

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal
Área de concentração de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

**Aminas bioativas e aminoácidos como índice de
qualidade dos leites fermentados**

NAIARA MEIRELES CIRÍACO

Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária da UFMG
2018

Naiara Meireles Ciríaco

Aminas bioativas e aminoácidos como índice de qualidade dos leites fermentados

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciência Animal área de concentração Tecnologia de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

Belo Horizonte, MG
Escola de Veterinária da UFMG
2018

C578n Ciriaco, Naiara Meireles, 1984-
Aminas bioativas e aminoácidos como índice de qualidade dos leites fermentados / Naiara Meireles Ciriaco. – 2018.
44 p. : il.

Orientadora: Maria Beatriz Abreu Glória
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leite fermentado – Qualidade – Teses. 2. Leite fermentado – Análise – Teses. 3. Aminas biogênicas – Teses. 3. Aminoácidos – Teses. I. Glória, Maria Beatriz Abreu. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

NAIARA MEIRELES CIRÍACO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

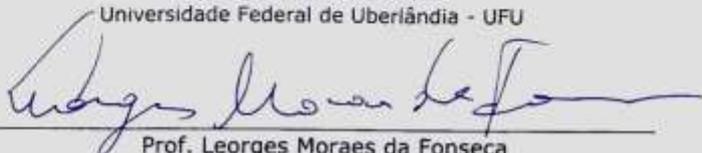
Aprovada em 30 de Maio de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof^ª. Maria Beatriz Abreu Glória
Presidente - Orientador



Prof^ª. Letícia Rocha Guidi
Universidade Federal de Uberlândia - UFU



Prof. Leorges Moraes da Fonseca
Escola de Veterinária - UFMG



*Dedico este trabalho
aos meus pais
pelo carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me educarem e me ensinarem a ser determinada na minha jornada de vida;

Ao meu irmão, Vinícius, pelo carinho e paciência;

Ao André pelo incentivo e por acreditar nos meus sonhos, por me fazer acreditar que daria conta, pela paciência;

À minha família que procurou estarem ao meu lado, mesmo os distantes, ajudando-me a superar os obstáculos encontrados neste desafio profissional;

À minha Orientadora, Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória que disponibilizou o seu tempo para me ajudar a construir este conhecimento, pelas palavras de incentivo, pela dedicação e toda orientação;

A Valterney por me explicar a tão complexa estatística, por me ensinar a valorizar o trabalho em grupo, por me inspirar a ser perseverante;

Aos colegas do LBqA, que compartilharam comigo ensinamentos, todas as conversas e por tornar o laboratório um ambiente agradável; Gisela e Guilherme que me ajudaram muito com as aminas, Douglas e Bárbara que acompanharam de perto os passos e sucessos deste trabalho;

À Edinéia, pelos ensinamentos no laboratório, pela companhia nos almoços e pelas conversas;

Ao meu amigo Diogo César por entender todo o meu processo, por me ouvir, pelo incentivo;

Ao meu amigo Leandro Caxito, por ter paciência comigo em todos os momentos ausentes e pelo incentivo;

À Dra. Shaira Leite, por me fazer entender meus objetivos, por esclarecer minhas dúvidas; por me fazer traçar o meu caminho, por me trazer ao rumo de novo;

Por fim agradeço a todos que estiveram ao meu lado.

SUMÁRIO

	RESUMO	1
	ABSTRACT	2
1	INTRODUÇÃO	3
2	OBJETIVOS	4
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	Leites fermentados	4
3.1.1	<i>Histórico</i>	4
3.1.2	<i>Definição e características físico-química (Padrão de Identidade e Qualidade) ...</i>	4
3.1.3	<i>Produção</i>	5
3.1.4	<i>Benefícios à saúde dos consumidores</i>	6
3.1.5	<i>Mercado</i>	6
3.2	Aminas bioativas	7
3.2.1	<i>Definição e classificação</i>	7
3.2.2	<i>Função</i>	8
3.2.3	<i>Formação das aminas bioativas</i>	9
3.2.4	<i>Metabolismo</i>	9
3.2.5	<i>Efeitos adversos à saúde</i>	10
3.2.6	<i>Aminas bioativas como índice de qualidade</i>	11
3.2.7	<i>Ocorrência nos leites fermentados</i>	11
3.3	Aminoácidos	11
3.3.1	<i>Definição e classificação</i>	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	Material	13
4.1.1	<i>Amostras</i>	13
4.1.2	<i>Reagentes, solventes e padrões de aminas e aminoácidos</i>	13
4.2	Métodos	13
4.2.1	<i>Delineamento experimental</i>	13
4.2.2	<i>Métodos de análise</i>	14
4.2.2.1	<i>Avaliação dos rótulos</i>	14
4.2.2.2	<i>Avaliação das características físico-químicas</i>	14
4.2.2.2.1	<i>Acidez titulável</i>	14
4.2.2.2.2	<i>pH</i>	14
4.2.2.2.3	<i>Sólidos totais</i>	14
4.2.2.3	<i>Determinação dos teores de aminoácidos e aminas bioativas</i>	14

4.2.2.3.1	<i>Preparo das amostras</i>	14
4.2.2.3.2	<i>Determinação do perfil e teores de aminoácidos e aminos bioativas</i>	15
4.3	Análise estatística	16
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1	<i>Caracterização dos leites fermentados</i>	16
5.1.1	<i>Avaliação dos rótulos</i>	16
5.1.2	<i>Características físico-químicas dos leites fermentados</i>	18
5.1.3	<i>Tipos e teores de aminoácidos nos leites fermentados</i>	19
5.1.4	<i>Teores de aminos bioativas nos leites fermentados</i>	21
5.2	<i>Influência do prazo de validade nos leites fermentados</i>	22
5.2.1	<i>Influência do prazo de validade nas características físico-químicas</i>	22
5.2.2	<i>Influência do prazo de validade nos teores de aminoácidos</i>	23
5.2.3	<i>Influência do prazo de validade nos teores de aminos</i>	24
5.3	<i>Análise multivariada de leites fermentados</i>	27
5.4	<i>Proposta de parâmetros de identidade e qualidade de leites fermentado</i>	28
6	CONCLUSÃO	28
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE TABELAS

1	Padrão de identidade e qualidade e requisitos físico-químicos de leites fermentados	5
2	Funções metabólicas e fisiológicas de amins bioativas	8
3	Características dos rótulos de diferentes tipos de leite fermentado obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	17
4	Valores médios desvios padrão, faixas de variação do pH, acidez e sólidos totais de diferer obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	18
5	Teores médios, desvios padrão, faixas de variação de aminoácidos de diferentes tipos de leite fermentado obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	20
6	Teores médios, desvios padrão faixa de variação dos teores de amins bioativas de diferentes tipos de leite fermentado obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	21
7	Valores médios, desvios padrão, faixas de variação do pH de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	22
8	Teores médios taxa de variação desvio padrão da acidez (g de ácido láctico/100 g) de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	23
9	Teores médios, taxa de variação desvio padrão, taxa de variação dos sólidos totais de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	23
10	Teores médios, taxa de variação desvios padrão de aminoácidos de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtido no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	25
11	Teores médios, desvios padrão, (mínimo-máximo) de amins bioativas de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtido no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG	26

LISTA DE FIGURAS

1	Fluxograma do processo de fabricação de leites fermentados	6
2	Estrutura química de algumas aminos bioativas	8
3	Estrutura química dos aminoácidos essenciais	9
4	Estrutura química dos aminoácidos essenciais (a) e não essenciais (b)	12
5	Sequência utilizada na extração de aminos bioativas e aminoácidos para quantificação por UPLC-UV	15
6	Contribuição de cada aminoácido ao teor total em diferentes tipos de leite fermentado	21
7	Projeção das variáveis analisadas nos leites fermentados antes e após a validade por Análise de Componentes Principais (ACP)	22
8	Projeção em <i>loadings</i> do PC1 nos leites fermentados antes e após a validade por Análise de Componentes Principais (APC)	23
9	Projeção em <i>loadings</i> PC2 nos leites fermentados antes e após a validade por Análise de Componentes Principais (APC)	2 3

LISTA DE ABREVIATURAS

AQC	Carbamato de aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidila
BAL	Bactéria Ácido Lática
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
IMAO	Inibidores de Monoamina Oxidase
LBqA	Laboratório de Bioquímica de Alimentos
RNA	Ribonucleic Acid
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
p.a.	Puro para Análise
PCA	Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
SAC	Serviço de Atendimento ao Consumidor

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar o potencial de aminoácidos e aminas bioativas como índice de qualidade de leite fermentado. Os aminoácidos e as aminas foram quantificados por cromatografia líquida de ultra eficiência. Também foram determinados o pH, a acidez total e os sólidos totais. Os leites fermentados, durante a validade, apresentaram pH de 4,03 a 4,06, teor de sólidos totais de 7,37 a 12,0 g/100 g e acidez de 0,82 a 1,00 g/100 g de ácido láctico. As amostras continham 3, 8 ou 11 aminoácidos. Todos os leites fermentados tinham asparagina e arginina; alanina, histidina, isoleucina, prolina, tirosina, treonina e valina foram detectadas em três tipos; fenilalanina estava presente em dois tipos e leucina, lisina e ácido aspártico estavam presentes em um tipo de leite fermentado. Os teores totais de aminoácidos variaram de 4,2 a 17,8 mg/kg. Apenas a espermina foi detectada em todos os tipos de amostra, em teores similares (0,67 a 0,80 mg/kg). Depois de ultrapassado o prazo de validade, não houve diferença significativa no pH, acidez total e sólidos solúveis. Houve variação no perfil e teores de aminoácidos e aminas (exceto dois tipos), com um aumento nos tipos de aminoácidos encontrados (1 a 3 aminoácidos) e serotonina e agmatina foram detectadas. Os resultados foram submetidos a análise de componentes principais, não havendo um parâmetro capaz de diferenciar todos os tipos de leite fermentado.

Palavras-chave: poliaminas, aminas biogênicas, fermentação, qualidade.

ABSTRACT

Bioactive amines and amino acids as quality criteria of fermented milk. The objective of this study was to investigate the potential use of amino acids and bioactive amines as an index of quality of fermented milk. The amino acid and amines were quantified by ultra efficient liquid chromatography. pH, total acidity and total solids were also analyzed. Within shelf life, fermented milk had pH of 4.03-4.06, total solids of 7.37 to 12.0 g/100 g and acidity of 0.82 to 1.00 g/100 g lactic acid. The samples had 3, 8 or 11 amino acids. All of them had asparagine and arginine; alanine, histidine, isoleucine, proline, tyrosine, threonine and valine were detected in three of them; phenylalanine was present in two and leucine, lysine and aspartic acid were present in one type of fermented milk. Total amino acids varied from 4.2 to 17.8 mg/kg. Spermine was the only amine detected in all fermented milk, at similar levels (0.67 to 0.80 mg/kg). As the shelf life expired, there was no significant difference on pH, total acidity and soluble solids. There was significant change on the types (1 to 3) and levels of some amino acids (except in two types of fermented milk). The levels of spermine increased and serotonin and agmatine were detected. The results were subjected to principal component analysis, and it was not possible to differentiate expired from good shelf life fermented milk.

Keywords: polyamines, biogenic amines, fermentation, quality.

1. INTRODUÇÃO

Os leites fermentados são um dos poucos alimentos conhecidos e consumidos a mais de 4.500 anos. A Bulgária foi um dos primeiros países a consumi-lo, e o divulgou para o restante do mundo.

Com o passar dos anos os leites fermentados foram ganhando espaço no dia a dia, passando a fazer parte dos hábitos alimentares de muitas pessoas (RIBEIRO et al., 2010). A produção brasileira gera em torno de 400 mil toneladas por ano, representando 76% do total dos produtos lácteos (MILKPOINT, 2016). Atualmente, o consumidor brasileiro encontra à sua disposição nos mercados grande variedade de leites fermentados.

Com o mercado de alimentos e bebidas prontos para o consumo em expansão, incluindo o novo perfil da população, mais mulheres no mercado de trabalho, observa-se um aumento significativo na procura por estes tipos de produtos. Porém, os consumidores querem adquirir produtos que não apenas saciem a fome e a sede, mas que ofereçam vantagens nutricionais, segurança alimentar e de qualidade. Com isso os produtos lácteos, dentre eles os leites fermentados, começam a ganhar mais mercado, recebendo atenção especial das indústrias de alimentos e estão sendo cada vez mais procurados por uma gama de consumidores de todas as idades, gêneros e classes socioeconômicas (MILKPOINT, 2016).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 46, de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), leite fermentado é o produto adicionado ou não de substâncias alimentícias, quando obtidos pela coagulação e pela diminuição do pH do leite, ou reconstituído, sendo adicionado ou não de produtos lácteos, pela fermentação láctica mediante ação e cultivos de micro-organismos específicos, sendo estes variáveis, ativos e abundantes no produto final durante o seu prazo de validade. Para sua produção, deve-se utilizar a associação das culturas *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, podendo ser acompanhadas por outras bactérias lácticas como *Lactobacillus acidophilus* ou cultivos do gênero *Bifidobacterium*. São escassas as informações sobre padrões de qualidade dos leites fermentados. Inclusive, não estão disponíveis parâmetros que possam ser utilizados como índice de qualidade. Na legislação brasileira só há menção sobre matéria gorda láctea, acidez e proteínas lácteas do produto (BRASIL, 2007).

