

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

***AMINAS BIOGÊNICAS E POLIFENÓIS NO LEITE E QUEIJO DE
OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA SUPLEMENTADAS COM
ÓLEO OU FARELO DE LINHAÇA (*Linum usitassimum* L.)***

ALINE APARECIDA DE OLIVEIRA MONTANHA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de doutor.

BOTUCATU - SP
Março – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

***AMINAS BIOGÊNICAS E POLIFENÓIS NO LEITE E QUEIJO DE
OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA SUPLEMENTADAS COM
ÓLEO OU FARELO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.)***

ALINE APARECIDA DE OLIVEIRA MONTANHA

Zootecnista

Orientadora: Prof^ª. Dra. ANA SILVIA ALVES MEIRA TAVARES MOURA

Co-orientadora: Dra. SIMONE FERNANDES

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de doutor.

BOTUCATU - SP
Março – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
- UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M764a Montanha, Aline Aparecida de Oliveira, 1984-
Aminas biogênicas e polifenóis no leite e queijo de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) / Aline Aparecida de Oliveira Montanha. - Botucatu : [s.n.], 2016
xiii, 68 f. : tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016

Orientador: Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura

Coorientador: Simone Fernandes

Inclui bibliografia

1. Fenóis. 2. Ovino. 3. Poliaminas. 4. Aminas biogênicas. I. Moura, Ana Silvia Alves Meira Tavares. II. Fernandes, Simone. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

*“A grandeza de uma nação e seu progresso moral podem ser julgados pela forma
como seus animais são tratados”
(Mahatma Gandhi)*

DEDICO

A minha querida mãe, Aparecida!

Pelo amor incondicional verdadeiro e puro,
pelos belos ensinamentos, compreensão e paciência,
sempre me apoiando e aconselhando em todas as
decisões , e nunca deixando eu desistir dos
meus sonhos.

Ao meu querido pai, Rubens! Pela disponibilidade, amor e
carinho, pelos conselhos em todos os momentos e
sempre acreditando na minha capacidade.

Aos meus queridos irmãos André e Júlio,
pela dedicação e carinho, sempre me
apoiando e incentivando a nunca
desistir dos meus sonhos.

Ao meu esposo, André!

Por estar sempre presente em todos
os momentos, sempre com muito amor,
dedicação e paciência nos momentos
de minha ausência .

Ao meu bebê!

Que mesmo antes de nascer
já nos trouxe uma imensa alegria.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida! Pela oportunidade de possibilitar o meu crescimento e ao meu mentor por sempre me guiar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e ao Departamento de Produção Animal - FMVZ/UNESP-Botucatu pela confiança e oportunidade.

À professora, orientadora Dra. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura, pelos ensinamentos, amizade e pela oportunidade nessa etapa do meu crescimento, confiando sempre no meu potencial.

Ao professor, orientador e amigo Dr. Edson Ramos de Siqueira, por mais uma vez ter me concedido a oportunidade de realizar mais essa etapa de minha vida, pelos belos conselhos, ensinamentos e dedicação, e pela bela amizade.

À professora, co-orientadora Dra. Simone Fernandes, por toda a dedicação, paciência em me escutar em todos os momentos sendo sempre muito prestativa, e disposta a ajudar no que fosse necessário, uma grande amiga.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Dra. Maria Márcia Sartori pela realização das análises estatísticas.

À professora Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima pela contribuição e participação na banca de qualificação e defesa e por toda ajuda e colaboração nas análises realizadas no laboratório.

Ao professor Paulo Roberto de Lima Meirelles, pela contribuição e participação na banca de qualificação e defesa e por toda colaboração nas análises bromatológicas.

A professora Dra. Sarita Bonagurio Gallo, pela participação na banca de defesa e por toda a ajuda.

A professora Pricila Veiga dos Santos, pela participação na banca de defesa e por toda a ajuda.

Ao Zootecnista Dr. José Dalanezi, sendo sempre muito solícito.

Ao professor Dr. Paulo Francisco Domingues, que sempre quando necessário estava dispostos a me auxiliar e a esclarecer as dúvidas durante o experimento.

Ao Zootecnista André Michel de Castilhos pela disponibilidade e atenção de auxiliar e tirar as dúvidas durante todo o experimento.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação Seila Cristina Cassinelli Vieira e Ellen C. Guilhen pela atenção em auxiliar sempre que necessário.

Ao funcionário do Departamento de Produção Animal, Renato Agostinho Arruda por toda ajuda.

Aos Funcionários do setor de Ovinos, Edivaldo e Marco, pela amizade, conversas, conselhos, risadas e pela dedicação ímpar, sempre muito solícitos e disponíveis.

À funcionária Gisele do laboratório de Bromatologia pelo auxílio na realização das análises bromatológica das amostras.

À Raquel Ornelas, pela ajuda sempre que precisei.

Aos amigos do laboratório de química: Marizete, Kelly, Ana Paula, Milena, Marla, Mônica, Sérgio, Mayra, Igor, por toda ajuda.

Aos amigos da Pós-graduação: Maria Fernanda, Natália, Guilherme e Ariane pela grande colaboração a qualquer momento, pelas risadas, tristezas, choros e pela amizade!

À estagiária Jéssica Aparecida Marques, sempre disponível e mostrando muita dedicação.

As estagiárias da graduação pela ajuda quando solicitadas: Caroline e Laura.

Aos meus pais, irmãos e a Vó Cema, minha família amada, sempre me orientando!

Aos meus sobrinhos Júlia, Guilherme, Isadora e Beatriz, anjinhos mandados por Deus, que encantam todo dia com suas alegrias e peraltices.

Ao meu esposo André, sempre muito prestativo e atencioso em auxiliar no que fosse preciso e participar nas ordenhas de finais de semana.

As ovelhas, pois sem elas nada seria possível!

Aos meus queridos e companheiros cães: Tupã, Miucha, Zeus, Feijão, Princesa, Lost, Tobias, Branquinho e Tipler pelas lambidas que demonstram todo o carinho!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1.0.Introdução.....	2
2.0.Revisão Bibliográfica	3
2.1. O leite ovino e sua composição	3
2.2. Queijo Ovino	5
2.3. Linhaça	6
2.4. Compostos antioxidantes	8
2.4.1. Aminas biogênicas.....	8
2.4.2. Compostos fenólicos.....	13
Referências Bibliográficas	16
CAPÍTULO II - AMINAS BIOGÊNICAS E POLIFENÓIS NO LEITE DE OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA SUPLEMENTADAS COM ÓLEO OU FARELO DE LINHAÇA (<i>Linum usitatissimum L.</i>)	24
Resumo	25
Abstract	26
Introdução.....	27
Material e Métodos	28
Resultados e Discussão	33
Conclusão	40
Referências Bibliográficas	41
CAPÍTULO III – TEORES DE AMINAS BIOGÊNICAS E POLIFENÓIS NO QUEIJO CURADO ELABORADO COM LEITE DE OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA SUPLEMENTADAS COM ÓLEO OU FARELO DE LINHAÇA (<i>Linum usitatissimum</i> <i>L.</i>)	44
Resumo	45

Abstract	46
Introdução.....	47
Material e Métodos	49
Resultados e Discussão	54
Conclusão	63
Referências Bibliográficas	64
CAPÍTULO IV - IMPLICAÇÕES	67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Página
Tabela 1. Funções das aminas biogênicas	10
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Ingredientes e nutrientes das dietas experimentais	30
Tabela 2. Composição do leite de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça	33
Tabela 3. Teores médios (%) de aminas biogênicas no leite de ovelhas da raça Bergamácia	34
Tabela 4. Conteúdo de aminas biogênicas e poliaminas presentes no leite de ovelhas da raça Bergamácia	35
Tabela 5. Correlação entre os teores de aminas biogênicas no leite de ovelhas da raça Bergamácia	38
Tabela 6. Conteúdo de polifenóis totais (mg Eq. Catequina/100g) do leite de ovelha da raça Bergamácia, em função dos momentos de colheitas	39
Tabela 7. Correlação entre os teores de polifenóis e aminas biogênicas no leite de ovelhas da raça Bergamácia	40
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Ingredientes e nutrientes das dietas experimentais	50
Tabela 2. Valores encontrados na análise microbiológica dos queijos	55
Tabela 3. Conteúdo de aminas biogênicas e poliaminas presentes no queijo feito com leite de ovelhas da raça Bergamácia em função da interação dos tratamentos e período de maturação	57
Tabela 4. Correlação entre os teores de aminas biogênicas no queijo realizado com o leite de ovelhas da raça Bergamácia	61

Tabela 5. Conteúdo de polifenóis totais (mg Eq. Catequina/100g) presentes no queijo feito com leite de ovelhas da raça Bergamácia em função da interação dos tratamentos e período de maturação	62
Tabela 6. Correlação entre os teores de polifenóis e aminas biogênicas no leite de ovelhas da raça Bergamácia	62

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Vias metabólicas das aminas biogênicas	09
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAD – Cadaverina
CLA – Ácido Linoléico Conjugado
CEUA – Comissão de Ética e Experimentação Animal
CT – Controle
DPM – Dopamina
EE – Extrato Etéreo
EM – Energia Metabolizável
EPD – Espermidina
EPM – Espermina
FDA – Fibra em Detergente Ácido
FDNcp – Fibra em Detergente Neutro corrigida para cinzas
FDNef – Fibra em Detergente Neutro efetiva
FL – Farelo de linhaça
g – grama
HIM – Histamina
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
IMAO - Inibidores de Monoamina Oxidase
Kg – Quilograma
mg – Miligrama
mL – Mililitro
MM – Matéria Mineral
MS – Matéria Seca
NDT – Nutrientes Digestíveis Totais
NMP – Número mais provável
NRC – National Research Council
OL – Óleo de linhaça
OPG – Ovos por Grama
PB – Proteína Bruta

PM – Proteína Metabolizável

PUT – Putrescina

SDG – Secoisolariciresimal diglicosídeo

SRT – Serotonina

TIM – Tiramina

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

O leite de ovelha é mundialmente apreciado pelas suas qualidades gastronômicas e nutricionais, sendo que a maior parte da produção é transformada em queijos e iogurtes. São características de destaque do leite de ovelha os teores de proteínas, cálcio, fósforo e lipídeos de alta qualidade, podendo esta composição ser alterada por fatores como: dieta, raça, características individuais, sazonalidade, nutrição, condições de manipulação, condições ambientais e estágio da lactação (HAENLEIN, 2001). Outro fator importante é a proporção de gordura e proteínas que é maior que a do leite de vaca e, o que proporciona maior rendimento em queijo (CAMPOS, 2011).

O consumo de alimentos saudáveis está aumentando a cada dia devido à consciência dos consumidores em buscar uma vida mais saudável. Para melhorar a qualidade do leite, uma das alternativas é alterar sua composição para torná-lo mais saudável. A utilização de suplementos na dieta de animais leiteiros com óleo ou farelo de sementes oleaginosas como a linhaça (rica em ácido linoléico conjugado, ômega 3 e ômega 6), vem se tornando mais comum. Vários estudos já realizados demonstraram a importância dessa suplementação na alteração dos ácidos graxos, inclusive com o aumento do CLA (ácido linoléico conjugado). Em experimento realizado por Oliveira (2012), observou-se aumento no teor de CLA em leite de ovelhas suplementadas com óleo de linhaça em relação ao tratamento controle. Porém, pouco se sabe se outros componentes podem ser alterados, como é o caso dos antioxidantes, já que a semente de linhaça é rica nessas substâncias.

