, p.319-330, 1990.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, v. 29, p. 675-690, 1996.
- SHELDRAKE, R.F.; HOARE, R.J.T.; MCGREGOR, G.D. Lactation stage, parity, and infection affecting somatic cells, electrical conductivity, and serum albumin in milk. *J. Dairy Sci.*, v. 66, p. 542-547, 1983.
- SHUSTER, D.E.; HARMON, R.J.; JACKSON, J.A.; HEMKEN, E.W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 3763-3774, 1991.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 29, p. 213-231, 1996.
- SILVA-PADRA, L.P.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRIÉS, G.A. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. São Paulo*, v. 37, p. 330-333, 2000.
- SILVA, P.H.F.; PINHEIRO, A.J.R.; GOMES, J.C.; PARREIRAS, J.F.M.; MOSQUIM, M.C.A.V.; FURTADO, M.M. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. *Rev. ILCT*, v. 50, p.15-29, 1995.

- SILVA, T.M. Otimização e validação de metodologia para determinação de histamina em pescado. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2008a. 179p. (Dissertação de Mestrado).
- SILVA, F.F. Qualidade do leite materno em banco de leite humano: aspectos bacteriológicos, físico-químicos e perfil de amins bioativas. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2008b. 78p. (Dissertação de Mestrado).
- SILVEIRA, T.M.L.; FONSECA, L.M.; CANÇADO, S.V.; FERRAZ, V. Comparação entre os métodos de referência e a análise eletrônica na determinação da composição do leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet.*, v. 56, p. 782-787, 2004.
- SMITH, T.A. Amines in food. *Food Chem.*, v. 6, p. 169-200, 1980-81.
- SMITH, T.A. Putrescine and inorganic ions. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v. 18, p. 6-54, 1984.
- SOMERS, J.; O'BRIEN, B.; MEANEY, W.; KELLY, A.L. Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. *J. Dairy Res.*, v. 70, p. 45-50, 2003.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends Food Sci Tech*, v. 8, p. 35-41, 1997.
- SOUZA, G.N.; SILVA, M.R.; SOBRINHO, F.S.; COELHO, R.O.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, p. 830-834, 2005.
- SOUZA, T.C. Produção in vitro e in vivo de poliaminas por *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 em camundongos gnotobióticos. Belo Horizonte. Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, 2008, 87p. (Dissertação de Mestrado).
- SOUZA, G.N.Ç BRITO, M.A.V.P; LANGE, C.C.; FARIA, C.G.; MORAES, L.C.D.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na região sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, janeiro/2007 a junho/2008. <http://www.terraviva.com.br/clique/IIIcbql.pdf>. Acesso em: 15 de novembro de 2010.
- STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Protect.*, v. 54, p. 460-470, 1991.
- TAKLE, H.W.; MOERKOERE, T. Spermine enhancement of food shelf life. WO 147214. 04 dez. 2008. 20p.
- TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. Genebra, World Health Organization, p. 1-45, 1985.

- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. Crit. Rev. Toxicol., v. 17, p.91-128, 1986.
- TAMIM, N.M.; BENNETT, L.W.; SHELLEM, T.A.; DOERR, J.A. High-performance liquid chromatography determination of biogenic amines in poultry carcasses. J. Agric. Food Chem., v. 50, p. 5012-5015, 2002.
- TEIXEIRA, N.M.; FREITAS, A.F.; BARRA, R.B. Influência de fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somática do leite em rebanhos do estado de Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 55, p. 491-499, 2003.
- VALE, S.R.; GLORIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. J. AOAC Int., v. 80, p. 1006-1012, 1997.
- VALE, S.; GLORIA, M.B.A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. Food Chem., v. 63, p. 343-348, 1998.
- VALSAMAKI, K.; MICHAELIDOU, A.; POLYCHRONIADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. Food Chem., v. 71, p.259-26, 2000.
- VERDI, R.J.; BARBANO, D.M. Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases. J. Dairy Sci., v.71, 534-538, 1988.
- VERRUMA-BERNARDI, M.R.; DAMÁSIO, M.H.; VALLE, J.L.E.; OLIVEIRA, A.J. Elaboração de queijo Mozzarella de leite de Búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. Ciênc. Tecnol. Aliment., v.20, p.138-144, 2000.
- VIANNA, P.C.B.; MAZAL, G.; SANTOS, M.V.; BOLINI, J.M.A.; GIGANTE, M.L. Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. J. Dairy Sci., v.91, 1743-1750, 2008.
- VIDAL-CAROU, M.C.; LAHOZ-PORTOLE'S, F.; BOVER-CID, S.; MARINE´-FONT, A. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. J. Chromatogr. A, v. 998, p. 235-241, 2003.
- VOIGT, M.N.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E.; HAMDY, M.K. Tyramine, histamine and tryptamine content of cheese. J. Milk Food Technol., v.37, p.377-381, 1974.
- WELLNITZ, O.; DOHERR, M.G.; WOLOSZYN, M.W.; BRUCKMAIER, R.M. Prediction of total quarter milk somatic cell counts based on foremilk sampling. J. Dairy Res., v. 76, p. 326-330, 2009.
- WHIST, A.C.; ØSTERA, O.; SØLVERØD, L. Association between isolation of *Staphylococcus aureus* one week after calving and milk yield, somatic cell count,

- clinical mastitis, and culling through the remaining lactation. *J. Dairy Res.*, v. 76, p.24-35, 2009.
- WICKSTRÖM, E.; PERSSON-WALLER, K.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ÖSTENSSON, K.; STERNESJÖ, A. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. *J. Dairy Res.*, v. 76, p.195-201, 2009.
- WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Revista Boletim do Leite*, v.51, p. 1-8, 1983.
- WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em queijo Minas Frescal. *Rev. ILCT*, p. 261-266, 1989.
- ZACHOS, T.; POLITIS, I.; GOREWIT, R.C.; BARBANO, D. Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cell. *J. Dairy Res.*, v. 59, p.461-467, 1992.