Aminas bioativas e seus precursores têm sido utilizados como índice de qualidade de alguns produtos alimentícios (queijos, peixes, cerveja, embutidos cárneos). Alguns compostos estão naturalmente presentes em alimentos, entretanto, pode haver produção e um acúmulo de outros durante o processo fermentativo ou quando as condições higiênico-sanitárias forem inadequadas (GLORIA, 2006; FERNANDES et al., 2013; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014). Ainda, algumas aminas apresentam propriedades funcionais relevantes para a manutenção da saúde humana. Dentre estas, destacam-se as poliaminas espermina e espermidina que são fatores de crescimento, são importantes na maturação e regeneração da mucosa intestinal (GLORIA, 2006). Por outro lado, algumas aminas, apesar da relevância em nível fisiológico, são passíveis de provocar intoxicações alimentares, quando presentes em quantidades elevadas, como a histamina e a tiramina (EFSA, 2011). Aos efeitos prejudiciais que podem desencadear na saúde dos consumidores, somam-se também outros efeitos contraproducentes que afetam as características organolépticas dos alimentos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de utilização de aminoácidos livres e aminas bioativas como índice de qualidade de leites fermentados disponíveis no mercado consumidor.

Os objetivos específicos foram (i) caracterizar diferentes tipos de leite fermentado quanto às informações contidas nos rótulos; (ii) avaliar as características físico-químicas pH, acidez e sólidos solúveis totais nas amostras ao longo da vida de prateleira; (iii) avaliar o perfil de aminoácidos e aminas bioativas nas amostras ao longo da vida de prateleira; (iv) avaliar as alterações nestes parâmetros dentro e fora da validade das amostras; (v) investigar a possibilidade de usar aminoácidos e aminas bioativas como índice de qualidade de leite fermentado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Leites fermentados

3.1.1. Histórico

Não existe uma exatidão de quando surgiu o leite fermentado. Alguns pesquisadores descrevem que pode ter surgido ainda na antiguidade pelos povos orientais, tendo sido introduzido nos países ocidentais no início do século. COSTA et al. (2013), relata que, entre 5.000 a 3.500 anos a.C., os pastores se alimentavam com o leite de animais domesticados que era armazenado em marmidas de barro. O leite ficava exposto às altas temperaturas do deserto, condições ideais para que o leite fermentasse, surgindo um rudimentar leite fermentado. Existe ainda outra teoria de que o leite fermentado teve sua origem na Turquia, onde o leite fresco era guardado em sacos feitos de pele de cabra e transportados por camelos. Os sacos em contato com o calor do corpo do animal favoreciam a multiplicação de bactérias ácidas as quais modificavam a estrutura daquele alimento, tornando-o sensorialmente atrativo, além de ser uma forma de conservação do leite (CARNEIRO et al., 2012; COSTA et al., 2013).

No início do século XX, pesquisadores do Instituto Pasteur, apresentaram as primeiras explicações sobre os efeitos benéficos das bactérias ácido lácticas presentes neste derivado lácteo (CARNEIRO et al., 2012). Relatos de HUERTAS (2012) sugerem que os povos Balcãs, pelo alto consumo dos produtos fermentados à base de leite, tinham expectativa de vida aumentada oriunda dos efeitos benéficos das bactérias lácticas presentes nos leites fermentados. Ainda segundo estes autores, as bactérias ácido-láticas são capazes de reduzir as toxinas normalmente produzidas pelas bactérias presentes no intestino.

Atualmente, a popularidade do leite fermentado vem aumentando consideravelmente, principalmente pelos benefícios para o consumo humano. Essas mudanças conquistaram os consumidores que estão incluindo cada vez mais o leite fermentado na dieta, não apenas por suas funções dietéticas, mas por ser um alimento rápido e prático, e também por suas qualidades organolépticas, nutricionais e funcionais (FERREIRA & FORTES, 2012).

3.1.2. Definição e características físico-química (Padrão de Identidade e Qualidade)

Leites fermentados são obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionados ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante

ação de cultivos de micro-organismos específicos, os quais devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade (BRASIL, 2007). Ainda segundo a legislação brasileira (Brasil, 2007), o tipo de micro-organismo adicionado ao produto lácteo define a sua denominação, podendo ser iogurte, leite fermentado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada.

Os leites fermentados ou cultivados são produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios. A fermentação é realizada com um ou vários dos cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*, e/ou outras bactérias ácido lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007). Este tipo de fermentação tende a aumentar o prazo de validade do leite e, conseqüentemente, inibe o crescimento de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes. Outras substâncias também são formadas no processo de fermentação, conferindo aos produtos características sensoriais desejáveis (CARNEIRO et al., 2012).

A produção e a comercialização dos leites fermentados são regulamentadas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ), e devem seguir alguns padrões de qualidade e composição (BRASIL, 2007). Os requisitos físico-químicos estão representados na Tabela 1, com destaque para o “leite cultivado ou leite fermentado” (BRASIL, 2007). Observa-se que os parâmetros considerados são matéria gorda láctea (g/100 g), acidez em ácido láctico (g de ácido láctico/100 g) e proteínas lácteas (g/100 g).

Tabela 1. Padrão de identidade e qualidade e requisitos físico-químicos de leites fermentados

Matéria gorda láctea (g/100g) Norma FIL 116 A:1987				Acidez (g de ácido láctico/100g) Norma FIL 150:1991	Proteínas lácteas (g/100g)
Com creme	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado		
Min. 6,0	3,0 a 5,9	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	0,6 a 2,0	Min. 2,9

BRASIL (2007).

3.1.3. Produção

Os leites fermentados são produzidos através da atividade da acidificação de bactérias ácido-lácticas que são inoculadas em leite esterilizado ou pasteurizado. A sobrevivência dos micro-organismos, durante o período de estocagem, é um fator importante para assegurar benefícios à saúde do consumidor (COSTA et al., 2013).

Nos mercados nacional e internacional existem diferentes marcas comerciais de leites fermentados, porém, esses apresentam fases similares de produção, seja na padronização dos teores de gordura, homogeneização do produto e até mesmo tratamento térmico a que são submetidos (Figura 1).

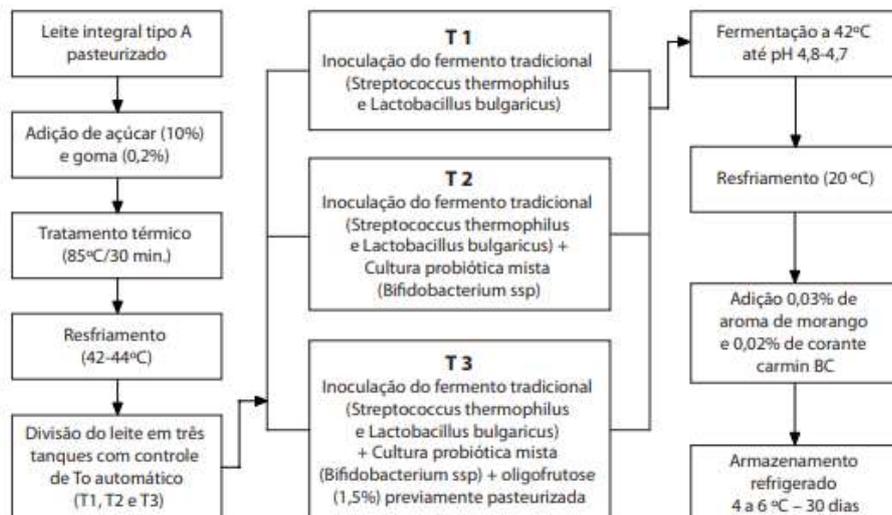


Figura 1. Fluxograma do processo de fabricação de leites fermentados (GALLINAA et al., 2011).

3.1.4. Benefícios à saúde dos consumidores

Nos últimos anos, a população vem se preocupando cada vez mais com a qualidade de vida, o que justifica a maior procura por exercícios físicos, e pelo consumo de alimentos mais saudáveis, nutritivos, com menores teores de açúcar, sal e gordura e com maior praticidade (MEDEIROS et al., 2011; GOMES et al., 2014). Esta tendência motivou novos estudos sobre os produtos lácteos e um maior desenvolvimento na tecnologia de leites fermentados (MEDEIROS et al., 2011).

Dentre as propriedades funcionais atribuídas, destaca-se que o leite fermentado facilita a ação das enzimas digestivas, facilita a absorção de cálcio, fósforo e ferro, além de ser fonte de galactose – importante na síntese de tecidos nervosos e cerebrosídeos em crianças, além de ser uma forma indireta de se consumir leite (GOMES et al., 2014).

A sociedade está cada vez mais consciente da importância de ter uma dieta saudável, logo, qualquer questão relacionada com a segurança dos alimentos impacta consideravelmente o comportamento do consumidor e dos órgãos de fiscalização. Ao mesmo tempo, os consumidores selecionam cada vez mais os produtos de alta qualidade que são minimamente processados e seguros. Uma gama de tecnologias tradicionais ou emergentes é aplicada aos alimentos com a finalidade de realçar características sensoriais dos produtos (GOMES et al., 2014).

3.1.5. Mercado

No final de 2014, o consumo de lácteos no Brasil chegou a 174 litros per capita. Entre 2005 e 2010, a taxa de crescimento anual foi de 3,7% e entre 2010 e 2015, ficou em 1,9% (MILKPOINT, 2015).

Entre janeiro e novembro do ano de 2016, o déficit da balança brasileira de lácteos ficou em US\$ 436 milhões, três vezes mais do que o saldo negativo registrado em todo o ano de 2015. O volume importado no mesmo período (janeiro a novembro de 2015) teve alta significativa. Tudo isso em decorrência, sobretudo, da menor oferta de leite no mercado interno (MILKPOINT, 2016).

O mercado lácteo brasileiro está em evolução e é de alto potencial para ser cuidadosamente considerado para o mercado global do leite. Por outro lado, não é por acaso que as maiores empresas leiteiras do mundo estão presentes na América Latina (MILKPOINT, 2017).

3.2. Aminas bioativas

3.2.1. Definição e classificação

As aminas biologicamente ativas ou aminas bioativas são bases orgânicas de baixa massa molecular que expressam alta atividade biológica. Elas são formadas durante os processos metabólicos e tem inúmeras funções metabólicas e fisiológicas importantes no organismo de todos os seres vivos. As aminas bioativas são conhecidas há séculos e ainda despertam interesse nas pesquisas em alimentos, na biomedicina e nos estudos ambientais (FERNANDES et al., 2013; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014).

MOHAMMED et al. (2016) descrevem que as aminas biogênicas podem ser produzidas durante o armazenamento ou processamento dos produtos pela descarboxilação térmica, enzimática ou bacteriana de aminoácidos livres pelos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Lactobacillus* como *Lactobacillus*, *Lactobacillus* em queijo, *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus*.

As aminas bioativas podem ser classificadas de acordo com o número de grupamento amina, estrutura química (Figura 2), funções fisiológicas que exercem e de acordo com a sua biossíntese. Considerando a via biossintética, as aminas bioativas podem ser classificadas como naturais (sintetizadas a partir de precursores) ou biogênicas (formadas a partir da descarboxilação de aminoácidos livres na matriz devido a ação de enzimas descarboxilases de origem microbiana). Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, as aminas biogênicas são classificadas como monoaminas (formado por um grupo de aminas dentre elas a tiramina e feniletilamina), diaminas (formada por dois grupos de aminas, histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (formadas por mais de dois grupamentos aminas, espermidina, espermina e agmatina) (GLORIA, 2006). Quanto as suas estruturas químicas, as aminas podem ser classificadas como alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiraminas e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina e triptamina) (CARDOZO et al., 2013; MOHAMMED et al., 2016).

De acordo com a atividade fisiológica, as aminas biogênicas também são classificadas em aminas biogênicas (com função neuroativas ou vasoativas) ou poliaminas (associadas a crescimento e renovação celular) (UBALDO et al., 2015; MOHAMMED et al., 2016). Com relação a função exercida pelas aminas bioativas, elas são classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento (espermidina e espermina), onde atuam 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 (CARDOZO et al., 2013; MOHAMMED et al., 2016). Abaixo (figura 2), apresentam-se estruturas químicas de algumas aminas bioativas (GLORIA, 2006).