Outro grupo de compostos de importância é dos polifenóis, substâncias distribuídas amplamente na natureza e que exercem função de antioxidantes quando em quantidades consideráveis nos alimentos. Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000).

Sendo assim podem-se destacar as aminas biogênicas. As aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular, de importância biológica em vegetais, animais e células microbianas, formadas principalmente pela descarboxilação microbiana de aminoácidos e transaminação de aldeídos e cetonas (PINTADO et al., 2008). As aminas são classificadas de acordo com o número de seus grupos. Dentre elas destacam-se:

cadaverina, putrescina, espermina, espermidina, histamina, tiramina e serotonina, cada uma com sua função específica no organismo. Sabe-se que o excesso de certas amins, como a tiramina e histamina, principalmente em queijos maturados, podem provocar alergia e intoxicação alimentar, e a cadaverina e putrescina, quando em grandes quantidades, podem intensificar os teores de histamina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O leite ovino e sua composição

De acordo com a Faostat (2016), a produção de leite ovino no mundo é de aproximadamente 10.122.522 toneladas contra 625.754.261 toneladas de leite de vaca e representa 1,34% da produção de leite mundial. Os países da Ásia, como China e Turquia e os países da Europa como Grécia, Itália, Espanha e França se destacam como produtores mundiais de leite ovino. Porém, para o Brasil, não são encontrados dados dessa produção.

No Brasil, a ovinocultura leiteira tem pouca expressão no mercado, mas relatos bem sucedidos são encontrados entre os criadores da Serra Gaúcha, que investiram no alto valor agregado do leite ovino (BRITO, 2004). Dados de 2008 estimaram um processamento nacional de aproximadamente 509.000 litros por ano, o que corresponde a aproximadamente 526 toneladas, e representa 0,0019% do total de leite produzido no Brasil, sendo que, desse valor, a maior parte é produzida no Sul do país (ROHENKOHL et al., 2011). Embora, em termos quantitativos, a produção de leite de ovelha seja de importância marginal em comparação ao leite de vaca, é de grande interesse o incremento do seu consumo e de seus derivados, visto que os ovinos são animais amplamente adaptados aos mais diversos climas e disseminados por todo o planeta (CAMPOS, 2011).

Grande parte do leite ovino é transformada em queijos, iogurtes e outros derivados, devido a sua alta concentração de sólidos totais, gordura e caseína, aumentando o valor agregado, e contribuindo para o aumento da receita do produtor rural (OCHOA – CORDERO et al., 2002). Segundo Bencini e Pulina (1997), a maioria do leite de ovelha produzido em todo o mundo é transformada em queijo, visto que o

leite de ovelha fresco raramente é consumido. Sendo assim, quando se refere à qualidade do leite de ovelha está se elucidando a sua capacidade de ser transformado em produtos lácteos de alta qualidade e com altos rendimentos.

Vários desses produtos possuem registro de indicação geográfica, ou seja, denominação de origem, a qual é caracterizada pelo nome geográfico do país, cidade, região ou localidade de seu território, que indiquem que as características ou qualidade do produto sejam exclusivamente do meio geográfico, como é o caso dos queijos de ovelha portugueses com Denominação de Origem Protegida (ROHENKOHL et al., 2011).

O rendimento diferenciado do leite de ovelha deve-se à sua composição média: 7,6% de gordura, 5,6% de proteína, 19,0% de sólidos totais, 10,3% de sólidos desengordurados, 4,7% de lactose e 4,6% de caseína (SEVI et al., 2004; SILVA, 2003; NUDDA et al., 2002; ZAMIRI et al., 2001; HILALI et al., 2011). Sá (2001) encontrou teores médios de gordura e proteína de 5,39% e 4,92% respectivamente, com ovelhas da raça Bergamácia. Oliveira (2012) encontrou teores de gordura de 4,75% na ordenha da manhã e 6,97% na ordenha do período da tarde, utilizando ovelhas da raça Bergamácia. Contudo, valores diferentes são encontrados na composição do leite de vaca: 3,7% de gordura, 3,2% de proteína, 4,5% de lactose, 12,5% de sólidos totais e 8,8% de sólidos desengordurados (SANTOS, 2001).

Além da alimentação, a composição do leite também pode ser influenciada por certos fatores como: raça, idade, estágio de lactação, número de cordeiros em aleitamento, nível nutricional, ambiente, técnicas de ordenha, estado sanitário e infecções no úbere (BENCINI, 2001).

De acordo com Oliveira (2012), não foi observada diferença na produção de leite em ovelhas que receberam tratamento controle e com suplementação de óleo de linhaça, do mesmo modo que os tratamentos também não influenciaram a composição centesimal do leite. A produção de leite e seus teores de proteína e lactose não diferiram entre as vacas que receberam dietas com os sais de cálcio e óleo de canola, linhaça e soja em relação aquelas da dieta controle, no entanto, houve redução na gordura do leite nos animais alimentados com a dieta com adição de sais de cálcio e ácidos graxos insaturados (CHOUINARD et al., 1998). Segundo Bertoni (1996), é bastante conhecido que a qualidade do leite e o seu rendimento dependem necessariamente da dieta; cuja

evidência é particularmente importante para ovelhas leiteiras (CHRISTENSEN et al., 1994).

O leite também contém substâncias biogênicas as quais podem transmitir mensagens bioquímicas com implicações benéficas para a saúde. E essa contribuição nutricional do leite e de seus derivados é um importante suporte para as funções do corpo, especialmente durante o crescimento (GALITSOPOULOU et al., 2015). Dentre essas substâncias bioativas é que se encontram as amins biogênicas e as poliaminas que estão presentes no leite e em seus derivados.

O estado nutricional do animal e a ingestão de alimentos também podem influenciar a composição do leite e a variação da quantidade de poliaminas (BUTS, 1996). Outros fatores também podem afetar a concentração de poliaminas no leite, como: idade, ritmo de secreção de poliaminas, duração da lactação, influências ambientais, e contaminações bacterianas (BUTS et al., 1995; MOTYL et al., 1995; BUTS, 1996).

Além das poliaminas outros compostos podem ser encontrados no leite: os compostos fenólicos. Segundo O'Connel e Fox (2001), os polifenóis são encontrados em quantidades consideráveis no leite de ruminantes, porém a sua relevância na qualidade nutricional do leite e na saúde humana ainda não foi elucidada.

2.2. Queijo ovino

A composição do leite tem grande importância no seu processamento, principalmente quando se leva em conta a capacidade de sua transformação em derivados e a quantidade produzida desses derivados por litro de leite (BENCINI & PULINA, 1997). Outro fator importante é a qualidade do leite em relação a sua composição centesimal, que deve ser considerada pela capacidade de ser transformado em queijos e derivados, haja vista a importância da composição no rendimento dos produtos (BENCINI & PULINA, 1997).

Sabe-se que a maior parte do leite de ovelha produzido no mundo é transformado em queijo, e alguns dos mais populares queijos do mundo, como Roquefort da França, o Feta da Grécia, o Ricotta e o Pecorino da Itália e o Manchego da Espanha, são provenientes de leite ovino (EMEDIATO, 2007). No Brasil a produção de leite e queijo de ovelhas é muito pequena, a grande parte dos queijos produzidos são de

leite de vaca, pois faltam incentivos para a produção de queijos de leite de ovelha e o desenvolvimento de raças especializadas em produção de leite (NARDES, 2002).

O queijo, desde antes da sua fabricação até o final de sua vida de prateleira, sofre inúmeras transformações físico-químicas que são decisivas para a consistência, textura e sabor do produto (NATEL, 2007). Os principais agentes responsáveis pela proteólise durante a maturação do queijo são as enzimas endógenas do leite, resíduo coagulante retido no coalho depois da fabricação e as enzimas proteolíticas de bactérias precursoras e não precursoras (TRUJILLO et al., 2000).

Muitas substâncias formadoras do sabor que estão presentes no leite de ovelhas são, provavelmente, originadas por intensas mudanças nos compostos do alimento durante a digestão e no metabolismo intermediário provenientes de processos microbianos e enzimáticos (ADDIS et al., 2006).

Suplementar a dieta de ruminantes com lipídeos pode alterar o sabor dos alimentos por interferir no processo de biohidrogenação ruminal, que possibilita mudanças ou modificações da fração volátil do leite (DELACROIX-BUCHET & LAMBERET, 2000). Queiroga et al. (2009), analisaram a inclusão de diferentes tipos e níveis de óleos na dieta de cabras, e verificaram que a adição de óleos vegetais, em particular o óleo de algodão, elevou o conteúdo de gordura, bem como intensificou o sabor característico do leite caprino.

2.3. Linhaça

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.), pertence à família Linaceae, (MADHUSUDHAN, 2009) é nativa da Europa, Ásia e Região Mediterrânea (CORDEIRO et al., 2009). A semente é considerada um alimento funcional e a variedade mais comum é a semente de cor marrom escura brilhante. É rica em substâncias benéficas à saúde (CORDEIRO et al., 2009), considerada uma fonte natural de antioxidantes (KASOTE, 2013), podendo ser encontrada nas formas de óleo e farelo (MADHUSUDHAN, 2009).

De acordo com Almeida et al. (2009), a linhaça é uma semente rica em proteínas, gordura e fibras dietéticas. Estudos demonstram que a linhaça pode apresentar 40-50% de óleo, 23-43% de proteína, 4% de cinzas, e 0,9-3% de precursores da lignana (MUIR & WESTCOTT, 2003; TOUR'e & XUEMING et al., 2010). Além

do mais, é uma excelente fonte de gordura poliinsaturada na forma de ácido α -linolênico e é a fonte mais rica de lignanas nos vegetais (THOMPSON et al., 1991), (compostos fenólicos conhecidos por exercerem atividade antioxidante), e representam uma das maiores fontes de ácidos graxos essenciais da série ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) (SAAD, 2006).

Devido à alta concentração de ácidos graxos essenciais ômega-3 (ω -3), ácido α -linolênico, fibras e antioxidantes fenólicos naturais, dia após dia a incorporação da linhaça nos alimentos e nos produtos alimentícios vem aumentando (PRASAD et al., 1998).

Os compostos fenólicos ocorrem nas sementes oleaginosas como derivados hidroxilados dos ácidos benzóicos e cinâmico, cumarinas, flavonóides e lignanas (OOMAH, 2001). Os compostos fenólicos apresentam uma importante classe de lignanas que pertencem a um grupo de fenóis que são caracterizados por acoplarem duas unidades de fenilpropanóides (WILLFOR et al., 2006). Na semente de linhaça o secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG), é o precursor mais conhecido da lignana (THOMPSON et al., 1996).