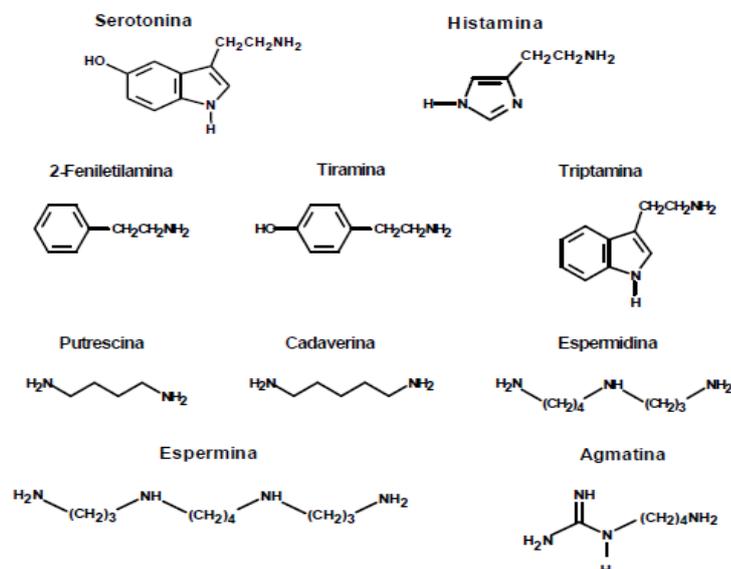


Figura 2. Estrutura química de algumas aminas bioativas (GLORIA, 2006).

3.2.2. Função

Alguns estudos com micro-organismos, animais e plantas demonstram a importância das aminas bioativas no metabolismo. As aminas atuam como reserva de nitrogênio e são descritas também como 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 (GLORIA, 2006; UBALDO et al., 2015). Na Tabela 2 estão descritas, de forma resumida, as funções metabólicas e fisiológicas das aminas bioativas.

Tabela 2. Funções metabólicas e fisiológicas de aminas bioativas

Aminas Bioativas	Funções
Espemidina e Espermina	Estimulação e regulação da síntese de DNA, RNA e proteínas Manutenção da alta atividade metabólica de um intestino saudável
Putrescina e Cadaverina	Precusores de radicais livres
Histamina	Efeito hipotensivo Psicoativa
Serotonina	Vaso e broncodilatador Neurotransmissor
Tiramina, Triptamina e Feniletilamina	Precusores de compostos com significância biológica

(adaptado de GLORIA, 2006).

3.2.3. Formação das aminas bioativas

As aminas biogênicas podem ser formadas por hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos, sendo a última a principal via de formação (GLORIA & VIEIRA, 2007). A descarboxilação dos aminoácidos pode ocorrer por duas vias biossintéticas, por ação de ação de enzimas descarboxilases endógenas presentes nos alimentos ou por meio de descarboxilases de origem microbiana, associadas a microbiota natural (GLORIA & VIEIRA, 2007). Ainda segundo GLORIA e VIEIRA (2007), as condições necessárias para a síntese dessas aminas, pode-se citar disponibilidade de aminoácidos livres, condições favoráveis ao crescimento microbiano e atividade da descarboxilase.

A síntese das aminas biogênicas histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina, se dá para descarboxilação dos aminoácidos precursores histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina e lisina, respectivamente (Figura 3) (Gloria, 2006).

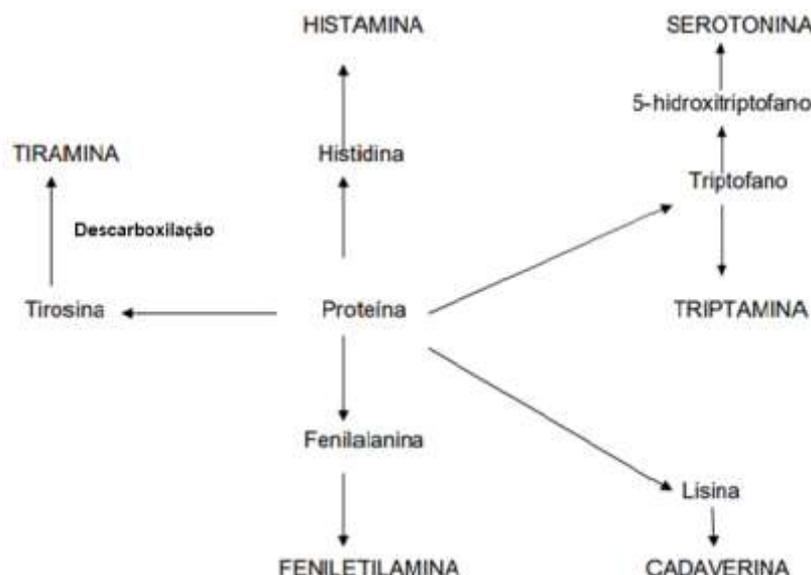


Figura 3. Vias metabólicas de algumas aminas bioativas (LIMA & GLORIA, 1999)

3.2.4. Metabolismo

As aminas bioativas participam do metabolismo normal dos animais, plantas e micro-organismos. Vários fatores exercem influência sobre a sua formação, dentre eles, a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de micro-organismos com atividade descarboxilase de aminoácidos; condições ideais para o crescimento desses micro-organismos; e ainda a produção de enzimas descarboxilantes (GLORIA, 2006; SILVA et al., 2013).

As enzimas descarboxilantes de amino ácidos responsáveis pela síntese destas aminas biogênicas em alimentos são principalmente de origem bacteriana e frequentemente induzidas por determinadas condições ambientais, como por exemplo, pH desfavorável ao crescimento microbiano. Em situação de estresse ácido, a descarboxilação aumenta, incrementando o consumo de prótons com liberação de CO₂ e síntese de amina. As aminas formadas, com o objetivo de que ocorra o aumento do pH, fazendo com que a célula permaneça nesse ambiente

(GLORIA, 2006; SILVA et al., 2013; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014; COSTA et al., 2015; UBALDO et al., 2015). O conhecimento e controle dessas bactérias durante o processamento são essenciais em termos de qualidade microbiológica, características sensoriais e de segurança alimentar, desta forma as amins bioativas são consideradas como um marcador do nível de contaminação microbiológica nos alimentos, o que justifica a necessidade de se monitorar os seus níveis nos alimentos (SILVA et al., 2013; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014; MOHAMMED et al., 2016).

Os principais pré-requisitos para a formação das amins bioativas são: a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de micro-organismos, condições ideais para o seu crescimento (temperatura, pH) e ainda as condições que afetam a produção e atividade enzimática como o baixo pH (EFSA, 2011). A fermentação dos alimentos as condições de armazenamento e de distribuição são os principais fatores para o acúmulo de amins bioativas (EFSA, 2011).

Em humanos, as amins bioativas sintetizadas endogenamente cumprem funções metabólicas importantes no sistema nervoso e no controle da pressão arterial (MOHAMMED et al., 2016). Para que as amins bioativas caiam na circulação, o corpo humano possui um sistema de enzimas metabolizadoras, sendo que, a maior parte encontra-se no intestino, mas também está presente no fígado, pulmão, plaquetas, estômago, baço e rins. As enzimas mais importantes são monoamina oxidases A e B, diamina oxidase, fenolsulfotransferase M e histamina N-metiltransferase (SILVA et al., 2013; UBALDO et al., 2015; MOHAMMED et al., 2016).

3.2.5. Efeitos adversos à saúde

As amins bioativas nos alimentos geralmente não apresentam qualquer risco para a saúde dos indivíduos, a não ser que ocorra a ingestão excessiva ou o metabolismo natural para o seu catabolismo seja deficiente, ou ainda seja prejudicado por agentes farmacológicos, por exemplo os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) clássicos e de 3º geração (SILVA et al., 2013; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014; UBALDO et al., 2015).

O nível tóxico das amins bioativas depende das características individuais e da presença de outras amins nos alimentos (GEZGINC et al., 2012; CARDOZO et al., 2013). Depende também da existência de outros agentes potencializadores como disfunções gastrointestinais e a presença de outras amins (ONAL, 2007; CARDOZO et al., 2013).

A intoxicação mais frequente envolvendo as amins bioativas é a intoxicação histamínica, também conhecida por “intoxicação por escombroides” (CARDOZO et al., 2013; UBALDO et al., 2015). Concentrações elevadas de histamina em alimentos podem levar a episódios de intoxicação alimentar, caracterizado pela dificuldade de respirar, intenso prurido, erupção cutânea, vômito, febre, hipertensão e até choque anafilático (EFSA, 2011; CARDOZO et al., 2013; GOMES et al., 2014). A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos considera que o teor de histamina possivelmente causador de risco a saúde é igual a 50 mg/100 g sendo que para indivíduos sensíveis à histamina 0 mg/refeição já é suficiente para quadros de intoxicação e para indivíduos normais o nível de histamina tóxico é de 50 mg/refeição (EFSA, 2011; GOMES et al., 2014). Não são apenas os pescados que estão envolvidos nos quadros de intoxicação histamínica, os queijos também estão associados, dentre eles o tipo *cheddar*, *gouda*, *gruyere* e o suíço são os mais envolvidos. Concentrações de histamina em queijo já foram relatados em surtos com concentração de 850 a 1.870 mg/kg (EFSA, 2011).

A tiramina é o segundo tipo de amina bioativa envolvida em intoxicações alimentares, quando em concentrações elevadas, pode causar dores de cabeça e enxaqueca (EFSA, 2011). Ainda segundo EFSA (2011), 600 mg/refeição seria necessário para intoxicação de indivíduos que não fazem uso de medicamentos IMAO; 50 mg/refeição para indivíduos usando

medicamentos IMAO clássicos e 6 mg/refeição para indivíduos usando medicamentos IMAO de 3ª geração já causa intoxicação.

3.2.6. Aminas bioativas como índice de qualidade

As aminas, em alimentos, podem ser intrínsecas ao produto (naturais) ou serem formadas por micro-organismos adicionados, como no caso das culturas *starter*, ou contaminantes, introduzidos devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Por este motivo essas substâncias podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo as condições da matéria-prima, e também as condições higiênico-sanitárias durante a fabricação de certos produtos, sendo consideradas como indicadores da atividade microbiana indesejável. Altos níveis de aminas (putrescina e cadaverina) têm sido relacionados à deterioração de produtos alimentícios e/ou falhas na produção (COSTA et al., 2013; GALLINAA et al., 2013; SILVA et al., 2013; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014; LINARES et al., 2016; MOHAMMED et al., 2016). Além disso, as aminas bioativas são resistentes ao tratamento térmico aplicado no processamento de alimentos e têm sido consideradas boas indicadoras de frescor e decomposição de alimentos (SPANO et al., 2010; LINARES et al., 2016; MOHAMMED et al., 2016).

O controle dos teores de aminas bioativas pode ser útil durante a fabricação de leite fermentado, pois pode ser um indicador da qualidade da matéria-prima, das condições higiênico-sanitárias durante o processamento e da qualidade do produto final (GALLINAA et al., 2013; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014; MOHAMMED et al., 2016).

3.2.7. Ocorrência nos leites fermentados

Algumas aminas bioativas estão naturalmente presentes nos alimentos, outras aminas podem ser formadas durante a produção, processamento e armazenamento por micro-organismos adicionados ou contaminantes ou ainda por descarboxilação térmica (LADERO et al., 2010; ALVAREZ & ARRIBAS, 2014).

Altos teores de aminas biogênicas têm sido apontados como resultantes do processo de fermentação (embutidos fermentados, queijos e bebidas alcoólicas fermentadas) (LADERO, et al., 2010). Segundo EFSA (2011), os alimentos fermentados são os de maior preocupação em relação às intoxicações alimentares, devido à intensa atividade microbiana e consequente potencial de formação de aminas biogênicas. Entretanto, são escassos ou inexistentes dados sobre a presença de aminas em leites fermentados, o que demonstra a necessidade deste estudo.

3.3. Aminoácidos

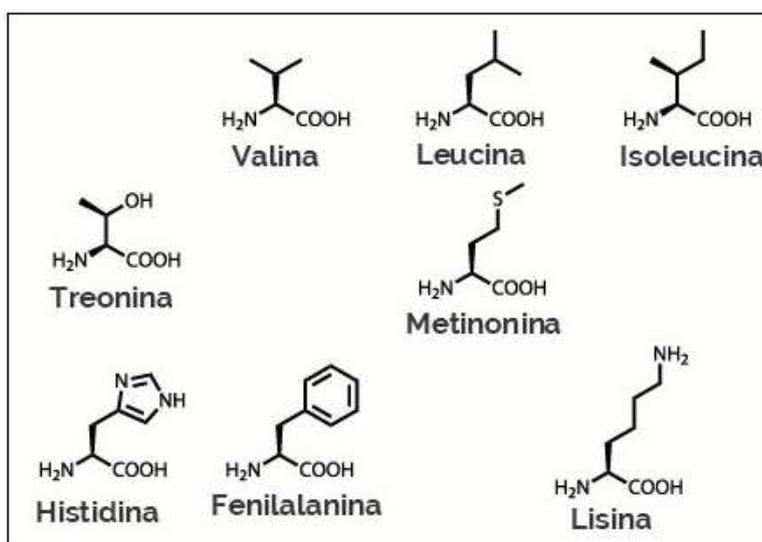
3.3.1 Definição e classificação

Os aminoácidos são compostos orgânicos formados por um grupo amino ($-\text{NH}_2$) associado a um grupo carboxila ($-\text{COOH}$). Eles diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais ou grupo R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica (TAVARES & VANNUCCHI, 2012).