A lignana é o produto da transformação da lignina em compostos fenólicos, e é metabolizada no intestino humano pelas bactérias intestinais formando o enterodiol e a enterolactona, as quais são estruturas semelhantes aos estrógenos. Esses compostos possuem propriedades biológicas como: ação antimetabólica, antifúngica, antioxidante e anticarcinógeno. São potentes inibidores de atividade plaquetária e mediadores das reações inflamatórias (THOMPSON et al., 1996; BENNET, 1998; BRZEZINSKI & DEBI, 1999).

Para ruminantes, o uso da semente de linhaça mostra-se interessante no sentido de aumentar os níveis de ácidos graxos poliinsaturados na carcaça (WACHIRA et al., 2000; WADA, 2004; MÜLLER et al., 2004 e YAMAMOTO et al., 2005). A utilização de óleos na alimentação animal é de grande interesse, buscando a produção de compostos alimentares benéficos à saúde humana (COSTA, et al., 2009), e elaborando produtos diferenciados para o consumidor. Bernard et al. (2009) ao avaliarem os efeitos de dietas com óleos vegetais em cabras, observaram que realçaram a síntese da gordura do leite, alteraram a composição dos ácidos graxos do leite e inibiram especificamente a atividade mamária da enzima esteroil-CoA desaturase.

A atividade da microbiota nos ruminantes em relação a conversão das lignanas nos mamíferos ainda é desconhecida. Grandes concentrações de lignanas podem resultar em benefícios para a saúde, porém necessita-se de mais informações que permitam a compreensão da modificação nas concentração de lignanas no leite (PETIT, 2009).

Diante desses fatos e da necessidade em atender à crescente demanda por alimentos mais saudáveis, aumentou o interesse nas pesquisas que relacionam o uso de óleos ou sementes, entre eles o de linhaça, na alimentação animal (LUNA et al., 2005; ZHANG et al., 2006; BRANCIARI et al., 2012).

2.4. Compostos antioxidantes

2.4.1. Aminas biogênicas

As aminas biogênicas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular. São substâncias formadas por processos bioquímicos. Participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos e desempenham diversas atividades biológicas. As aminas podem ser encontradas em alimentos de origem animal, vegetal e, principalmente, em alimentos fermentados e maturados (HALÁSZ et al., 1994; MAYER et al., 2010).

Quanto à estrutura química, as aminas biogênicas são classificadas em: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina e triptamina). Existem também outras classificações para as estruturas químicas, como as catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolinas (serotonina) e as imidazolaminas (histamina) (ONAL, 2007; BARDÓCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996).

Segundo Glória (2005), a maioria das denominações das aminas biogênicas é em função dos aminoácidos precursores (Figura 1), 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, local onde foram isoladas pela primeira vez.

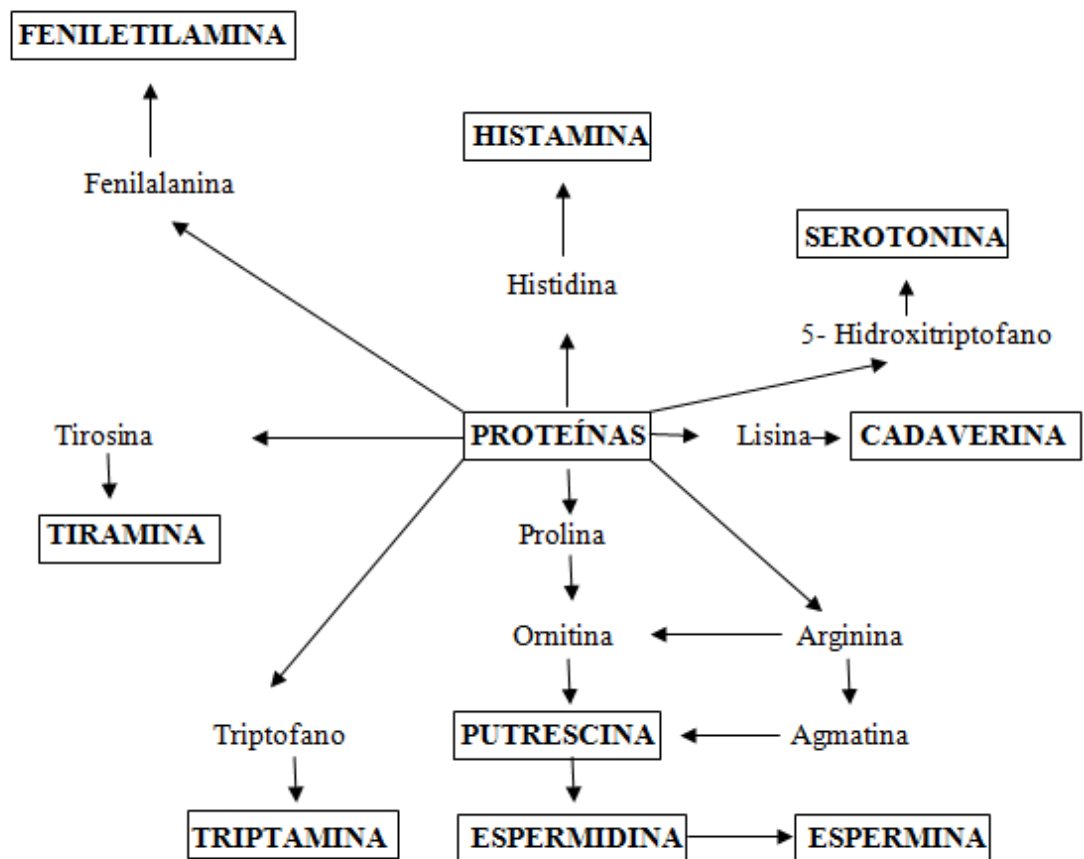


Figura 1: Vias metabólicas das aminas biogênicas.

FONTE: Glória, 2005.

As aminas biogênicas também são classificadas de acordo com o número de grupamento de aminas em: monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina e cadaverina) e em poliaminas (espermina, espermidina e agmatina) (GLÓRIA, 2005).

Em relação à via biossintética, as aminas são classificadas em naturais e aminas biogênicas. As aminas naturais (espermina, espermidina, putrescina e histamina), são formadas durante a biossintese “*de novo*”, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina). Ou, como no caso da histamina, podem estar armazenados nos mastócitos e basófilos. Já 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; GLÓRIA, 2005, MAYER et al., 2010).

Com relação à função que exercem (Tabela 1), as aminas biogênicas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento como é o caso da espermidina e espermina, que atuam no crescimento e manutenção do metabolismo celular, e em vasoativas e neuroativas, como a tiramina, histamina e serotonina, devido ao seu efeito atuar nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ et al., 1993).

Tabela 1. Funções das aminas biogênicas.

Aminas biogênicas	Funções
	Metabolismo, crescimento e diferenciação celular.
Espermidina	Regulação e estimulação da síntese de DNA, RNA e proteínas.
Espermina	Manutenção da alta atividade metabólica para um funcionamento saudável do intestino.
	Protetor celular contra o estresse oxidativo.
Putrescina	Recicladores de radicais livres.
Cadaverina	Deterioração de alimentos.
	Vaso e Broncoconstritor.
Serotonina	Neutransmissores.
	Estimulação dos neurônios sensoriais e motores.
Histamina	Liberação de adrenalina e noradrenalina.
Tiramina	Aumenta a pressão sanguínea.
Triptamina	Vasoconstritor.
Feniletilamina	

Fonte: Bardócz et al., (1993); Loser (2000); Glória, (2005); Tkachenko et al., (1991); Goldeberg et al., (1994); Shalaby, (1996).

As poliaminas são consideradas essenciais para jovens em crescimento e desenvolvimento. As poliaminas espermidina, putrescina e espermina estão envolvidas

na síntese de DNA, RNA e de proteínas, sendo essenciais para o crescimento e proliferação celular, porém também estão relacionadas à toxidade e a doenças em humanos, como o câncer (BARDÓCZ, 1995). De acordo com Lindemose et al. (2005), as concentrações de poliaminas estão aumentadas em células cancerosas. E as aminas biogênicas, quando em altas concentrações, nas dietas, podem causar intoxicações principalmente na presença da histamina (LIMA & GLÓRIA, 1999).

Segundo Rice et al. (1976) a tiramina possui função vasoativa e a histamina vasoativa e neuroativa e resultam em efeitos tóxicos quando encontradas em altas concentrações na dieta, ocasionando dores de cabeça, náuseas, palpitações cardíacas entre outros. Aminas neuroativas afetam o sistema nervoso agindo nos transmissores neurais, enquanto as vasoativas agem no sistema vascular (LOVENBERG, 1973). Em indivíduos saudáveis, a putrescina e a cadaverina, não são consideradas tóxicas, embora possam potencializar a toxicidade da histamina. Portanto, níveis normais de poliaminas nos alimentos não são tóxicos, enquanto a histamina em altas concentrações é tóxica (BARDÓCZ, 1995). Nem todas as aminas são igualmente tóxicas, apenas a histamina, tiramina e 2-feniletilamina é que representam maiores preocupações, podendo ser encontradas em peixes, carnes, aves, ovos, queijos, vegetais fermentados, soja, cerveja e vinho (SHALABY, 1996).

A demanda corporal de poliaminas é suprida principalmente pela dieta e a diminuição da ingestão destas pode vir a reduzir a progressão do tumor (BARDÓCZ et al., 1995). As concentrações e teores de poliaminas variam de acordo com os alimentos, segundo alguns autores a carne vermelha e a de frango contém maior quantidade de espermina; a carne de peixe contém putrescina. Em relação ao leite de vaca e ao iogurte, o teor total de poliaminas encontrado foi baixo (ELIASSEN et al., 2002; KALAC & KRAUSOVÁ, 2005).

O leite é rico em uma variedade de nutrientes essenciais, como vitaminas, minerais e proteínas, além disso, o leite contém substâncias bioativas capazes de transmitir mensagens bioquímicas com implicações significativas para a saúde. A contribuição nutricional do leite e seus derivados é importante para apoiar o bom funcionamento do corpo durante períodos de rápido crescimento (MICHAELIDOU, 2008; MICHAELIDOU & STEIJNS, 2006).

Löser (2000) detectou a presença de espermina, espermidina e putrescina no leite de vaca, e observou que a concentração das poliaminas sofreu variações devido a alguns fatores, como: idade do animal, período de lactação, estado nutricional, fatores genéticos, fatores ambientais e contaminação bacteriana.

Em geral, os teores de aminas presentes no leite e nos derivados são baixos, exceto para os queijos que possuem altos níveis. Em leite de vacas, as poliaminas predominante são: espermina (17%), espermidina (15%) e agmatina (3%) (BARDÓCZ et al., 1993). Produtos lácteos fermentados e em especial queijos, pertencem às fontes mais comuns de aminas biogênicas, principalmente a histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (BUNKOVÁ et al., 2010). Além disso, queijos com alto teor de aminas podem estar relacionados com enxaqueca pediátrica e na adolescência (KOMPRDA et al., 2007; MILLICHAP & YEE, 2003).

Vale e Glória (1998), ao avaliarem amostra de vários queijos feitos no Estado de Minas Gerais, Brasil, observaram que a poliamina espermina foi a mais predominante, sendo encontrada em 93% das amostras coletadas, seguido pela histamina (65%), feniletilamina (62%), espermidina (61%), putrescina (60%), cadaverina (59%), serotonina (44%), agmatina (38%), tiramina (37%) e triptamina (29%).