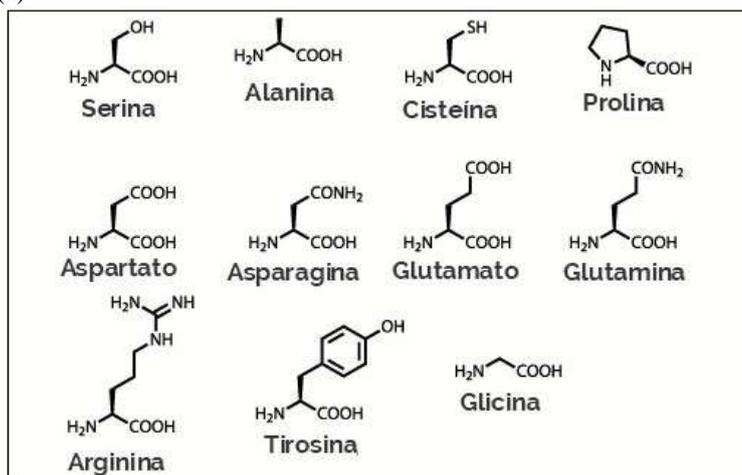
A principal função dos aminoácidos é atuar como subunidades de estruturação de moléculas proteicas. Dependendo da capacidade do organismo humano sintetizar endogenamente a quantidade de aminoácidos suficiente para suprir as necessidades metabólicas,

tem-se a sua classificação em aminoácidos essenciais (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e histidina- Figura 4 a) e não essenciais, como alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína, glicina, glutamina, hidroxiprolina, prolina, serina e tirosina (Figura 4 b) (NELSON & COX, 2014).

Os aminoácidos essenciais, ou indispensáveis são aqueles que o organismo não tem capacidade de sintetizar, logo, a única forma de obtê-los é através da ingestão de determinados alimentos, tais como carne, ovos, leite e seus derivados. Já os aminoácidos não essenciais, são aqueles que o nosso organismo consegue produzir, mais concretamente, que o nosso fígado sintetiza (ROGERO & TIRAPEGUI, 2008).



(a)



(b)

Figura 4. Estrutura química dos aminoácidos essenciais (a) e não essenciais (b) (adaptado NELSON & COX, 2014).

Os aminoácidos apresentam função nutritiva ou energética, as proteínas servem como fontes de aminoácidos, incluindo os essenciais requeridos pelo homem e outros animais, os aminoácidos livres podem ocorrer naturalmente em alimentos, mas também são liberados de proteínas, como resultado da atividade proteolítica ou degradação térmica. Os tecidos animais e vegetais possuem uma pequena porção do nitrogênio aminoacídico na forma livre, enquanto o restante está na forma proteica (SCHUMACHER et al.; 2012). Apesar de não apresentarem valor nutricional, os aminoácidos livres são considerados de extrema importância em relação à qualidade sensorial e tecnológica dos produtos, assim como do ponto de vista da autenticidade da matéria-prima ou do produto final (SCHUMACHER et al.; 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Amostras

Amostras de cinco diferentes tipos de leite fermentado (A – E), três lotes de cada, foram adquiridos em três diferentes supermercados do mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. As amostras foram transportadas em embalagens isotérmicas até o Laboratório de Bioquímica de Alimentos – LBqA, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para análise. As amostras foram selecionadas de forma aleatória, sendo observada a proximidade da data de fabricação.

4.1.2. Reagentes, solventes e padrões de aminas e aminoácidos

Os reagentes utilizados nas análises eram de grau analítico, exceto a acetonitrila, que era de grau cromatográfico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana de tamanho do poro de 0,22 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

As soluções padrões de aminas bioativas e aminoácidos foram preparados com alanina (98%), monohidrocloreto de arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cistina cristalina, fenilalanina, glicina, monohidrocloreto de histidina monohidratado, isoleucina, monohidrocloreto de lisina, leucina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, valina, cloridrato de beta-feniletilamina, serotonina creatinina sulfato mono hidratado, cloridrato de tiramina, dicloridrato de cadaverina, dicloridrato de histamina, dicloridrato de putrescina, sulfato de agmatina, tetracloridrato de espermina, tricloridrato de espermidina, triptamina, glutamina, asparagina, norvalina, todos adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e cloreto de amônio p.a. adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil).

4.2. Métodos

4.2.1. Delineamento experimental

Cada lote de leite fermentado, ao chegar ao laboratório, foi utilizado para fazer um *pool* das amostras de forma asséptica. Ao todo foram obtidos cinco tipos diferentes de leite fermentado e três lotes obtidos de distintos supermercados. Os rótulos das amostras foram

avaliados e caracterizados. As amostras dos leites fermentados foram retiradas imediatamente para realização das análises físico-químicas e quantificação de aminoácidos e aminas bioativas. Os *pools* de cada um dos cinco leites fermentados foram mantidos sobre refrigeração a 9 ± 1 °C (Ormifrio Ltda GCI004, Sabará, Minas Gerais, Brasil) por até 45 dias com tomada de amostras a cada 15 dias, obtendo-se resultados sobre a influência do armazenamento refrigerado sobre a qualidade dos leites fermentados. Foi extrapolado o prazo de validade, em até 15 dias, para investigar a ocorrência de alterações significativas.

4.2.2. Métodos de análise

4.2.2.1. Avaliação dos rótulos

Os rótulos foram avaliados com relação aos parâmetros, ingredientes, cultura *starter*, valor nutricional e prazo de validade (dias). Para obter informação sobre a cultura lática utilizada, o serviço de atendimento ao consumidor (SAC) foi contactado e informado sobre o objetivo do trabalho e da relevância da informação fidedigna.

4.2.2.2. Avaliação das características físico-químicas

Todas as amostras foram analisadas quanto ao pH, acidez total titulável e teor de sólidos totais segundo os métodos descritos abaixo.

4.2.2.2.1 Acidez total titulável

A acidez total titulável em ácido láctico foi determinada por titulação com NaOH 0,1 mol/L (em quadruplicata) na presença do indicador fenolftaleína e os resultados foram expressos em g de ácido láctico por 100 g de amostra (BRASIL, 2007). De forma resumida, mediu-se 10 mL do leite fermentado e homogeneizado em 50 mL de água em seguida foram adicionadas 4 gotas da fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio NaOH, até coloração rósea.

4.2.2.2.2 pH

O pH foi determinado conforme descrito em Brasil (2007). Pesou-se 10 g de amostra em um béquer para a determinação do pH em pHmetro digital modelo DIGMED DM22 (mPA-210, Piracicaba, São Paulo, Brasil). A mensuração do pH foi realizada em quadruplicata.

4.2.2.2.3 Sólidos totais

Os teores de sólidos totais foram determinados por secagem em estufa (Biomatic, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) a 105 °C até obtenção de peso constante (balança SHIMADZU AY220, São Paulo, SP, 37 Brasil) (BRASIL, 2007).

4.2.2.3. Determinação dos teores de aminoácidos e aminas bioativas

4.2.2.3.1 Preparo das amostras

Para extração das aminas, mediu-se 75 mL de cada amostra as quais foram liofilizadas no liofilizador modelo K105 (Liotop, São Carlos, São Paulo, Brasil), sendo essas previamente preparadas, fazendo-se o pré-congelamento das amostras a -18 °C por 48 horas.

4.2.2.3.2 Determinação do perfil e teores de aminoácidos e aminas bioativas

Para extrair as aminas bioativas e os aminoácidos das amostras usou-se o delineamento de MOREIRA et al. (2017). O ácido clorídrico (1 mol/L) foi usado como reagente extrator, seguido de agitação em agitador orbital Tecnal® 250 rpm por 10 minutos (modelo TE-140), centrifugação (11.180 g por 21 minutos a 4 °C) e filtração em papel de filtro qualitativo (três extrações sucessivas vertendo no mesmo balão volumétrico). Posteriormente as três extrações o padrão interno L-norvalina foi adicionado.

Os extratos foram neutralizados com hidróxido de sódio 1 mol/L e centrifugados por 10 minutos a 4 °C. A derivação das aminas e aminoácidos a partir de 5 µL de extrato neutralizado adicionado de 35 µL de tampão borato (AccQ.Fluor®) e 10 µL de reagente AQC. Após 1 minuto de descanso, o extrato foi aquecido a 55 °C por 10 minutos em banho-maria. As amostras derivadas foram filtradas em filtros de seringa com poro de 0,22 µm (Whatman®, GE Healthcare, Reino Unido) e então analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (Figura 6).

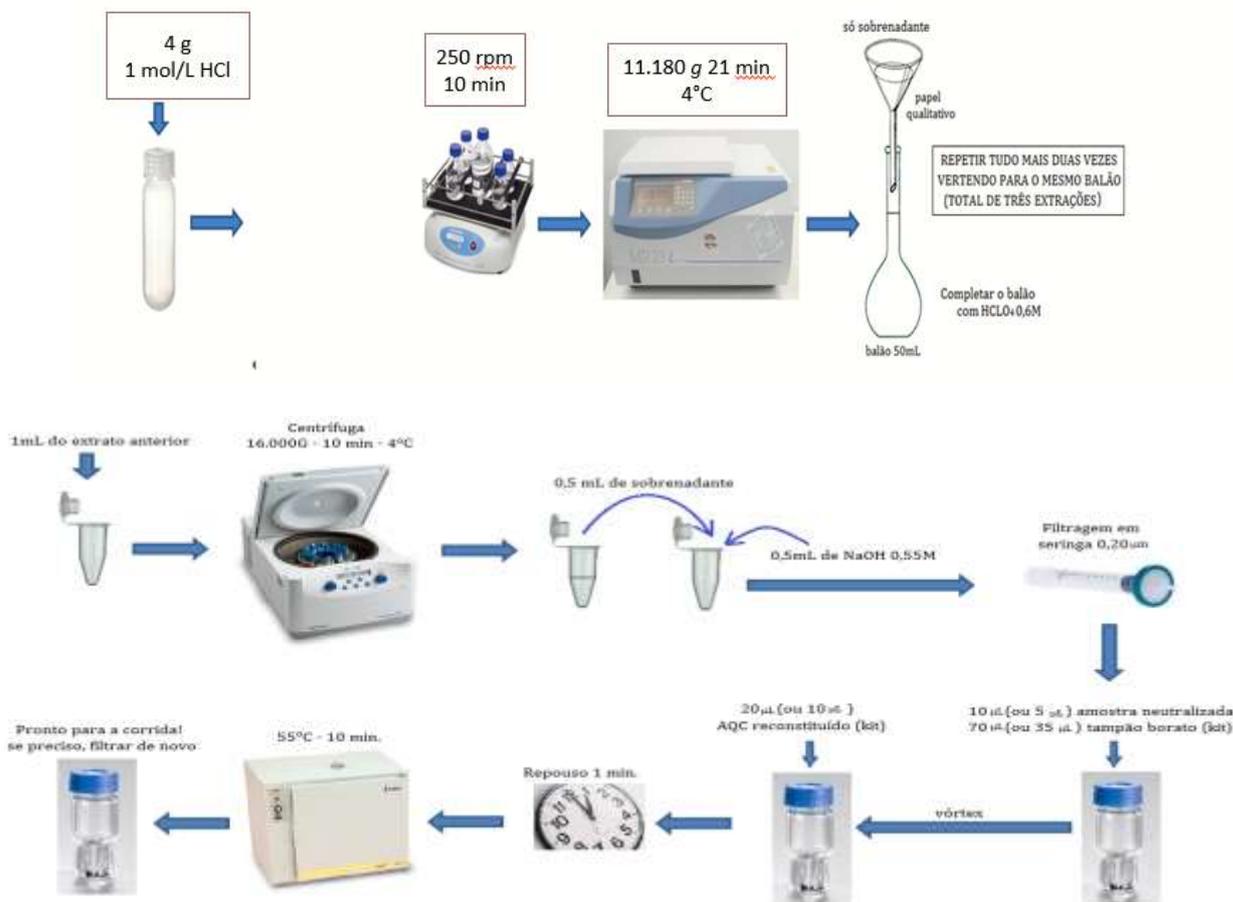


Figura 6. Sequencia utilizada na extração de aminas bioativas e aminoácidos para quantificação por UPLC-UV (adaptado de MOREIRA et al., 2017).

A análise cromatográfica das aminas e dos aminoácidos derivados foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra eficiência (modelo Waters Acquity® Ultra Performance LC -

UPLC®) (Waters, Milford, MA, EUA). Utilizou-se coluna de fase reversa Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm) para separação.

Foram usadas duas soluções de fase móvel: A) tampão acetato de sódio 0,1 mol/L em água ultrapura com pH ajustado para 4,8 com ácido acético p.a., e B) acetonitrila de grau cromatográfico por 30 minutos. O volume de injeção de amostra na coluna foi 2 µL, o fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de detecção no ultra-violeta foi 249 nm a uma taxa de amostragem de 40 pontos/segundo. Para controle do UPLC e aquisição dos dados utilizou-se o software Waters Empower 2.

Por fim, a identificação das aminas e aminoácidos foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos dos analitos na amostra em relação aos da solução padrão e também pela adição de solução da substância que suspeitava ter nas amostras. 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 norvalina. Para confirmação da reprodutibilidade da análise, padrões externos foram analisados na concentração de 1,2 µg/mL das 10 aminas bioativas a cada seis amostras.

4.3. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a investigação da possibilidade de uso destes parâmetros na avaliação da qualidade dos leites fermentados, usou-se a Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA). O pH, a acidez total, os sólidos totais e as aminas bioativas (arginina e espermidina) foram usadas como variáveis ativas. A análise do PCA foi realizada usando a matriz de covariância e o programa MATLAB.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos leites fermentados

5.1.1. Avaliação dos rótulos

As informações obtidas na análise dos rótulos estão descritas na Tabela 3. Apesar de todos os produtos terem a mesma denominação 'leite fermentado desnatado', estes tinham características distintas.

Todos os produtos analisados continham os ingredientes obrigatórios segundo a Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007), sendo eles o leite desnatado e/ou leite desnatado reconstituído além do cultivo de bactérias lácticas e/ou cultivo de bactérias lácticas específicas. Apesar de não constar no rótulo, informação sobre as culturas lácticas utilizadas foram fornecidas pelo serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC) de cada empresa responsável pelo seu produto. Observa-se que todos os tipos de produto continham *Lactobacillus* como cultura iniciadora, sendo *L. casei difensis* utilizado nas marcas A e D, *L. paracasei* na marca C, *L. casei* Shirota na marca E, e a mistura de três *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* e *L. helveticus* na marca B.

Tabela 3. Informações fornecidas nos rótulos e via SAC de diferentes tipos de leite fermentado obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

Leite fermentado	Ingredientes	Cultura starter	Valor nutricional 75 g (uma unidade)	Validade (dias)
A	Leite desnatado e/ou leite desnatado reconstituído, água, açúcar, dextrose, fermento lácteo e aroma idêntico ao natural de baunilha	<i>Lactobacillus casei difensis</i>	Valor energético 44 kcal, carboidratos: 9,3 g, proteínas: 1,7 g, sódio: 27 mg, cálcio: 57 mg	41
B	Leite desnatado e/ou leite em pó desnatado reconstituído, açúcar, dextrose, preparado laranja cítrica (água, amido modificado, suco de laranja, aromatizante, conservador sorbato de potássio e acidulante ácido cítrico) , aromatizante, vitaminas A e D e fermentos lácteos.	<i>Lactobacillus casei;</i> <i>Lactobacillus acidophilus;</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Valor energético 58 kcal, carboidratos: 13 g, proteínas: 1,6 g, sódio: 20 mg, cálcio: 62 mg, vitamina A: 180 mcg, vitamina D: 1,5 mcg	48
C	Leite reconstituído desnatado, água, xarope de açúcar, açúcar invertido, fermento lácteo, sulfato de zinco, aromatizante e edulcorante artificial sucralose	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Valor energético 41 kcal, carboidratos: 8 g, açúcares: 6,9 g, proteínas: 1,6 g, sódio: 27 mg, cálcio: 63 mg, zinco: 1,3 mg	43
D	Leite desnatado e/ou leite desnatado reconstituído, xarope de açúcar, dextrose, fermento lácteo e aromatizante	<i>Lactobacillus casei difensis</i>	Valor energético: 51 kcal, carboidratos: 11 g, proteínas: 1,7 g, cálcio: 56 g, sódio: 27 mg	41
E	Leite desnatado e /ou leite reconstituído, açúcar, glicose, fermento lácteo, aroma	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Valor energético 51 kcal, carboidratos 11 g, proteínas 1,6 g, cálcio: 69 g, sódio: 30 mg	40

* negrito – ingredientes distintos entre as marcas; SAC – serviço de atendimento ao consumidor.

Além destes ingredientes obrigatórios, todos os produtos foram adicionados de aroma/aromatizante e carboidrato (açúcar, dextrose, xarope de açúcar, açúcar invertido, ou glicose). Água foi adicionada em 60% dos produtos. Um dos produtos (C) continha edulcorante artificial sucralose (adoçante artificial). Este mesmo produto (C) também continha sulfato de zinco. O produto B continha também preparado de laranja cítrica (com amido modificado, conservador sorbato de potássio e acidulante ácido cítrico) e vitaminas A e D. Os demais ingredientes variaram entre os produtos. De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2007), além dos ingredientes obrigatórios, é permitido, desde que seja especificado no rótulo, o uso de outros ingredientes tais como leite concentrado, leite em pó, proteínas lácteas, soros lácteos, frutas em pedaços, polpa, mel, coco, cereais, especiarias, conservantes e aromatizantes. De forma semelhante, o conteúdo calórico e aporte nutricional (informado pelo fabricante) foram similares para os produtos D, E (51 kcal), entretanto o produto B apresentou maior conteúdo calórico (58 kcal). O prazo de validade indicado no rótulo variou para os produtos, sendo o menor observado para o leite fermentado E (40 dias) e maior para o produto B (48 dias). O produto com maior prazo de validade foi o mesmo que apresentou no rótulo o uso do conservante sorbato de potássio.

5.1.2. Características físico-químicas dos leites fermentados

Os resultados obtidos na caracterização dos diferentes tipos de leites fermentados durante a validade estão apresentados na Tabela 4 quanto aos valores de pH, acidez e de sólidos totais.

Com relação ao pH (Tabela 4), observa-se que, de um modo geral, este variou de 3,98 a 4,18 nos cinco tipos de leite fermentado dentro do prazo de validade. Não houve diferença nos valores de pH entre as diferentes marcas analisadas, com valores médios variando de 4,03 a 4,06 e coeficientes de variação de 0,6 a 2,1%. Desta forma, apesar das diferentes culturas lácticas utilizadas, o pH dos produtos foi similar. Resultados semelhantes foram reportados na literatura (GALLINAA et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011). A Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007) dos leites fermentados não estabelece valores para o pH, entretanto, os valores encontrados são esperados em função da ação das bactérias ácido lácticas, micro-organismos esses usados pela indústria alimentícia devido a sua capacidade de produção de ácido láctico, a partir do processo de fermentação da lactose, contribuindo com o aspecto sensorial, além de ampliar a vida-de-prateleira dos alimentos (OLIVEIRA, 2009).

Os teores de acidez nos diferentes produtos variaram de 0,73 a 1,14 g de ácido láctico/100 g. Os teores médios de cada marca variaram de 0,82 a 1,00 g de ácido láctico/100 g nos leites A e B, respectivamente. Não houve variação estatística nos teores de acidez por marca. Os coeficientes de variação variaram de 3,4% (marca D) até 12,6% (marca C).

Estes valores de acidez titulável estão de acordo com o estabelecido na Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007), o qual preconiza que os limites máximo e mínimo estejam entre 0,6 e 2,0 g de ácido láctico/100 g do produto. Esse estudo se equipara ao realizado por MEDEIROS et al. (2011), para leites fermentados de marcas comerciais do Brasil, onde os valores médios de $0,882 \pm 0,008$ g de ácido láctico/100 g foram encontrados.

Os teores de sólidos totais das amostras variaram de 7 a 12 g/100 g. Os valores médios das marcas variam de 7,37 a 12,0 g/100 g. Segundo o Regulamento Técnico previsto na Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007) de leites fermentados não há padrões estabelecidos para os percentuais sólidos totais.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão e faixas de variação do pH, acidez e sólidos totais de diferentes tipos de leite fermentado obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG.

Leite fermentado	Valores médios \pm dp (faixa)		
	pH	Acidez titulável (g ácido láctico/100 g)	Sólidos totais (g/100 g)
A	4,06 \pm 0,08 ^a (3,98-4,17)	0,82 \pm 0,09 ^a (0,73-1,00)	12,00 \pm 0,00 ^a (12,00-0)
B	4,04 \pm 0,02 ^a (4,00-4,05)	1,00 \pm 0,06 ^b (0,90-1,14)	9,37 \pm 0,11 ^a (9,26-9,48)
C	4,03 \pm 0,05 ^a (4,00-4,10)	0,98 \pm 0,12 ^a (0,80-1,12)	7,37 \pm 0,31 ^a (7,06-7,68)
D	4,05 \pm 0,07 ^a (4,00-4,18)	0,90 \pm 0,03 ^a (0,85-0,93)	10,39 \pm 0,39 ^a (10,00-10,78)
E	4,04 \pm 0,04 ^a (3,99-4,10)	0,99 \pm 0,06 ^a (0,94-1,08)	8,39 \pm 0,25 ^a (8,14-8,64)

Valores médios em uma mesma coluna com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.1.3. Tipos e teores de aminoácidos nos leites fermentados

O perfil de aminoácidos livres nas amostras de leite fermentado está apresentado na Tabela 5. Foram encontrados 12 aminoácidos dentre os 18 aminoácidos pesquisados. O ácido glutâmico, cistina, glicina, glutamina, metionina e serina não foram detectados em nenhuma amostra.

Foram encontrados nas amostras de três a 11 aminoácidos. Três foram detectados nos produtos C e D, sendo eles arginina, asparagina e prolina. Na amostra A foram encontrados: arginina, asparagina, alanina, histidina, isoleucina, tirosina, treonina e valina. Na amostra B, além destes encontrados em A, detectou-se lisina e prolina, em um total de 10 aminoácidos. O produto E também teve 10 aminoácidos, dentre eles, ácido aspártico, alanina, arginina, asparagina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, tirosina, treonina e valina.

Os aminoácidos encontrados em todos os tipos de leite fermentado foram apenas a arginina e a asparagina. A presença do ácido aspártico e leucina foi detectada apenas na amostra E. A lisina só foi detectada na amostra B e fenilalanina foi detectada apenas nas amostras B e E. Maiores teores totais de aminoácidos livres (Tabela 5) foram encontrados nas amostras B e E (~17 mg/kg), seguido da amostra A (14 mg/kg), e das amostras C e D que apresentaram os menores teores (~4 mg/kg).

Ao investigar a contribuição de cada aminoácido ao teor total (Figura 7), observa-se para a amostra A e B uma maior contribuição de treonina (21-31%), seguido da histidina (22 a 27%) e da isoleucina (10 a 12%), sendo que os demais contribuíram em percentuais menores que 10%. As amostras C e D apresentaram uma maior contribuição de arginina ao teor total (~45%), seguido da prolina (~37%) e da asparagina (17%). Por outro lado, a amostra E apresentou contribuição ao teor total de um maior número de aminoácidos, dentre eles, treonina e histidina apresentaram contribuição de ~21 a 25% e alanina, arginina e leucina contribuição de ~11%.

Além de atuar como subunidades estruturadoras das proteínas, os aminoácidos também atuam como precursores de coenzimas, de hormônios, de ácidos nucleicos e de outras moléculas essenciais para o funcionamento do organismo (TIRAPEGUI & ROGERO, 2007; BRANDÃO & FETT, 2016; TAVARES & VANNUCCI, 2016).

Ainda, alguns aminoácidos apresentam funções específicas e relevantes para o organismo (ALBERTS et al., 2006; NELSON & COX, 2011). Por exemplo, o leite fermentado B foi o único que continha lisina, aminoácido que pode facilitar a absorção de cálcio. A leucina só foi encontrada no produto E, e os leites fermentados B e E continham também isoleucina e valina, sendo estes três aminoácidos importantes na recuperação muscular e reparação da pele, músculos, tecidos e ossos. Os tipos B e E continham também treonina, que é relevante para o balanceamento da quantidade de proteína no organismo, produção de colágeno, elastina e esmalte dos dentes; tirosina, que ajuda na produção de adrenalina, dopamina e melanina; a alanina, que auxilia o fígado na síntese da glicose; e a fenilalanina, que ajuda a melhorar sintomas relacionados a depressão, artrite, enxaqueca e obesidade. Entretanto, a fenilalanina, presente nos produtos B e E, seria prejudicial para fenilcetonúricos, uma vez que o excesso desse aminoácido no sangue se transforma em ácido pirúvico, uma substância tóxica, que afeta o desenvolvimento neurológico (BUENO et al., 2016).