Em experimento realizado por Novella-Rodríguez et al. (2003), utilizando vários tipos de queijo maturados e não maturados, foi verificado maior formação de aminas em queijos maturados, prevalecendo a amina tiramina, seguida da putrescina ou cadaverina, o que corroboram com Kalac e Krausová (2005), onde a concentração de aminas pode alcançar valores elevados em queijos maturados.

Schirone et al. (2013), em análises realizadas em queijos Pecorino, feitos com leite de ovelha, cru e pasteurizado, encontraram um total de 266,7 a 5860,6 mg/kg de aminas biogênicas em queijos fabricados com leite cru e 10,3 a 582,4 mg/kg no leite pasteurizado. Sendo assim, a pasteurização do leite antes de produzir queijos é um importante passo para reduzir o teor de aminas biogênicas.

De acordo com Foster et al, (1958); Joosten e Olieman, (1986), durante a maturação do queijo, a caseína é lentamente degradada por enzimas proteolíticas, levando a um aumento no teor de aminoácidos livres, os quais podem ser submetidos a quebras de reações e catalisados por bactérias descarboxilases específicas dando origem a formação de CO₂ e uma amina. De acordo com Degheidi et al. (1992), as aminas

biogênicas são gradualmente aumentadas em diferentes níveis, quando o tempo de maturação é estendido especialmente a histamina, putrescina e cadaverina.

Sendo assim vários fatores podem influenciar nos teores de aminas biogênicas em queijos maturados, tais como: pasteurização ou a falta da mesma (NOVELLA-RODRÍGUES et al., 2003), condições de higiene durante a produção dos queijos (KOMPRDA et al., 2007), culturas iniciadoras (ROIG-SAGUÉS et al., 2002), tempo de maturação (KOMPRDA et al., 2007) e a parte que é coletada do queijo (NOVELLA-RODRÍGUES et al. 2003); (KOMPRDA et al., 2007).

2.4.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo os grupos funcionais (LEE et al., 2005). Podem ser encontrados em estado livre, conjugados com açúcar, estéres ou polimerizado (SHAHIDI, 2000). Existem cerca de cinco mil fenóis, dos quais destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI & NACZK, 1995). Entre estes, os ácidos fenólicos e os flavonóides são os mais comuns (DE BEER et al., 2002; DYKES & ROONEY, 2007).

Os compostos polifenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, e são formados em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK & SHAHIDI, 2004). Nos vegetais, atuam ainda como agentes antipatogênicos e contribuem na pigmentação (SHAHIDI & NACZK, 1995), enquanto em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma (PELEG et al., 1998) e estabilidade oxidativa (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Segundo Nackz e Shahidi (2004), os polifenóis não estão distribuídos uniformemente nos tecidos ou células das plantas, e estão relacionados com componentes da parede celular como os polissacarídeos e as proteínas. Os compostos fenólicos são excelentes fontes naturais de antioxidantes e são conhecidos por neutralizarem o excesso de radicais livres e anular os efeitos patológicos.

Os compostos fenólicos compreendem um grande grupo de substâncias orgânicas, sendo os flavonoides um importante subgrupo (SCHWARTZ et al., 2010). Os flavonoides são compostos distribuídos no reino vegetal e encontram-se presentes

em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (ANGELO & JORGE, 2007). Os flavonóides encontrados nos animais são originários de plantas que serviram de alimentos e foram biossintetizados (YAO et al., 2004).

Destacam-se dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidante, que constitui a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos; atividades antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobiana e antivirais (LOPES et al., 2000). De acordo com Antolovich et al. (2000), os fenóis desempenham papel importante na proteção contra a foto-oxidação e resistência a doenças. Segundo O'Connell & Fox (2001), os compostos fenólicos são encontrados em quantidades consideráveis no leite de ruminantes, porém a sua importância na qualidade do produto e nutrição humana ainda não foram elucidadas.

O interesse nos compostos fenólicos é crescente, devido aos seus efeitos biológicos. Eles realizam várias atividades metabólicas como: antioxidantes, , funções imunológicas, entre outras (BABBAR et al., 2015; CHEN et al., 2015; COVAS et al., 2006; HALLIWELL et al., 2005; MARTEINEZ-VALEVERDE et al., 2000; RUBIO et al., 2013). No entanto, a determinação de compostos fenólicos no leite ainda é um campo muito pouco explorado, e existem poucos estudos (VÁZQUEZ et al., 2015).

A pesquisa resultou em dois artigos, que serão submetidos as seguintes revistas: Capítulo II para a Food Chemistry e Capítulo III para a Journal of Food Science and Technology.

No Capítulo II é apresentado o trabalho intitulado “Aminas biogênicas e polifenóis no leite de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum L.*)”. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de óleo ou farelo de linhaça na dieta de ovelhas da raça Bergamácia sobre os teores de aminas biogênicas e polifenóis do leite.

No Capítulo III é apresentado o trabalho intitulado “Teores de aminas biogênicas e polifenóis no queijo curado elaborado com leite de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum L.*)”. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de óleo ou farelo de

linhaça na dieta de ovelhas da raça Bergamácia sobre os teores de aminos biogênicas e polifenóis do queijo tipo minas curado.

Referências Bibliográficas

- ADDIS, M. et al. The inclusion of a daisy plant (*Chrysanthemum coronarium*) in dairy sheep diet: 2. Effect on the volatile fraction of milk and cheese. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 101, p. 68-80, 2006.
- ALMEIDA, C. L., BOAVENTURA, G. T., GUZMAN – SILVA, M. A. A linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido α -linolênico na formação da bainha de mielina. **Nutrição**, v.22, n.5, 2009.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, SP, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTOLOVICH, M. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, London, v.125, p. 989–1009, 2000.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K. Therapeutic and nutraceutical potential of bioactive compounds extracted from fruit residues. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.55,n.3, p.319–337, 2015.
- BARDÓCZ, S. et al. Polyamines in food: implications for growth and health. **The Journal Nutritional Biochemistry**, New York, v.4, p. 66-71, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARDÓCZ, S. et al. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. **British Journal of Nutrition**, London, v.73, p.819-828, 1995.
- BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a Review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 45, n. 3, p. 182-220, 1997.
- BENCINI, R. Factors affecting the quality of ewe's milk. In: *Great Lakes dairy sheep symposium*, 7., 2001. *Proc...* Eau Claire (Wisconsin): Wisconsin Sheep Breeders Cooperative. 2001.
- BENNETT, M. 1998. The flaxseed revolution: nature's source of omega-3, ligninas e fibra. Califórnia: Optimal Healthspan Publications,1998, p.88.
- BERNARD, L. et al. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage. **British Journal of Nutrition**, London, v. 101, p. 213-224, 2009.
- BERTONI, G. Feeding and bovine milk quality: endocrin and metabolic factors. **Zootecnica e Nutrizione Animale**, Italy, v. 22, p. 205-214, 1996.

BRANCIARI, R. et al. Consumer acceptability of ovine cheese from ewes fed extruded linseed-enriched diets. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, n.106S, p.S43-S48, 2012.

BRITO, M.A. **Variação dos perfis metabólicos, hematológico e lácteo de ovinos leiteiros em confinamento**. 2004. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2004.

BRZEZINSKI, A.; DEBI, A. Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 85, p.47-51, 1999.

BUNKOVÁ, L. et al. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. **Food Microbiology**, London, v.27, p. 880-888, 2010.

BUTS, J.P. Polyamines in milk. **Annales Nestlé**, Basel Karger, v.54, p. 98-104, 1996.

BUTS, J.P. et al. Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semi-elemental diets. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 21, p. 44-49, 1995.

CAMPOS, L. Aspectos benéficos do leite de ovelha e seus derivados. Bento Gonçalves, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.casadaovelha.com.br>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

CHEN, L. Y.; CHENG, C. W.; LIANG, J. Y. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.170, p.10–15, 2015.

CHRISTENSEN, R.A. et al. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 77, p. 1618-1629, 1994.

CHOUINARD, P. Y.; GIRARD, V.; BRISSON, G.H. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying instauration. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 2, p. 471-481, 1998.

CORDEIRO, R., FERNANDES, P. L., BARBOSA, L. A. Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p.727-732, 2009.

COSTA, R. G. et al. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 307-321, 2009.

COVAS, M. I. et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.40, n.4, p. 608–616, 2006.

DE BEER, D. et al. Phenolic compounds: a review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 20, p. 48-61, 2002.

DEGHEIDI, M. A.; EFFAT, B. A.; SHALABY, A. R. Development of some biogenic amines during Ras cheese ripening with special reference to different starters. Proc. 5th Egyptian Conf. Dairy Sci. and Technol., pp. 205-217. 1992.

DELACROIX-BUCHET, A.; LAMBERET, G. **Sensorial properties and typicity of goat dairy products**. Tours: International Association of Goat, 2000. p. 559-563.

DYKES, L; ROONEY, L.W. Phenolic compounds in cereal grains and health benefits. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 50, p. 105-117, 2007.

ELIASSEN, K.A. et al. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 78, p. 273-280, 2002.

EMEDIATO, R.M.S. **Efeito da gordura protegida sobre parâmetros produtivos de ovelhas da raça Bergamácia e na elaboração de queijos**. 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

FAO. Food and agriculture organization of the united nations. 2012, Disponível em: <http://www.faostat.fao.org.com>. Acesso em: 23 julho 2014.

FOSTER, E. M., NELESON, F. E., SPECK, M. L., DETSCH, K. N. and OLESEN, J. C. (1958). **Dairy Microbiology**. McMillan and Co. Ltd, London.

GALITSOPOULOU, A. et al. Polyamine profile in ovine and caprine colostrum and milk. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.173, p. 80-85, 2015.

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.

GOLDBERG, S. et al. Cadaverina as a putrefactive component of oral malodor. **Journal of Dental Research**, Baltimore, v.76, n. 6, p.1168-1172, 1994.

HAENLEIN, G. F. W. Past, present and future perspectives on small ruminant dairy research. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 9, p. 2097-2115, 2001.

HALÁSZ et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Tecnology**. v.5, p.42-49, 1994.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects? antioxidant or not? **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v.81, p.268–276, 2005.

HILALI, M; EL-MAYDA, E; RISCHKOWSKY, B. Characteristics and utilization of sheep and goat milk in the Middle East. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, n.101, p. 92- 101, 2011.

JOOSTEN, H. M. L. G.; OLIEMAN, C.. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 356, p. 311-319, 1986.

KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 90, p. 219-230, 2005.

KASOTE, D.M. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. **International Food Research Journal**, Serdang, v. 10, n.1, p.27-34, 2013.

KOMPRDA, T. et al. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 102,n. 1, p. 129 - 137, 2007.

LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LIMA, A.S.; GLORIA, M.B.A. Aminas biogênicas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

LINDEMOSE, S.; NIELSEN, P.E.; MOLLEGAARD, N.E. Polyamines preferentially interact with bent adenine tracts in double-stranded DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. 1790- 1803, 2005.

LOPES; et al. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.17, p.18-22, 2000.

LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.84, p.55-58, 2000.

LOVENBERG, W. Some vaso- and psychroactive substances in food: amines stimulates depressants and hallucinogens. In: **Toxicants Occurring Naturally in Foods**, National Academy of Science, Washington, DC. 1973.

LUNA, P. et al. Conjugated linoleic acid in ewe milk fat. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 72, n. 4, p. 415-424, 2005.

MADHUSUDHAN, B. Potential benefits of flaxseed in health and disease – a perspective. **Agriculture Conspectus Scientificus**, v. 74, p. 67-72, 2009.

MARTEINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Nutritional importance of phenolic compounds in the diet. **Arch Latinoam Nutrition**, v.50, n.1,p. 5–18, 2000.

MAYER, H.K.; FIECHTERG, G.; FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 1217, p. 3251-3257, 2010.

MICHAELIDOU, A.M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. **Small Ruminat research**, Amsterdam, v. 79, p. 42-50, 2008.

MICHAELIDOU, A.M.; STEIJNS, J. Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides. **International Dairy Research**, v. 16, p. 1421-1426, 2006.

MILLICHAP, J.G., YEE, M.M. The diet factor in pediatric and adolescent migraine. **Pediatric Neurology**, Chippewa, v. 28, n. 1, p. 09-13, 2003.

MOTYL, T. et al. Polyamines in cow's and sow's milk. **Comparative Biochemistry and Physiology**, London, v.3, p. 427-433, 1995.

MUIR, A.D.; WESTCOTT, N.D. Flaxseed constituents and human health. In: Muir, A.D. and Westcott, N.D. (eds). *Flax: the genus Linum*. London:Taylor & Francis, p. 243-251, 2003.

MÜLLER, M. et al. Fontes de gordura ômega-3 e ômega-6 sobre a digestibilidade aparente de novilhas de corte confinadas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 393-398, 2004.

NACKZ, M; SHAHIDI,F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 1054, p.95-111, 2004.

NARDES, R. E. F. **Caracterização de queijo Zamorano Dop sob condições de maturação acelerada por modificações na temperatura**. 2002. 230 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

NATEL, A. S. Composição do leite. In: NATEL, A. S. **Produção e qualidade de leite e queijo ovino**. Curitiba: UFPR,2007. p. 15-17.

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S. et al. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 68, p.750-756, 2003.

NUDDA, A. et al. The yield and composition of milk in Sarda, Awassi, and Merino sheep milked unilaterally at different frequencies. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.85, n.11, p.2879-2884, 2002.

OCHOA-CORDERO, M. A. et al. Milk yield and composition of Rambouillet ewes under intensive management. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 43, p. 269 – 274, 2002.

O'CONNELL, J.E.; FOX, P.F. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. **International Dairy Journal**, Barking, v.11, p. 103-120, 2001.

OLIVEIRA, A. A. **Produção e composição do leite de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

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

OOMAH B. D. Flaxseed as a functional food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.81, p.889-894, 2001.

PELEG, H., BODINE, K. K., NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemistry Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PETIT, H.V. Antioxidants and dairy production: the example of flax. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 352-361, 2009.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PINTADO et al. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal**, Barking, v.18, p.631-640, 2008.

PRASAD, K. et al. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 136, p. 367-375, 1998.

QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Physicochemical and sensory effects of cotton seed and sunflower oil supplementation on Moxotó goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 82, n.1, p.58-61, 2009.

RICE, S.L.; EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E. Biologically active amines in food. A review. **Journal of Milk and Food and Technology**. Shelbyville, v.39, p. 353-358, 1976.

ROIG-SAGUÈS, A.X.; MOLINA, A.P., HERNANDEZ-HERRERO, M.M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **European Food Research and Technology**, Berlin, v, 215,n.2, p. 96–100, 2002.

ROHENKOHL, J.E. et al. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicador Econômico FEE**. Porto Alegre. v. 39, n.2, p.97-114, 2011.

RUBIO, L.; MACIA, A.; MARIA-JOSE, M. Impact of various factors on pharmacokinetics of bioactive polyphenols: An overview. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v.15, n.1, p.62–76, 2013.

SAAD, S. M. I.; **Probióticos e prebióticos: o estado da arte**. 2006. 16f. – Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2006.

SÁ, C.O. **Influência do fotoperíodo na produção de leite e níveis de hormonais de ovelhas da raça Bergamácia**. 2001. 87 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista, Botucatu, 2001.

SANTOS, F.L. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n.4, p. 1376-1380, 2001.

SCHWARTZ, S.J.; VON ELBE, J.H.; GIUSTI, M.M. Corantes. In: DAMODARAN,S; PARKIN, K.L; FENNEMA, O.R., **Química de Alimentos Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2010, cap.9, p. 468.

SCHIRONE, M. et al. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. **Food Microbiology**, London, v. 34, p. 137-144, 2013.

SEVI, A.; ALBENZIO, M.; MARINO, R. et al. Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.51, n.3, p.251-259, 2004.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995.

SHAHIDI, F. Antioxidant factors in the plant foods and selected oil seed. **Biofactors**, Oxford, v.13, p. 179-185, 2000.

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

SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 213–231, 1996.

SILVA, M. G. C. M. **Produção de caprinos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 56p.

TKACHENKO, A.G.; PSHENICHONOV, M.R.; NESTEROVA, L.I. Putrescine as a fator protecting *Escherichia coli* against oxidative stress. **Microbiology**, London, v.70, n.04, p.422-428, 1991.

THOMPSON, L.U.; ROBB, P.; SERRAINO, M. et al. Mammalian lignan production from various foods. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 16, n.1, p.43-52, 1991.

THOMPSON, L.U.; RICKARD, S.E.; ORCHESON, L.J.; et al. Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, London, v.17, n.6, p.1373-1376, 1996.

TOUR'è, A.; XUEMING, X. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bioactive components, and health benefits. **Comprehensive Review in Food Science and Food Safety**, v.9, p.261-269, 2010.

TRUJILLO, A.J. et al. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemistry**, New York, v. 71, p. 449-457, 2000.

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

VÀZQUES et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. **Food Chemistry**, New York, v.176, p.480-486, 2015.

WACHIRA, A. M. et al. Rumen biohydrogenation of *n*-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 135, p. 419-428, 2000.

WADA, F.Y. **Grãos de linhaça e canola sobre o desempenho, digestibilidade e qualidade da carcaça e da carne de novilhas nelore em confinamento**. 69p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

WILFOR, S.M.; SMEDS, A.I.; HOLMBOM, B.R. Chromatographic analysis of lignans (review). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1112, p.64-77, 2006.

YAMAMOTO, S. M. et al. Fontes de óleo vegetal na dieta de cordeiros em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 703-710, 2005.

YAO, L.H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plants foods for human nutrition**, Dordrecht, v.59, p.113-122, 2004.

ZAMIRI, M. J.; QOTBI, A.; IZADIFARD, J. Effect of daily oxytocin injection on milk yield and lactation length in sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.40, n.2, p.179-185, 2001.

ZHANG, R. H.; MUSTAFA, A. F.; ZHAO, X. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. **Animal Feed Science and Technology**, New York, 127, 220–233, 2006.

CAPÍTULO II
AMINAS BIOGÊNICAS E POLIFENÓIS NO LEITE DE OVELHAS DA RAÇA
BERGAMÁCIA SUPLEMENTADAS COM ÓLEO OU FARELO DE LINHAÇA
(Linum usitatissimum L.)

**Aminas biogênicas e polifenóis no leite de ovelhas da raça Bergamácia
suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de óleo de linhaça (OL) ou farelo de linhaça (FL) na dieta de ovelhas da raça Bergamácia em lactação, sobre o teor de aminas biogênicas e polifenóis no leite. Foram utilizadas 70 ovelhas distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos. As dietas experimentais foram: Controle (CT) – concentrado sem adição de suplementação lipídica; Óleo de linhaça (OL) – concentrado com adição de 3% de OL (%MS); e Farelo de linhaça (FL) – concentrado com adição de 15% de FL (%MS). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos confinados em baias coletivas e recebiam dieta composta por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado referente a cada tratamento. As ovelhas foram ordenhadas uma vez ao dia, no período da manhã, e tiveram suas produções controladas diariamente. As amostras de leite para a avaliação das aminas biogênicas foram colhidas a cada 14 dias a partir do primeiro dia de ordenha e as amostras de leite para análise dos polifenóis foram colhidas a cada 14 dias a partir do quinto dia pós-parto. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado e os dados avaliados por análise de variância ($P < 0,05$). Não foi encontrada a presença de cadaverina no leite e a serotonina foi a amina predominante no leite de ovelhas em todos os tratamentos. O tratamento controle apresentou maiores teores de espermina (0,300 mg/100g) entretanto, o tratamento com óleo de linhaça apresentou menores teores de histamina (0,0049 mg/100g). A espermidina foi a amina biogênica que mais se correlacionou com maior número de aminas. Não houve diferença entre os tratamentos para o teor de polifenóis, porém o tratamento com óleo de linhaça mostrou-se mais eficiente.

Palavras-chave: fenóis, ovinos, poliaminas, putrescina.

**Biogenic amines and polyphenols in milk from Bergamasca ewes supplemented
with linseed oil or flaxseed meal (*Linum usitatissimum* L.)**

Abstract: The aim in this study was to determine the effects of feeding diets with linseed oil (OL) or flaxseed meal (FM) of Bergamasca ewes on to the content of biogenic amines and phenols in milk. Seventy ewes were distributed in three groups: Control (CT) - no lipids; Linseed (L) – with addition of 3% of OL (DM basis); and Flaxseed meal (F) – with addition of 15% of FM (DM basis). Throughout the experiment, the ewes remained confined in collective pens and were fed a diet containing 60% corn silage and 40% concentrate according to each treatment. They were mechanically milked once a day and had their productions controlled. The milk samples for biogenic amines analysis were collected every 14 days from the first milking day and the milk samples for phenols analysis were collected every 14 days from the 5th day postpartum until the end of the lactation. The experiment was conducted in a random customized design and the data evaluated by analysis of variance ($P < 0,05$). Cadaverine was not found and the serotonin was the predominant amine in the milk from ewes in all treatments. The control treatment showed high contents of spermine (0,300 mg/100g), however the OL had lower contents of histamine (0,0049 mg/100g). The spermidine was the biogenic amine more correlated with greater numbers of amines. There was no difference between treatments for polyphenols contents in milk, however the treatment with oil it was more efficient.

Keywords: ovine, phenols, polyamines, putrescine.

Introdução

O leite de ovelha é um produto em expansão no Brasil, principalmente devido aos seus constituintes possuírem altos teores de nutrientes, como a gordura e os sólidos totais, apresentando alto valor agregado em relação ao leite de vaca.

Os consumidores estão cada vez mais buscando alimentos saudáveis, principalmente aqueles com propriedades funcionais, e denominados alimentos funcionais por fornecerem benefícios adicionais aos da alimentação convencional e poderem reduzir o risco de doenças (PIMENTEL, 2005). A utilização de óleos ou farelos na alimentação animal é de grande interesse em termos de pesquisa, pois visa a produção de compostos alimentares benéficos à saúde humana e com possibilidade de agregar valores aos produtos de origem animal como leite e carne.