Tabela 5. Teores médios, desvios padrão, e faixas de variação de aminoácidos nos diferentes tipos de leite fermentado obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

Aminoácidos	Teores mg/kg/marca leite fermentado				
	A	B	C	D	E
Ácido aspártico	0 ^b nd	0 ^b nd	0 ^a nd	0 ^a nd	0,43±0,05 ^b (0,37-0,48)
Alanina	1,14±0,82 ^a (0,39-1,89)	1,68±0,16 ^a (1,56-1,88)	0 ^a nd	0 ^a nd	1,88±0 ^a (1,88)
Arginina	1,21±0,91 ^b (0,37-2,04)	1,71±1,02 ^a (0,41-2,47)	1,90±0,11 ^a (1,79-2,00)	1,91±0,10 ^a (1,79-2,00)	2,04±0 ^b (2,04)
Asparagina	0,87±0,05 ^a (0,82-0,92)	0,87±0,06 ^a (0,81-0,92)	0,73±0,02 ^a (0,71-0,76)	0,73±0,02 ^a (0,71-0,76)	0,87±0,06 ^a (0,82-0,92)
Fenilalanina	0 nd	1,58±0,46 ^a (1,10-2,03)	0 ^a nd	0 ^a nd	1,11±0 ^a (1,11)
Histidina	3,76±0,01 ^a (3,76-3,79)	3,78±0,05 ^a (3,76-3,88)	0 ^a nd	0 ^a nd	3,76±0 ^a (3,76)
Isoleucina	1,76±0,21 ^a (1,58-1,98)	1,75±0,16 ^a (1,58-2,08)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,18±0,02 ^b (0,16-0,20)
Leucina	0 ^b nd	0 ^b nd	0 ^a nd	0 ^a nd	2,06±0 ^a (2,06)
Lisina	0 ^b nd	0,49±0,34 ^a (0,10-0,98)	0 ^a nd	0 ^a nd	0 ^a nd
Prolina	0 ^b nd	0,79±0,95 ^a (1,97-0,92)	1,56±0 ^a (1,56)	1,56±0,00 ^a (1,56)	0 nd
Tirosina	0,50±0,14 ^a (0,35-0,63)	0,52±0,10 ^a (0,35-0,62)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,62±0 ^a (0,62)
Treonina	4,34±0,12 ^a (4,08-4,39)	3,72±1,00 ^a (2,37-4,38)	0 ^a nd	0 ^a nd	4,38±0 ^a (4,38)
Valina	0,48±0 ^b (0,48)	0,52±0,03 ^a (0,48-0,56)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,44±0,04 ^b (0,40-0,49)
Total	14,06±2,26 ^a	17,41±0,33 ^a	4,19±0,13 ^a	4,20±0,12 ^a	17,77±0,17 ^b

Valores médios em uma mesma linha com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (teste de Tukey; p<0,05).

Os teores totais de aminoácidos livres nos leites fermentados variaram de ~4,2 mg/kg para as amostras C e D; ~14,0 mg/kg para o leite A; até ~17 mg/kg para os tipos B e E. Desta

forma, os tipos B e E apresentaram teores significativamente maiores que o leite fermentado A; que foram significativamente maiores que os teores totais de aminos nos leites fermentados B e C.

Ao investigar a contribuição de cada aminoácido ao teor total (Figura 7), observa-se para o produto A e B uma maior contribuição de treonina (21-31%), seguido da histidina (22 a 27%) e isoleucina (10 a 12%), sendo que os demais contribuíram em percentuais menores que 10%. Os produtos C e D apresentaram uma maior contribuição de arginina ao teor total (~45%), seguido da prolina (~37%) e da asparagina (17%). Por outro lado, o produto E, apresentou contribuição ao teor total de um maior número de aminoácidos, dentre eles, treonina e histidina apresentaram contribuição de ~21 a 25% e alanina, arginina e leucina contribuição de ~11%.

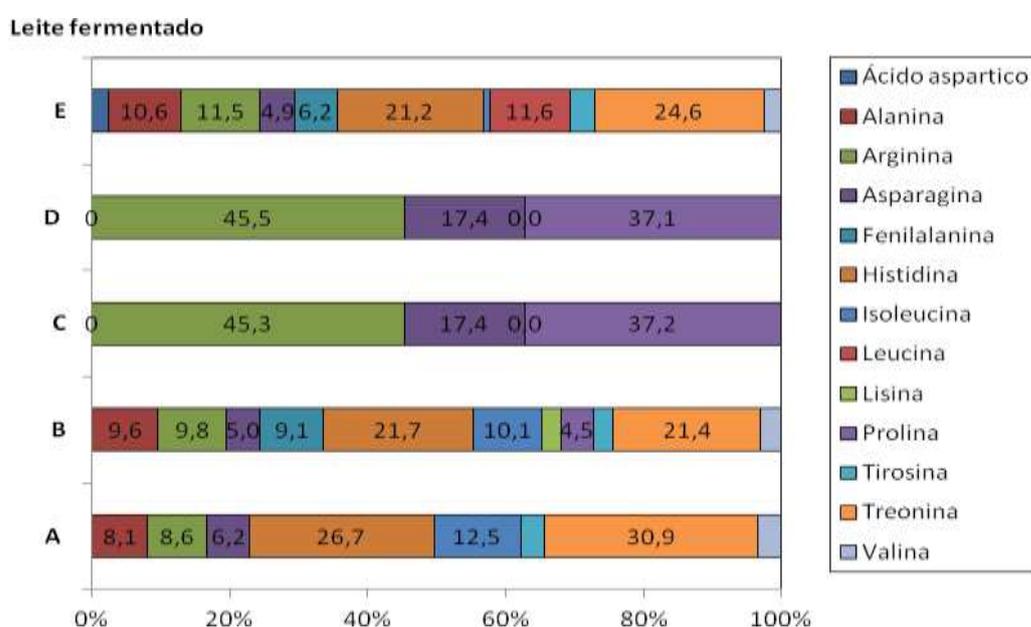


Figura 7. Contribuição de cada aminoácido ao teor total em diferentes tipos de leite fermentado.

5.1.4. Teores de aminos bioativas nos leites fermentados

Os teores de aminos bioativas nas amostras de leite fermentado estão apresentados na Tabela 6. Dentre as dez aminos pesquisadas, apenas a espermina foi detectada nas amostras de leite fermentado, com teores similares para os diferentes tipos de leite fermentado (0,67 – 0,80 mg/kg).

A presença da espermina no leite fermentado é relevante, visto que esta poliamina apresenta propriedades benéficas à saúde, dentre elas, regulação do crescimento, atividade antiinflamatória, propriedades antioxidantes, função neuroprotetora (SASAKI et al., 1996; GABORIAU et al., 2005). A via de biossíntese começa com a ornitina, pela ação da enzima ornitina descarboxilase formando então a putrescina. Já a espermina é formada a partir da putrescina, através da adição de grupos aminopril (SASAKI et al., 1996).

Tabela 6. Teores médios, desvios padrão e faixa de variação dos teores de aminos bioativas em diferentes tipos de leite fermentado obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

Aminas bioativas	Teores marca leite fermentado				
	A	B	C	D	E
Espermina	0,68±0,00 ^a (0,68)	0,80±0,16 ^a (0,62-0,93)	0,67±0,01 ^a (0,66-0,68)	0,67±0,02 ^a (0,66-0,68)	0,73±0,06 ^a (0,68-0,79)

Para aminos não detectadas (nd<0,40), foi utilizado zero no cálculo das medias. Valores médios com sobrescritos diferentes para diferentes tipos de leite fermentado são significativamente diferentes (Teste de Tukey, p<0,05).

5.2. Influência do prazo de validade nos leites fermentados

O prazo de validade dos leites fermentados armazenados sob refrigeração a 8 °C dura em torno de 40 dias (Tabela 3), garantindo contagens bacterianas adequadas para que os micro-organismos exerçam suas funções funcionais, assegurando ainda, os valores físico-químicos ideais, apresentando por fim características sensoriais desejáveis aos consumidores e de acordo com a legislação. Após o prazo de validade, os produtos continuaram sendo analisados com relação aos mesmos parâmetros utilizados no produto dentro da validade.

5.2.1. Influência do prazo de validade nas características físico-químicas

Observa-se nas Tabelas 7, 8 e 9, os resultados obtidos para os parâmetros pH, acidez titulável e sólidos totais, respectivamente, nos produtos durante e após o vencimento da validade. Observa-se que para o pH, apenas o produto B apresentou diferença significativa antes e após a validade, sendo o pH maior no produto fora da validade. Esse aumento pode ser justificado pela presença de amido na sua formulação, fato este semelhante ao descrito no trabalho de BORGONOV I et al. (2016), em que foi relatado que a presença de amido no leite fermentado estudado interferiu, negativamente, na fermentação do produto, elevando o pH.

Com relação à acidez, não foi observada diferença significativa entre os produtos dentro e fora da validade. Observa-se, ainda que, todos os valores de acidez se encontram dentro da faixa de variação (0,6 a 2,0 mg ácido láctico/100 g) prevista pela Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007).

A inexistência de diferença significativa entre os teores de sólidos totais ou umidade nos produtos reforçam não haver diferença nestes parâmetros ao longo do armazenamento, não havendo necessidade de calcular os resultados em base seca.

5.2.2. Influência do prazo de validade nos teores de aminoácidos

Os resultados obtidos ao se comparar o perfil e teores de aminoácidos livres, antes e após o término da validade estão apresentados na Tabela 10. Alguns aminoácidos que não haviam sido detectados nos leites fermentados passaram a ser detectados nos produtos vencidos, dentre eles a glicina e a serina nos produtos A, B e E, fato este pode estar associado à atividade proteolítica. Além disso, o produto E foi o único a apresentar diferença estatística significativa. Para os produtos C e D, os mesmos três aminoácidos detectados no produto durante a validade (arginina, asparagina e prolina), foram encontrados no produto vencido, não havendo diferença significativa nos seus teores antes e após o vencimento.

Tabela 7. Valores médios, desvio padrão, taxa de variação do pH de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtidos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG.

Leite fermentado	pH média ± dp (faixa) / validade	
	Dentro da validade	Fora da validade
A	4,06±0,08 ^a (3,98-4,17)	4,08±0,14 ^a (3,90-4,20)
B	4,04±0,02 ^b (4,00-4,05)	4,23±0,27 ^a (4,00-4,60)
C	4,03±0,05 ^a (4,00-4,10)	4,06±0,02 ^a (4,03-4,09)
D	4,05±0,07 ^a (4,00-4,18)	4,02±0,07 ^a (3,90-4,10)
E	4,04±0,04 ^a (3,99-4,10)	4,05±0,03 ^a (4,00-4,08)

Valores médios em uma mesma linha com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (teste Tukey, p<0,05).

Tabela 8. Teores médios, desvios padrão e faixa de variação da acidez (g de ácido láctico/100 g) de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) do mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

Leite fermentado	Teor de acidez (g ácido láctico/100 g) / média ± dp (faixa)	
	Dentro da validade	Fora da validade
A	0,82±0,09 ^a (0,73-1,00)	0,90±0,08 ^a (0,80-1,00)
B	1,00±0,06 ^a (0,90-1,14)	0,98±0,14 ^a (0,90-1,14)
C	0,98±0,12 ^a (0,80-1,12)	1,00±0,06 ^a (0,91-0,99)
D	0,90±0,03 ^a (0,85-0,93)	0,93±0,03 ^a (0,88-0,95)
E	0,99±0,06 ^a (0,94-1,08)	0,94±0,04 ^a (0,90-1,00)

Valores médios em uma mesma linha com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (teste Tukey, p<0,05).

Tabela 9. Teores médios, desvio padrão, e faixa de variação dos sólidos totais de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) do mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

Leite fermentado	Teor de sólidos totais (g/100 g) / média ± dp (faixa)	
	Dentro da validade	Fora da validade
A	12,00±0,00 ^a (12,00-0)	12,00±0,00 ^a (12,00-0)
B	9,37±0,11 ^a (9,26-9,48)	9,33±0,00 ^a (9,33-0)
C	7,37±0,31 ^a (7,06-7,68)	7,25±0,19 ^a (7,06-7,44)
D	10,39±0,39 ^a (10,00-10,78)	10,50±0,62 ^a (9,88-11,12)
E	8,39±0,25 ^a (8,14-8,64)	8,22±0,27 ^a (7,95-8,49)

Valores médios em uma mesma linha com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (teste Tukey, p<0,05).