A demanda por alimentos ricos em compostos antioxidantes tem sido alta, e dentre esses compostos estão as aminas biogênicas e os polifenóis. As poliaminas também são conhecidas como aminas biogênicas e são essenciais para jovens em crescimento e desenvolvimento (BARDÓCZ, 1995) uma vez que estão envolvidas na regulação e no estímulo da síntese de DNA, RNA e proteína (LIMA et al., 2006). Porém, o consumo excessivo de alimentos que contenham poliaminas pode ser prejudicial em relação às células cancerosas, visto que elas atuam no crescimento celular. Sarhan et al., (1989) relataram que a privação de poliaminas nas dietas pode ser benéfica para reduzir o crescimento de tumores.

Poucos trabalhos relataram os teores de polifenóis no leite ovino. Sabe-se que a utilização de óleos na alimentação animal altera o perfil de ácidos graxos do leite, porém não existem estudos que comprovem se esta suplementação modifica os compostos antioxidantes ou não.

Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da utilização do farelo ou óleo de linhaça sobre as presenças de aminas biogênicas e dos polifenóis no leite de ovelhas.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu/SP com o Protocolo nº 25/2013 – CEUA.

Animais e Instalações Experimentais

O projeto foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa em Produção de Leite Ovino da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Botucatu/SP, no período de agosto a novembro de 2013. O município de Botucatu está situado na latitude 22°52'47'' S, longitude 48°25'12'' W e altitude de 810 m. Segundo Köppen, apresenta clima temperado quente (mesotérmico) úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C (CUNHA & MARTINS, 2009).

Utilizaram-se 70 ovelhas da raça Bergamácia na faixa de 2,5 a 3,5 anos de idade, distribuídas, 15 dias antes do parto, homogeneamente por idade, ordem de parição, peso e escore de condição corporal em três tratamentos: Controle (CT, n=24), Óleo de Linhaça (OL, n=22) e Farelo de Linhaça (FL, n=24).

Durante a gestação, os animais foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* cv. Tanzânia, e confinados 15 dias antes do parto em baias coletivas de 50 m² que dispunham de comedouros e bebedouros com água potável à vontade. Após o desmame dos cordeiros aos 30 dias de idade, as ovelhas permaneceram em baias coletivas.

As infecções endoparasitárias foram monitoradas em todas as ovelhas a cada 14 dias através da colheita de amostras de fezes diretamente na ampola retal, a partir do início da estação de monta. O exame de fezes foi realizado através da técnica de Gordon & Whitlock (1939) e os resultados de OPG (ovos por grama de fezes), acima de 500, denotaram necessidade de tratamento anti-helmíntico. Os animais foram vacinados contra pasteurelose e clostridioses 30 dias antes do parto.

Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos por três dietas: Controle (CT) = sem adição de óleo ou farelo de linhaça; Óleo de linhaça (OL) = com adição de 30,5 g/kg MS de

OL e Farelo de linhaça (FL) = com adição de 152 g/kg MS de FL. As dietas foram formuladas para atender as recomendações do NRC (2007) quanto às exigências de manutenção de uma ovelha adulta, com peso médio de 70 kg e produção de leite de 1,56 litros/dia; com 6,5% de gordura e 5,8% de proteína e calculadas por meio do programa Small Ruminant Nutrition System para fornecer as mesmas quantidades de energia metabolizável (EM), proteína metabolizável (PM) e cálcio (Tabela 1). A alimentação foi fornecida em cochos coletivos, uma vez ao dia, logo após a ordenha, pelo sistema de mistura total, composta por 60% de silagem de milho (*Zea mays*) e 40% de concentrado. As proporções de milho e casca de soja peletizada nos concentrados foram alteradas para compensar a maior densidade energética do óleo de linhaça. Devido a grande susceptibilidade de oxidação do óleo de linhaça, o mesmo era pesado e misturado na hora do fornecimento da dieta.

O período de adaptação iniciou-se 15 dias antes do parto quando os animais passaram a consumir cerca de 70% da quantidade diária das dietas experimentais estimadas para o período inicial da lactação, o suficiente para atender as exigências nutricionais de ovelhas na fase final de gestação (NRC, 2007).

Tabela 1. Ingredientes e nutrientes das dietas experimentais

	Tratamentos			Farelo de Linhaça
	CT ¹	FL ²	OL ³	
Ingredientes (g/kg de MS)				
Silagem de Milho	599,8	598,0	600,0	
Milho grão moído	212,0	151,1		
Farelo de soja	165,1	76,9	184,7	
Farelo de linhaça		152,0		
Casca de Soja Peletizada			161,7	
Óleo de linhaça			30,5	
Calcário calcítico	11,0	9,9	11,0	
Sal Mineral ⁴	12,1	12,1	12,1	
Nutrientes (g/kg de MS)				
Matéria Seca	527,0	544,3	504,1	913,8
Extrato Etéreo	42,8	49,5	68,5	79,8
NDT ⁵	812,7	813,0	837,1	760,3
FDN _{ef} ⁶	261,8	220,3	241,1	141,0
Proteína Metabolizável	108,3	113,1	110,0	159,1
Energia Metabolizável (Mcal/kg)	2,94	2,94	3,03	2,63
Cálcio	8,3	8,2	8,3	
Fósforo	4,4	4,9	3,9	

¹ Controle = concentrado sem adição de óleo ou farelo de linhaça.

² Farelo de linhaça = concentrado com adição de 152 g de farelo de linhaça /kg de MS.

³ Óleo de linhaça = concentrado com adição de 30,5 g de óleo de linhaça /kg de MS.

⁴ Composição do Sal Mineral (kg do produto) 180g Ca,90g P, 10g Mg, 13g S, 93g Na, 145g Cl, 17mg Se, 1000mg Cu, 826mg Fe, 4000mg Zn, 1500mg Mn, 150mg I, 80mg Co, 900mg Fl.

⁵ NDT = Nutrientes Digestíveis Totais.

⁶ FDN_{ef} = Fibra em Detergente Neutro efetiva.

Análises químicas

Análises bromatológicas

Durante todo o período experimental, as amostras das dietas ofertadas foram colhidas e congeladas a -20°C para posterior análise da composição bromatológica no laboratório de Bromatologia do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

As amostras foram secas em estufas com ventilação forçada à temperatura de 55°C por 72 horas até peso constante, moídas em moinhos tipo Wiley em peneira com crivos de 1 mm e analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cinzas (MM) e lignina (H₂SO₄ 72% p/p) segundo as técnicas descritas pelo AOAC (2005). A determinação dos teores de fibra em detergente neutro e as correções para os teores de cinzas e proteína foram conduzidas conforme as

recomendações de Mertens (2002). O valor de energia dos alimentos foi estimado segundo Weiss (1999).

Análise do leite

A cada 14 dias a partir do 31º dia após o parto das ovelhas, foram colhidas amostras de leite em potes coletores universais e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e então armazenadas a - 20° C para serem realizadas as análises de aminas biogênicas e polifenóis no Laboratório do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP/ Botucatu.

Para que as amostras de leite fossem avaliadas após o término do experimento, elas foram liofilizadas (Liotop® Model L108; Liobras, São Carlos, SP, Brasil). Após esse processo, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um pistilo para melhor homogeneização.

Em seguida, foram realizadas as seguintes análises:

- Teor de Poliaminas: Amostras de leite foram extraídas de acordo com LIMA et al. (2008) e analisadas através da cromatografia de ultra performance (UPLC) com detector fotodiodo em coluna C18 pelo método determinado por Dadáková et al. (2009) adaptado. Foram pesados 400 mg de leite liofilizado em tubos plásticos para centrífuga ao qual foi adicionado 3mL ácido perclórico 5% e homogeneizado em um agitador para tubos tipo vórtex. As amostras permaneceram no banho gelado por 30 minutos. Após a centrifugação por 10 minutos a 5.000 rpm a 5°C, foi retirado o sobrenadante e armazenado em tubos de plásticos. Foi retirado uma alíquota de 200 µl do sobrenadante e foram adicionados 200µl de carbonato tampão ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NAHCO}_3$) e 400µl de cloreto de dansila e homogeneizados no vórtex por 10 segundos. Após 20 horas de escuro, foi adicionado 200µl de prolina e a mistura foi mantida por uma hora no escuro, homegeinizada no vórtex a cada 15 minutos. Posteriormente foi adicionado 1000µl de tolueno à mistura e agitadas por 1 minuto. O sobrenadante foi recolhido e seco em linha de nitrogênio. Então, a amostra foi ressuspendida com 1mL de acetonitrila, grau HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), agitadas por 1 minuto, levados ao banho ultrassônico por 1 minuto e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 5°C por 4.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em vial de vidro para a leitura no HPLC.

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Thermo Scientific modelo Dionex Ultimate 3000 e empregou-se uma coluna C18 (250nm x 4,6 nm, id. 5µm). O volume de injeção foi de 20 µl e o detector de UV foi programado a 225 nm. O tempo de corrida para cada amostra foi de 28 minutos. Para a separação cromatográfica, foi utilizado um gradiente de eluição de (A) acetonitrila a 100% e (B) acetonitrila a 50% de concentração, com a seguinte proporção: 0-2 minutos, A 40%, B 60%; 2-4 minutos, A 40-60%, B 60-40%; 4-8 minutos, A 60-65%, B 40-35%; 8-12 minutos, A 65- 85%, B 35-15%; 12-15 minutos, A 85-95%, B 15-5%; 15-20 minutos, A 95%, B 5%; 20-21 minutos, A 95-85%, B 5-15%; 21-22 minutos, A 85-75%, B 15-25%; 22-25 minutos, A 75-40%, B 25-60%; 25-28 minutos, A 40%, B 60%. A alteração de concentração linear foi realizada em todos os casos. A taxa de fluxo foi mantida a 0,7 ml min⁻¹, com injeção de 20 µL por amostra, a temperatura da coluna foi de 25°C.

Os resultados foram expressos em mg 100g⁻¹ do liofilizado de espermina, espermidina, serotonina, dopamina, tiramina, histamina, cadaverina e putrescina. A leitura das aminas foi realizada pelo programa Chromolean 2000 e os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich, foram submetidos ao mesmo processo.

- Teor de compostos fenólicos: As análises para a extração dos compostos fenólicos foram realizadas de acordo com o método descrito por Li et al. (2009) adaptado. A extração se deu a partir de uma solução de HCl (1N) : etanol 99% v/v (15:85). Em tubos de centrifuga foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra de leite liofilizado e adicionados 4 mL dessa solução. Em seguida, foram homogeneizados em agitador para tubos tipo vórtex e mantidos em banho ultrassônico por uma hora, sendo que a cada dez minutos eram agitados novamente. Por fim, os tubos foram centrifugados a 6.000 rpm a 5°C durante 15 minutos. O sobrenadante líquido foi recolhido e acondicionado a -18°C protegido da luz.

Para se determinar o conteúdo de polifenóis totais, o método espectrofotométrico foi utilizado usando o reativo de Folin-Ciocalteau (SINGLETON & ROSSI, 1965) com as modificações por Li et al. (2009). Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para tubo de ensaio juntamente com 1,9 mL do reagente Folin-Ciocalteau diluído 10 vezes e 1,9 mL de solução de carbonato de sódio a 6% (p/v). Após 1 hora de reação (completa precipitação do carbonato), foi realizada a leitura de absorbância a 725

nm. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em mg Eq. catequina x 100 g-1 leite liofilizado.

Análise estatística

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado e os dados avaliados por análise de variância ($P < 0,05$), sendo que para análise de amins biogênicas no leite foram utilizadas cinco repetições (ovelha) por tratamento e para a análise de polifenóis foram utilizadas 10 repetições (ovelha) por tratamento. Para avaliação dos tratamentos em função de cada momento foi utilizado a análise de parcelas subdivididas. Para comparação entre as médias dos tratamentos, foi aplicado teste de Bonferroni, com nível de significância de 5% e foi utilizado o software estatístico Minitab® 16 (2010). Os coeficientes de correlação de Pearson utilizados nas variáveis do leite foram obtidos utilizando o programa estatístico SAS®, 2003 sendo o nível de significância utilizado de 5%.

Resultados e Discussão

Leite

Na tabela 2 são apresentados os valores da composição centesimal do leite encontrados por Silva (2014) os quais não foram significativos ($P > 0,05$).

Tabela 2. Composição do leite (%) de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça

	Tratamento			
	CT¹	FL²	OL³	CV⁴
Teor (%)				
Gordura	3,55	3,81	3,64	26,99
Proteína	5,33	5,04	5,13	7,11
Lactose	4,76	4,74	4,82	6,89
Sólidos Totais	14,36	14,31	14,32	7,35

¹ Controle = concentrado sem adição de óleo ou farelo de linhaça.

² Farelo de linhaça = concentrado com adição de 152 g de farelo de linhaça /kg de MS.

³ Óleo de linhaça = concentrado com adição de 30,5 g de óleo de linhaça /kg de MS.

⁴ Coeficiente de variação.

Foram quantificadas no leite de ovelha as seguintes amins: espermidina, espermina, putrescina, histamina, tiramina, dopamina e serotonina.

Não foram identificados teores de cadaverina no leite em nenhum dos tratamentos. De acordo com Marino et al. (2000), a cadaverina não é inerente ao leite, e sua presença está relacionada à *Enterobacteriaceae*, a qual sugere contaminação do produto. Nesse experimento não foi realizada a análise microbiológica do leite, porém devido à ausência da cadaverina pode-se sugerir que o produto tinha boa qualidade e que foi obtido sob boas condições de higiene.

Do teor total de amins encontradas no leite de ovelhas, mostrou-se que nos três tratamentos (controle, farelo e óleo) o teor de serotonina foi predominante (Tabela 3). O mesmo resultado foi encontrado por Almeida et al. (2003) em leite de vaca integral UHT, na região de Belo Horizonte, Minas Gerais, obtendo em média, 47 % correspondente a serotonina, 19% a espermidina, 17% a espermina, 9% a putrescina e 7% a cadaverina.

Tabela 3. Teores médios (%) de amins biogênicas no leite de ovelhas da raça Bergamácia

Amins Biogênicas	Tratamento		
	CT ¹	FL ²	OL ³
Serotonina	84,80	86,00	85,60
Espermina	7,50	5,70	6,50
Espermidina	5,30	5,20	5,50
Putrescina	1,80	2,70	2,00
Dopamina	0,20	0,20	0,20
Histamina	0,40	0,20	0,20
Tiramina	0,02	0,02	0,02

¹ Controle = concentrado sem adição de óleo ou farelo de linhaça.

² Farelo de linhaça = concentrado com adição de 152 g de farelo de linhaça /kg de MS.

³ Óleo de linhaça = concentrado com adição de 30,5 g de óleo de linhaça /kg de MS.

Não foi observada influência da dieta sobre as variáveis espermidina, putrescina, tiramina, serotonina e dopamina no leite, todavia o tratamento influenciou significativamente ($P < 0,05$) o teor de espermina e histamina (Tabela 4).

Tabela 4. Conteúdo de aminas biogênicas e poliaminas presentes no leite de ovelhas da raça Bergamácia

Tratamento ¹	Dias de lactação ²			Médias
	47	61	75	
Espermidina (mg/100g)				
CT	0,196 ± 0,048	0,192 ± 0,057	0,179 ± 0,062	0,200
FL	0,136 ± 0,076	0,184 ± 0,096	0,139 ± 0,087	0,150
OL	0,184 ± 0,038	0,187 ± 0,025	0,132 ± 0,068	0,200
Médias	0,172	0,188	0,150	
Espermina (mg/100g)				
CT	0,247 ± 0,067	0,279 ± 0,175	0,283 ± 0,129	0,300 ^a
FL	0,182 ± 0,084	0,155 ± 0,078	0,165 ± 0,143	0,200 ^b
OL	0,227 ± 0,102	0,209 ± 0,067	0,209 ± 0,068	0,200 ^b
Médias	0,218	0,214	0,219	
Putrescina (mg/100g)				
CT	0,056 ± 0,014	0,060 ± 0,024	0,059 ± 0,028	0,060
FL	0,043 ± 0,045	0,066 ± 0,045	0,057 ± 0,074	0,060
OL	0,069 ± 0,043	0,064 ± 0,025	0,067 ± 0,035	0,070
Médias	0,056	0,063	0,061	
Tiramina (mg/100g)				
CT	0,0007 ± 0,0001	0,0007 ± 0,0001	0,0006 ± 0,0003	0,0007
FL	0,0006 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0006	0,0008 ± 0,0003	0,0006
OL	0,0008 ± 0,0002	0,0008 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0003	0,0008
Médias	0,0007	0,0007	0,0007	
Histamina (mg/100g)				
CT	0,014 ± 0,009	0,011 ± 0,004	0,013 ± 0,005	0,0129 ^a
FL	0,006 ± 0,002	0,005 ± 0,005	0,005 ± 0,002	0,0053 ^b
OL	0,005 ± 0,003	0,006 ± 0,005	0,005 ± 0,003	0,0049 ^b
Médias	0,008	0,011	0,008	
Serotonina (mg/100g)				
CT	2,714 ± 0,195	3,014 ± 0,145	3,116 ± 0,533	3,00
FL	2,526 ± 0,718	2,470 ± 1,048	2,637 ± 0,600	3,00
OL	2,837 ± 0,421	2,970 ± 0,596	2,671 ± 0,800	3,00
Médias	2,70	2,82	2,81	
Dopamina (mg/100g)				
CT	0,007 ± 0,005	0,006 ± 0,004	0,009 ± 0,005	0,007
FL	0,006 ± 0,006	0,003 ± 0,003	0,003 ± 0,002	0,003
OL	0,005 ± 0,004	0,006 ± 0,004	0,008 ± 0,007	0,006
Médias	0,006	0,005	0,006	

Valores expressos em média ± desvio padrão.

¹ Tratamento: Controle (CT) = concentrado sem adição de óleo ou farelo de linhaça. Farelo de linhaça (FL) = concentrado com adição de 152 g de farelo de linhaça /kg de MS. Óleo de linhaça (OL) = concentrado com adição de 30,5 g de óleo de linhaça /kg de MS.

²Dias de lactação: colheitas realizadas durante o período experimental. 47° dia de lactação; 61° dia de lactação; 75° dia de lactação.

Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Bonferroni.

Os teores de espermidina, putrescina, serotonina, tiramina e dopamina não foram alterados com a inclusão de óleo ou farelo de linhaça, mas pôde ser observado que o leite de ovelha é uma boa fonte de aminas biogênicas.

Nota-se entre os momentos 1, 2 e 3, oscilação no comportamento da espermidina no tratamento com farelo de linhaça. No momento 2, observa-se um aumento, porém volta a diminuir no momento 3 com valores próximos ao momento 1. E no tratamento com óleo de linhaça, nota-se uma diminuição nos níveis de espermidina durante os momentos 1 e 3, obtendo menores valores no último momento.

Houve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos no teor de espermina, a concentração de espermina foi maior no tratamento controle (0,300 mg/100g), seguindo do óleo (0,200 mg/100g) e do farelo (0,200 mg/100g). Talvez a adição de antioxidantes como a linhaça na dieta dos animais interfira nessa concentração, entretanto não foram encontrados dados nessa linha de pesquisa. A presença de espermidina e espermina no leite é comum, segundo Galitsopoulou et al. (2015), o leite de ovelhas com 15 dias de lactação é uma grande fonte de espermina e espermidina, e esta observação acrescenta mais valor nutricional às qualidades do leite de ovelha, tornando-o um suplemento natural como alternativa para aplicações nutricionais clínicas pré e pós-operatórias.

Não houve diferença no teor de putrescina durante os momentos e tratamento, a putrescina manteve constante em todo o experimento. Entretanto, esses resultados diferem dos encontrados por Galitsopoulou et al. (2015) que, ao avaliarem o teor de putrescina do leite até o 15° dia após o parto em ovelhas e cabras, notaram valores decrescentes no leite de cabra e no leite de ovelha, chegando a valores nulos no 15° dia para o leite de cabras. Glória (2005) encontrou valores de 0,21 mg/l de putrescina em leite de vacas, os quais são valores menores em relação aos encontrados nesse experimento no leite ovino.

Do total de aminas encontradas no leite, a tiramina foi a amina com menor porcentagem (0,02%) (Tabela 3) em relação as outras aminas encontradas, e não houve

diferença entre os tratamentos (Tabela 4). Resultados positivos, uma vez que a tiramina têm sido associada a crises hipertensivas, traduzidas pelo aumento da pressão sanguínea podendo levar a falhas no coração ou até mesmo a hemorragia cerebral (TIL et al., 1997; KALAC 2009). O consumo de produtos contendo grande quantidade de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina pode gerar quadros toxicológicos graves (SHALABY, 1996; BODMER et al., 1999).

Diferença entre tratamentos foi encontrado para a histamina, onde nota-se maiores valores para o tratamento controle, enquanto entre o tratamento óleo e farelo não houve diferença. Dados relevantes, pois a amina histamina age como um neurotransmissor e um vasodilatador no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular. Sendo considerada a agente responsável por alguns casos de envenenamento alimentar, que se manifestam por reações alérgicas, caracterizadas pela dificuldade de respirar, prurido, erupção, vômito, febre e hipertensão. As pessoas que possuem o mecanismo de detoxificação das aminas biogênicas naturalmente deficientes por razões genéticas ou devido à inibição do mecanismo pelo uso de medicamentos (inibidores de monoamina oxidase - IMAO) são mais sensíveis ao envenenamento por histamina (HERNADEZ-JOVER et al., 1997; NAILA et al., 2010).

De acordo com Shalaby (1996) os limites máximos de histamina e tiramina em alimentos estão na faixa de 50 a 100 mg/kg e 100 a 800 mg/kg, respectivamente. Putrescina, espermina, espermidina, e cadaverina parecem não possuírem efeitos adversos, mas podem potencializar o efeito da histamina e tiramina e também podem reagir com nitrito, formando N-nitrosaminas carcinogênicas, e serem utilizados como parâmetros de deterioração.