Por outro lado, os produtos A, B e E tiveram um aumento no número de aminoácidos detectados de 8, 11 e 11 para 11, 12 e 13, respectivamente; ou seja, o aumento de 1 a 3 aminoácidos com o vencimento. Para o produto A os aminoácidos fenilalanina, glicina, leucina, lisina, prolina e serina, passaram a ser detectados com o vencimento do prazo de validade. Entretanto, deixaram de ser detectadas a asparagina, histidina e treonina no produto vencido. Ainda, houve um aumento significativo nos teores de arginina e valina. Para o produto B, os aminoácidos fenilalanina, glicina, lisina, prolina e serina passaram a ser detectados com o vencimento. Entretanto, a asparagina deixou de ser detectada no produto vencido. Ainda, houve uma diminuição significativa nos teores de histidina e treonina. Para o produto E, passaram a ser detectados com o vencimento, os aminoácidos glicina, prolina e serina. Entretanto, deixou de ser detectada a asparagina no produto vencido. Ainda, houve um aumento significativo nos teores de ácido aspártico, fenilalanina, arginina, isoleucina e valina; e, por outro lado, uma diminuição nos teores de alanina, histidina, leucina e treonina. Desta forma, para os produtos A, B e E, houve um padrão similar na perda de asparagina, histidina e treonina e um aumento nos teores de glicina. Não foram encontrados relatos na literatura referentes ao papel de diferentes culturas iniciadoras no perfil e teores de aminoácidos em leite fermentado. Baseado nestes resultados observa-se que, para três dos cinco tipos de leite fermentado utilizados, após o vencimento, houve um aumento nos teores dos aminoácidos glicina e das aminas agmatina e serotonina; mas, por outro lado, houve diminuição dos teores asparagina, histidina e treonina.

5.2.3. Influência do prazo de validade nos teores de aminas

Observa-se na Tabela 11 o perfil e os teores de aminas bioativas nas amostras de leite fermentado dentro e após a validade. Para os produtos C e D, não houve alteração nos tipos de aminas encontrados antes e após a validade.

Por outro lado, para os leites fermentados A, B e E, no produto vencido foram detectadas, além da espermina, as aminas agmatina e serotonina. Houve também para estes produtos, um aumento significativo nos teores totais de aminas biogênicas após a validade. Para os produtos A e E, houve aumento nos teores de espermina.

Tabela 10. Teores médios, desvios padrão e faixa de variação de aminoácidos de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtido no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

Aminoácidos	Teores mg/kg Dentro da validade					Teores mg/kg Fora da validade				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Ácido aspártico	0 ^b nd	0 ^a nd	0 ^a nd	0 ^a nd	0,43±0,05 ^b (0,37-0,48)	0 ^a nd	0 ^a nd	0 ^a nd	0 ^a nd	0,88±0,00 ^a (0,88)
Alanina	1,14±0,82 ^a (0,39-1,89)	1,68±0,16 ^a (1,56-1,88)	0 ^a nd	0 ^a nd	1,88±0,00 ^a (1,88)	1,56±0,00 ^a (1,56)	1,58±0,03 ^a (1,56-1,61)	0 ^a nd	0 ^a nd	1,56±0,00 ^b (1,56)
Arginina	1,21±0,91 ^b (0,37-2,04)	1,71±1,02 ^a (0,41-2,47)	1,90±0,11 ^a (1,79-2,00)	1,91±0,10 ^a (1,79-2,00)	2,04±0,00 ^b (2,04)	2,67±0,00 ^a (2,67)	2,68±0,03 ^a (2,67-2,71)	2,00±0,00 ^a (2,00)	1,80±0,00 ^a (1,80)	2,67±0,00 ^a (2,67)
Asparagina	0,87±0,05 ^a (0,82-0,92)	0,87±0,06 ^a (0,81-0,92)	0,73±0,02 ^a (0,71-0,76)	0,73±0,02 ^a (0,71-0,76)	0,87±0,06 ^a (0,82-0,92)	0 nd	0 ^b nd	0,75±0,00 ^a (0,75)	0,71±0,00 ^a (0,75)	0 ^b nd
Fenilalanina	0 ^b nd	1,58±0,46 ^a (1,10-2,03)	0 ^a nd	0 nd	1,11±0,00 ^b (1,11)	1,98±0,00 ^a (1,98)	2,00±0,03 ^a (1,98-2,03)	0 ^a nd	0 ^a nd	1,98±0,00 ^a (1,98)
Glicina	0 ^b nd	0 ^b nd	0 ^a nd	0 nd	0 ^b nd	0,81±0,00 ^a (0,81)	0,83±0,03 ^a (0,81-0,86)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,81±0,00 ^a (0,81)
Histidina	3,76±0,01 ^a (3,76-3,79)	3,78±0,05 ^a (3,76-3,88)	0 ^a nd	0 nd	3,76±0,00 ^a 3,76	0 ^b nd	1,35±0,03 ^b (1,33-1,38)	0 ^a nd	0 ^a nd	1,33±0,00 ^b (1,33)
Isoleucina	1,76±0,21 ^a (1,58-1,98)	1,75±0,16 ^a (1,58-2,08)	0 ^a nd	0 nd	0,18±0,02 ^b (0,16-0,20)	1,83±0,00 ^a (1,83)	1,84±0,03 ^a (1,83-1,87)	0 ^a nd	0 ^a nd	1,83±0,00 ^a (1,83)
Leucina	0 ^b nd	0 nd	0 ^a nd	0 nd	2,06±0,00 ^a (2,06)	1,49±0,00 ^a (1,49)	0 nd	0 ^a nd	0 ^a nd	1,49±0,00 ^b (1,49)
Lisina	0 ^b nd	0,49±0,34 ^a (0,10-0,98)	0 ^a nd	0 nd	0 ^a nd	0,58±0,00 ^a (0,58)	0,60±0,03 ^a (0,58-0,63)	0 ^a nd	0 ^a nd	0 ^a nd
Prolina	0 ^b nd	0,79±0,95 ^a (1,97-0,92)	1,56±0,00 ^a (1,56)	1,56±0,00 ^a (1,56)	0 ^b nd	1,92±0,00 ^a (1,92)	1,94±0,03 ^a (1,92-1,97)	1,56±0,00 ^a (1,56)	1,57±0,00 ^a (1,57)	1,92±0,00 ^a (1,92)
Serina	0 ^b nd	0 nd	0 ^a nd	0 ^a nd	0 ^b nd	0,88±0,00 ^a (0,88)	0,90±0,03 (0,88-0,93)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,88±0,00 ^a (0,88)
Tirosina	0,50±0,14 ^a (0,35-0,63)	0,52±0,10 ^a (0,35-0,62)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,62±0,00 ^a (0,62)	0,53±0,00 ^a (0,53)	0,55±0,03 ^a (0,53-0,58)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,53±0,00 ^b (0,53)
Treonina	4,34±0,12 ^a (4,08-4,39)	3,72±1,00 ^a (2,37-4,38)	0 ^a nd	0 ^a nd	4,38±0,00 ^a (4,38)	0 ^b nd	2,39±1,00 ^b (2,37-2,42)	0 ^a nd	0 ^a nd	2,37±0,00 ^b (2,37)
Valina	0,48±0 ^b (0,48)	0,52±0,03 ^a (0,48-0,56)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,44±0,04 ^b (0,40-0,49)	0,51±0,00 ^a (0,51)	0,53±0,03 ^a (0,51-0,56)	0 ^a nd	0 ^a nd	0,51±0,00 ^a (0,51)
Total	14,06±2,26 ^a	17,41±4,33 ^a	4,19±0,13 ^a	4,20±0,12 ^a	17,77±0,17 ^b	14,76±0,00 ^a	17,19±1,33	4,31±0,00 ^a	4,08±0,00 ^a	18,76±0,00 ^a

Para aminoácidos não detectados (nd<0,40), foi utilizado zero no cálculo das médias. Valores médios com sobrescritos diferentes para o mesmo tipo de leite fermentado é significativamente diferente (Teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 11. Teores médios, taxa de variação desvios padrão de aminos bioativas de diferentes tipos de leite fermentado (dentro e fora da validade) obtido no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG

Aminas bioativas	Teores mg/kg/marca leite fermentado									
	Dentro da validade					Fora da validade				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Espermina	0,68±0,00 ^b (0,68)	0,80±0,16 ^a (0,62-0,93)	0,67±0,01 ^a (0,66-0,68)	0,67±0,02 ^a (0,66-0,68)	0,73±0,06 ^b (0,68-0,79)	0,93±0,01 ^a (0,92-0,93)	0,95±0,03 ^a (0,93-0,98)	0,68±0,01 ^a (0,67-1,13)	0,66±0,01 ^a (0,65-0,67)	0,93±0,00 ^a (0,93)
Agmatina	0 ^b nd	0 ^b nd	0 nd	0 nd	0 ^b nd	0,87±0,00 ^a (0,87)	0,89±0,03 ^a (0,87-0,92)	0 ^b nd	0 ^b nd	0,87±0,00 ^a 0,87
Serotonina	0 ^b nd	0 ^b nd	0 nd	0 nd	0 ^b nd	0,77±0,00 ^a (0,77)	0,79±0,03 ^a (0,77-0,82)	0 ^b nd	0 nd	0,77±0,00 ^a (0,77)
Total										
Poliaminas	0,68±0,00 ^b	0,80±0,16 ^a	0,67±0,01 ^a	0,67±0,02 ^a	0,73±0,06 ^b	0,93±0,01 ^a	0,95±0,03 ^a	0,68±0,01 ^a	0,66±0,01 ^a	0,93±0,00 ^a
Biogênicas	nd ^b	nd ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^b	1,64±0,01 ^a	0,68±0,03 ^a	nd ^a	nd ^a	1,65±0,00 ^a
Geral	0,68±0,00 ^b	0,80±0,16 ^b	0,67±0,01 ^a	0,67±0,02 ^a	0,73±0,06 ^b	2,57±0,01 ^a	1,63±0,03 ^a	0,68±0,01 ^a	0,66±0,01 ^a	2,58±0,00 ^a

Para aminos não detectadas (nd<0,40), foi utilizado zero no cálculo das medias. Valores médios com sobrescritos diferentes para um mesmo tipo de leite fermentado são significativamente diferentes (teste de Tukey, p<0,05).

5.3. Análise multivariada de leites fermentados

Na Análise dos Componentes Principais (PCA) os dois primeiros componentes representaram 84,1% da variância explicada, levando em consideração o pH, acidez total, sólidos totais, a amina bioativa arginina e o aminoácido espermidina. Analisando os resultados, foi possível diferenciar os leites fermentados da marca B, antes e depois da validade (Figura 8). Pelos *loadings* do PC1, verifica-se que essas amostras se diferenciam entre si com base principalmente no teor de espermidina e arginina (Figura 9). Por outro lado, não houve diferença, para as marcas C, D, e E antes e após o vencimento.

Para o leite fermentado de marca A, observou-se diferença, entre antes e após o vencimento, baseando-se principalmente pela acidez, que aumentou nas amostras após o vencimento (Figura 10).

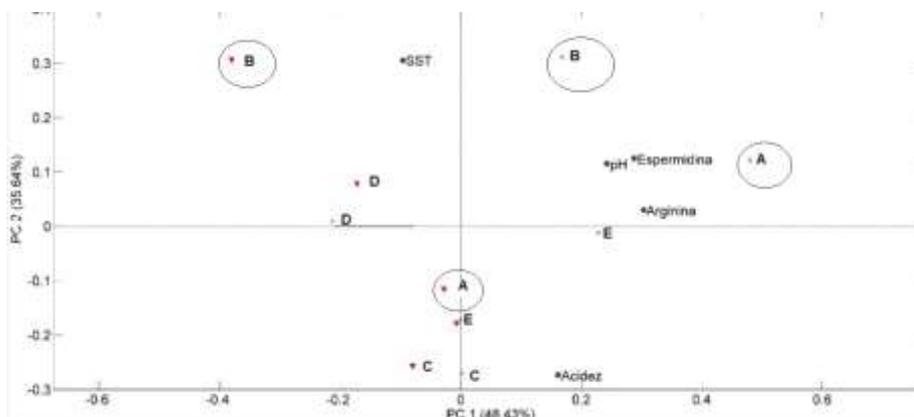


Figura 8. Projeção das variáveis analisadas nos leites fermentados antes e após a validade por Análise de Componentes Principais (PCA).

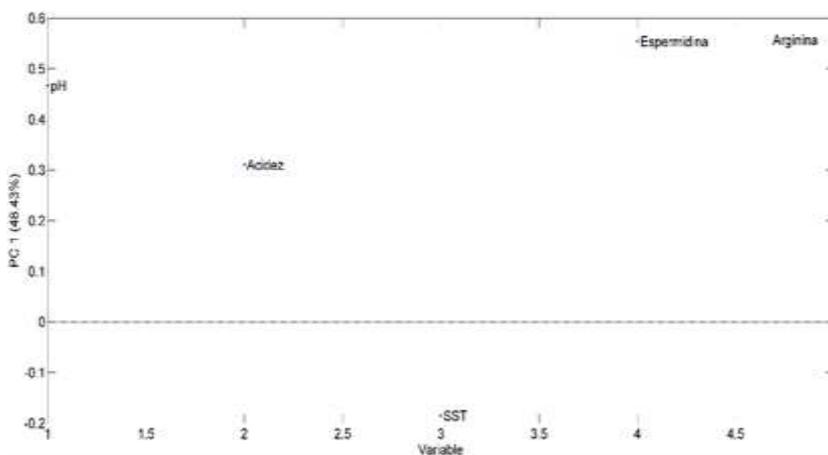


Figura 9. Projeção em *loadings* do PC1 nos leites fermentados antes e após a validade por Análise de Componentes Principais (PCA).

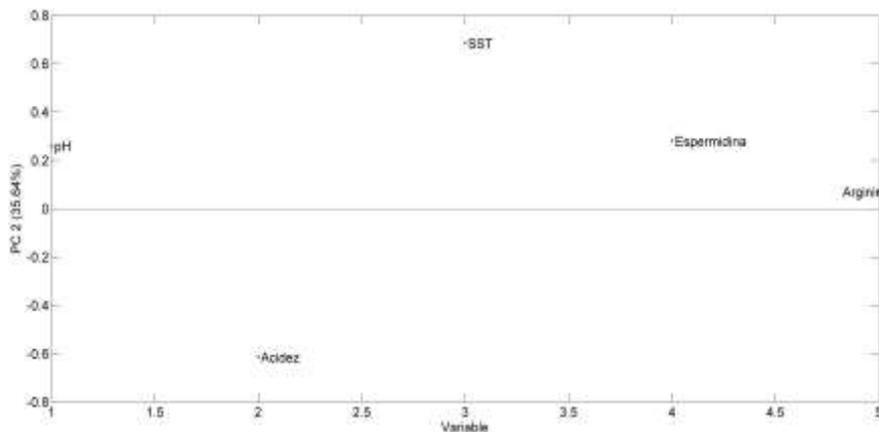


Figura 10. Projeção em *loadings* PC2 nos leites fermentados antes e após a validade por Análise de Componentes Principais (PCA).

5.4. Proposta de parâmetros de identidade e qualidade de leite fermentado

Baseado no estudo observa-se que, para a marca A, a acidez seria um parâmetro diferenciador da validade. Para a marca B, os parâmetros diferenciadores foram pH, espermidina e arginina. Por outro lado, para as demais marcas, não foi possível diferenciar amostras antes e após a validade com relação aos parâmetros testados. Desta forma, há necessidade de uma melhor caracterização dos leites fermentados comercializados utilizando-se outros parâmetros de qualidade.

6. CONCLUSÃO

Segundo informações nos rótulos dos leites fermentados, estes continham 51 a 66 kcal e os ingredientes obrigatórios - leite desnatado e/ou leite desnatado reconstituído, além do cultivo de bactérias lácticas e/ou cultivo de bactérias lácticas específicas, incluindo diferentes espécies de *Lactobacillus*. Uma amostra continha edulcorante artificial sucralose e outra continha amido, conservante sorbato de potássio e acidulante ácido cítrico. O prazo de validade variou de 40 a 48 dias.

Os leites fermentados atenderam à legislação brasileira quanto ao parâmetro físico-químico acidez, que variou de 0,82 a 1,00 g/100 g de ácido lático. Os diferentes leites fermentados, durante a validade, apresentaram valores de pH, acidez e sólidos totais similares. O perfil e os teores de aminoácidos variaram entre os diferentes tipos de leite fermentado analisados. As amostras continham de 3 a 11 aminoácidos, sendo arginina e asparagina comum a todos. Os teores totais de aminoácidos variaram de 4,2 a 17,8 mg/kg. Apenas a espermidina foi detectada em todos os tipos de produto, em teores similares (0,67 a 0,80 mg/kg).

Depois de ultrapassado o prazo de validade, não houve diferença significativa no pH (exceto uma amostra), acidez total e sólidos solúveis. Houve variação no perfil e teores de aminoácidos e aminas (exceto dois tipos), houve aumento no número de tipos de aminoácidos encontrados (1 a 3 aminoácidos) e duas aminas acumularam.

Os resultados foram submetidos a análise de componentes principais, não havendo um parâmetro aminoácidos livres e aminas bioativas capaz de diferenciar todos os tipos de leite fermentado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 75p.

ALVAREZ, M.; ARRIBAS, V. M. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, p 146-155, 2014.

BORGONOV, T. F.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B.; POIATTI, M. L. Atividade antioxidante de leites fermentados probióticos adicionados de subprodutos de laranja e maracujá. **1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas**. São Paulo, 2016.

BRANDÃO, C. F.; FETT, C. A. Aminoácidos e exercício físico: aplicação para saúde e desempenho físico. **Força-Tarefa de Alimentos Fortificados e Suplementos**. São Paulo, 2016. Cap.6 p.73- 81

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal**. Padrões de identidade e qualidade de leites fermentados. Resolução nº46, de 23/10/2007. Diário Oficial da União, Brasília, 24 out. 2007. Seção I, p. 4.

BUENO, C. F.; MORAIS, C. N.; STROPARO, E. Diagnóstico da fenilcetonúria materna e assessoramento nutricional durante a gestação. **Revista Eletrônica Biotecnologia e Saúde**, Curitiba, n. 15, p. 59-66, 2016.

CARDOZO, M., LIMA, K. S. C.; FRANÇA, T. C. C.; LIMA, A. L. S. Aminas biogênicas: Um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CARNEIRO, C. S.; CUNHA, F. L.; CARVALHO, L. R. de; CARRIJO, K. de F.; BORGES, A.; CORTEZ, A. S. Leites fermentados: histórico, composição, características físico-químicas, tecnologia de processamento e defeitos. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 27, p. 1424, 2012.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B.; CRUZ, A. G.; JUNIOR, C. A. C. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 14, n. 16, p. 1387, 2013.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B.; CRUZ, A. G.; JUNIOR, C. A. C. Determination of biogenic amines by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) in probiotic cow's and goat's fermented milks and acceptance. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 172-178, 2015.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 2392, 2011.

FARFAN, J. A. Os aminoácidos. Química de proteínas, aplicada à ciência e tecnologia de alimentos. 2. ed. Campinas: UNICAMP, p. 17-30, 1994.

- FERNANDES, E. N.; ABREU, C. C.; OLIVEIRA, I. C.; RASMINI, J. P. A.; CUNHA, A. F. Qualidade físico-química de iogurtes comercializados em viçosa (MG). **Anais V SIMPAC – Viçosa**, v. 5, n. 1, p. 519-524, 2013.
- FERREIRA, C. L.; FORTES, L. Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção. Rio de Janeiro. Editora: Rubio, 2012, 248p.
- GABORIAU, F.; VAULTIER, M.; MOULINOX, J. P.; DELCROS, J. G. Antioxidative properties of natural polyamines and dimethylsilane analogues. **Redox Report**, v. 10, n. 1, p. 9-18, 2005.
- GALLINAA, D. A.; ALVESA, A. T. S.; TRENTOA, F. K. H. S.; CARUSIA, J. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Revista do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 13, n. 13, p. 239-244, 2011.
- GEZGINC, Y.; AKYOL, I.; KULEY, E. Ö. F. Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 655-662, 2012.
- GLÓRIA, M. B. A. Bioactive Amines. In: HUI, Y. H. **Handbook of Food Science Technology and Engineering**. v. 1. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006, p.13-38.
- GLORIA, M .B. A.; VIEIRA, S. M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food Science and Technology**. v. 1, p. 258-270, 2007.
- GOMES, M. B.; PIRES, D. P.; FRACALANZZA, S. A. P.; AUGUSTUS, V. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1123-1134, 2014.
- HUERTAS, R. A. P. Yogur en la salud humana. **Revista Lasallista Investigación**, v. 9, n. 2, p. 162-177, 2012.
- LADERO, V.; CALLES-ENRÍQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, p. 145-156, 2010.
- LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. **Ciência Tecnologia Alimentar**, v. 33, p. 70-79, 1999.
- LINARES, D.; RIO, B. del; REDRUELLO, B.; LADERO, V.; FERNADEZ, M.; RUAS-MADIEDO, P.; ALVAREZ, M. Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. **Food Chemistry**, p. 658-663, 2016.
- MEDEIROS, E. J. L.; LIMA, A.R. C.; MOURA, M. D.; MOREIRA, R. T. Leite fermentado de marcas comerciais: estudo da aceitação e correlação com pH e acidez. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes** v. 381, n. 66, p. 46-51, 2011.

MILKPOINT, 2015. Estudo do Rabobank estima que consumo per capita de lácteos deve ficar estagnado no Brasil. **MILKPOINT** – Disponível em:< <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/estudo-do-rabobank-estima-que-consumo-per-capita-de-lacteos-deve-ficar-estagnado-no-brasil-98136n.aspx>> Acesso em 14 jun. 2018.

MILKPOINT, 2016. Mercado global de iogurtes de beber expandirá US\$ 13 bilhões nos próximos quatro anos. **MILKPOINT** – Disponível em:< <http://www.milkpoint.com.br/industria/cadeia-do-leite/giro-de-noticias/mercado-global-de-iogurtes-de-beber-expandira-us-13-bilhoes-nos-proximos-quatro-anos-98857n.aspx> 12/2/2016> Acesso em 11 jan. 2018.

MILKPOINT, 2017. Deve ter menos sobressaltos no mercado de lácteos. **MILKPOINT**-Disponível em:<<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/2017-deve-ter-menos-sobressaltos-no-mercado-de-lacteos-103367n.aspx>> Acesso em 11 jan. 2017.

MOHAMMED, G. I.; BASHAMMAKH, A. S.; ALSIBAAI, A. A.; ALWAEEL, H. M. S. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 84-94, 2016.

MOREIRA, G. M. M; SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; PAULA, J. C. J.; FERNANDES, C.; GLÓRIA, M. B. A. Parâmetros de desempenho em método uhplc-uv para quantificação de aminoácidos livres e aminas bioativas em queijos mussarela, prato, parmesão e gorgonzola. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 4, p. 192-204, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 72-81 p.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009.

ONAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007.

RIBEIRO, M. M.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A.; ARRUDA, A. C.; CERESINO, E. B.; CARNEIRO, H. C. F.; CIPRIANO, P. A. Estudo de mercado de iogurte da cidade de Belo Horizonte/MG. **Revista Ceres**, v. 57, n. 2, p. 151-156, 2010.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 4, p. 201-202, 2008

SASAKI, S.; OHTA, T.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of water-soluble fractions of salmon sperm tissue. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1682-1686, 1996.

SCHUMACHER, R. L.; GARDIN, J. P. P.; COLIMO, A. G. S. C.; BETTONI, J. C.; MESSERSCHMIDT, I. Compostos nitrogenados do vinho: fatores envolvidos na formação de aminoácidos e aminas biogênicas. **Evidência, Joaçaba** v. 12 n. 2, p. 137-154, julho/dezembro 2012.

SILVA, L. M.; TORRE, C. A. L.; MÁRSICO, E. T.; MANO, S. B.; JÚNIOR, C. A. C. Aminas biogênicas como indicadores de qualidade e salames e produtos cárneos fermentados. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 69, 2013.

SPANO, G.; RUSSO, P.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; ALEXANDER, H.; GRANDVALET, C.; COTON, E.; COTON, M.; BARNAVON, L.; BACH, B.; RATTRAY, F.; BUNTE, A.; MAGNI, C.; LADERO, V.; ALVAREZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; LOPEZ, P.; de PALENCIA, P. F.; CORBI, A.; TRIP, H.; LOLKEMA, J. S. Biogenic amines in fermented foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64(Supl. 3), p. S95-S100, 2010.

TAVARES, H. F. M.; VANNUCCHI, H. Aminoácidos: funções e segurança. **Força-Tarefa de Alimentos Fortificados e Suplementos**. São Paulo, 2016. Cap. I. p. 13-36.

TIRAPEGUI, J.; ROGERO, M. M. Metabolismo de proteínas. **Fisiologia da Nutrição Humana. Aspectos Básicos, Aplicados e Funcionais**. São Paulo, 2007. 2 ed. Cap.VI. p. 70-109.

UBALDO, J. C. S.; CARVALHO, A. F.; FONSECA, L. M.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines in mozzarella cheese from milk with varying somatic cell counts. **Food Chemistry**, v. 178, p. 229-235, 2015.