Não foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) para a serotonina entre tratamentos e entre os momentos, obtendo-se média de 3,00 mg/100g. Também não houve diferença entre tratamentos e momentos para a amina dopamina. No tratamento farelo os teores de dopamina diminuíram no momento 2 e 3, e no tratamento óleo houve um acréscimo no momento 3.

Para investigar se as aminas biogênicas encontradas no leite de ovelhas são influenciadas, foi avaliada a correlação entre as mesmas. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Correlação entre os teores de aminas biogênicas no leite de ovelhas da raça Bergamácia.

Parâmetros	Aminas Biogênicas							
	EPD	EPM	PUT	SRT	DPM	TIM	HIM	TOTAL
EPD		<u>0,607</u> <0,0001	<u>0,480</u> 0,0008	<u>0,661</u> <0,0001	<u>0,299</u> 0,0458	0,255 0,0914	0,268 0,0749	<u>0,774</u> <0,0001
EPM			0,109 0,4730	<u>0,356</u> 0,0164	0,189 0,2129	0,065 0,6699	0,291 0,0522	<u>0,507</u> 0,0004
PUT				<u>0,337</u> 0,0238	-0,048 0,7520	0,035 0,8178	-0,018 0,9044	<u>0,427</u> 0,0034
SRT					0,257 0,0885	<u>0,518</u> 0,0003	<u>0,352</u> 0,0176	<u>0,308</u> 0,0393
DPM						0,214 0,1581	0,196 0,1957	0,271 0,0711
TIM							0,235 0,1193	<u>0,470</u> 0,0011
HIM								<u>0,367</u> 0,0132

Coeficiente de correlação em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade. EPD – espermidina, EPM – espermina, PUT – putrescina, CAD – cadaverina, SRT – serotonina, DPM – dopamina, TIM – tiramina, HIM – histamina, TOTAL – aminas totais. Os valores abaixo do coeficiente são as probabilidades obtidas.

A espermidina foi a poliamina que mais se correlacionou positivamente com um maior número de aminas biogênicas (espermidina, putrescina, serotonina e dopamina). A espermidina pode ter se correlacionado com a espermina devido a espermidina ser formada pela adição de uma grupo aminopropil derivado da metionina à espermidina (GLÓRIA, 2005).

A amina serotonina também apresentou consideráveis valores de correlação positiva (espermidina, espermina, putrescina, tiramina e histamina). A putrescina apenas se correlacionou com a espermidina e serotonina, não sendo capaz de potencializar o efeito da histamina e da tiramina, talvez devido a ausência da cadaverina para auxiliar nessa correlação. E assim, tanto a tiramina como a histamina tiveram correlação positiva apenas com a serotonina.

Não houve diferença no conteúdo de polifenóis no leite entre tratamentos, porém encontrou-se diferença ($P < 0,05$) entre os momentos (Tabela 6).

Tabela 6. Conteúdo de polifenóis totais (mg Eq. catequina/100 g) do leite de ovelha da raça Bergamácia, em função dos momentos de colheitas

Dias de lactação ¹	Tratamento ²			Médias
	CT	FL	OL	
5	72,35 ± 12,68	71,53 ± 15,17	70,18 ± 12,98	71,40bc
19	65,91 ± 6,26	67,34 ± 11,70	72,27 ± 14,88	68,50c
33	80,11 ± 11,68	74,72 ± 5,68	82,93 ± 30,55	79,30abc
47	83,00 ± 17,01	86,56 ± 15,43	86,17 ± 21,42	85,20 ^a
61	77,14 ± 4,78	80,15 ± 17,78	77,85 ± 12,98	78,40abc
75	83,93 ± 16,02	82,45 ± 24,97	78,73 ± 14,94	81,70ab
89	75,91 ± 12,85	79,89 ± 23,28	82,38 ± 16,92	79,40abc
Médias	76,90	77,53	78,62	77,7

Valores expressos em média ± desvio padrão.

¹Dias de lactação: colheitas realizadas durante o período experimental.

² Tratamento: Controle (CT): sem suplementação de óleo de linhaça; Farelo (FL): suplementadas com óleo de linhaça; Óleo (OL): suplementadas com óleo de linhaça.

Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Bonferroni.

A inclusão de farelo ou óleo na alimentação das ovelhas não influenciou os teores de polifenóis no leite, os quais apresentaram médias similares ao tratamento controle, farelo e óleo. Contudo, observa-se um comportamento oscilante em relação aos momentos, onde foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$).

Durante os momentos, nota-se uma grande variação na concentração de polifenóis no leite, sendo que a maior concentração se apresenta no 47º dia de lactação. Essas oscilações podem vir dos outros ingredientes (milho e silagem de milho) das dietas, visto que o óleo e o farelo foram os mesmos usados durante todo o experimento, enquanto que os outros ingredientes foram adquiridos aos poucos e assim foram sendo feitas outras misturas de ração. Partindo do pressuposto de que os animais não sintetizam compostos fenólicos, apenas vegetais, sua presença no leite provavelmente se deve à ingestão desses compostos na dieta (AONO, 2014).

Foi calculada a correlação das amins biogênicas com os polifenóis no leite (Tabela 7) e observou-se que os polifenóis tiveram correlação negativa apenas com a amina histamina.

Tabela 7. Correlação entre os teores de polifenóis e aminas biogênicas no leite de ovelhas da raça Bergamácia

	Coeficiente de correlação entre polifenóis e aminas biogênicas							
	EPD	EPM	PUT	SRT	DPM	TIM	HIM	TOTAIS
POLF	-0,155	-0,242	-0,065	0,075	-0,055	0,002	<u>-0,299</u>	-0,069
	0,3108	0,1089	0,6702	0,6265	0,7175	0,9901	0,0459	0,6524

Coeficiente de correlação em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade. POLF – polifenóis, EPD – espermidina, EPM – espermina, PUT – putrescina, SRT – serotonina, DPM – dopamina, TIM – tiramina, HIM – histamina. Os valores abaixo do coeficiente são as probabilidades obtidas.

Conclusão

O tratamento com óleo de linhaça é uma boa alternativa para diminuir os teores de histamina principalmente no leite cru.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, A.M.P.; SILVEIRA, T.M.L.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em leite integral UHT comercializado na Região de Belo Horizonte, Minas Gerais. In: XX Congresso Nacional de Laticínios, 58, 2003, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Candido Tostes, 2003. p. 235-238.

AONO, N.M. **Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes.** 2014. 49p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.

BODMER, S.; IMARK, C, KNEUBUHL, M. Biogenic amines in food. Histamine and food processing. **Inflammation Research**, v. 48, n.6, p. 296-300, 1999.

CUNHA, A. R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. **Irriga**, Botucatu, v.14, n.1, p.1-11, jan./mar. 2009.

DADÁKOVÁ, E.; KRIZEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 116, p. 365-370, 2009.

GALITSOPOULOU, A. et al. Polyamine profile in ovine and caprine colostrum and milk. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.173, p. 80-85, 2015.

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.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.

HERNANDEZ-JOVE, T. et al. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. **Journal of Agriculture Food Chemical**, v. 45, n.6, p. 2098-2102, 1997.

KALAC, P. Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. **Journal of Applied Biomedicine**, v.7, n.4, p. 65-74, 2009.

LI, W. et al. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. **Nutrition**, New York, v. 25, p. 105-114, 2009.

LIMA, G.P.P. et al. Teores de poliaminas em alguns alimentos da dieta do povo brasileiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1294-1298, 2006.

LIMA, G.P.P. et al. Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, p.1838–1843, 2008.

MARINO, M. et al. The capacity of enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. **Letters Applied Microbiology**, v. 31, p.169-173, 2000.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.85, p.1217-1240, 2002.

MINITAB®16. Version 16.1.1. State College, PA: Minitab Inc., 2010. Software.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of sheep**. 6. ed. Washington: National Academy Press, 2007.

NAILA A, et al. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. **Journal of Food Science**, v.75, n.7, p. 139-150, 2010.

Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2005) 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method **2005.08**

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos Funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. 2005. São Paulo: Livraria Varela, 95 p.

SARHAN, S. et al. The gastrointestinal tract as polyamine source for tumor growth. **Anticancer Research**, Athens, v.9, p.215-22, 1989.

SAS 2003. SAS/STAT. User's guide. Version 8.02. SAS Institute Incorporation, Cary, USA.

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

SILVA, M.F.C. **Caracterização do leite e do queijo de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum L.*)**. 2014. 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965.

TIL, H. P. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food Chemical Toxicology**, v. 35, n. 3-4, p. 337-348, 1997.

WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. IN: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES, 61., 1999. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p.176-185, 1999.

CAPÍTULO III
TEORES DE AMINAS BIOGÊNICAS E POLIFENÓIS NO QUEIJO CURADO
ELABORADO COM LEITE DE OVELHAS DA RAÇA BERGAMÁCIA
SUPLEMENTADAS COM ÓLEO OU FARELO DE LINHAÇA (*Linum*
***usitatissimum* L.)**

Teores de aminos biogênicas e polifenóis no queijo curado elaborado com leite de ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de óleo de linhaça ou farelo de linhaça na dieta de ovelhas da raça Bergamácia em lactação, sobre o teor de aminos biogênicas e polifenóis no leite e queijo tipo minas curado. Foram utilizadas 70 ovelhas distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos. As dietas experimentais foram: Controle – concentrado sem adição de suplementação lipídica; Óleo de linhaça – concentrado com adição de 3% de OL (%MS); e Farelo de linhaça – concentrado com adição de 15% de FL (%MS). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos confinados em baias coletivas e recebiam dieta composta por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado referente a cada tratamento. As ovelhas foram ordenhadas uma vez ao dia, no período da manhã, e tiveram suas produções controladas diariamente. Para a fabricação dos queijos curados foram utilizados 90 litros de leite pasteurizado de cada tratamento e os queijos foram maturados por 20 dias. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado. As aminos biogênicas predominantes no período de maturação de 20 dias foram a cadaverina, putrescina e serotonina, sendo a histamina a amina com menor representatividade nos três tratamentos. Observou-se menores valores de putrescina, tiramina e histamina no tratamento com óleo de linhaça. Até o 10^o dia de maturação os teores de polifenóis foram maiores no tratamento com óleo de linhaça. A utilização de óleo de linhaça mostrou-se eficiente favorecendo um maior tempo de vida de prateleira para os queijos curados.

Palavras-chave: cadaverina, maturação, ovinos, polifenóis, putrescina.

Biogenic amines and polyphenols in ripened cheese made with milk from Bergamasca ewes supplemented with linseed oil or flaxseed meal (*Linum usitatissimum* L.)

Abstract: The aim in this study was to determine the effects of feeding diets with linseed oil or flaxseed meal to Bergamasca ewes related to the content of biogenic amines and phenols in cheese. Seventy ewes were distributed in three groups: Control - no lipids; Linseed – with addition of 3% of L (DM basis); and Flaxseed – with addition of 15% of F (DM basis). Throughout the experiment, the ewes remained confined in collective pens and were fed a diet containing 60% corn silage and 40% concentrate according to each treatment. They were mechanically milked once a day and had their productions controlled. For the manufacture of ripened cheese, 90 liters of pasteurized milk from each treatment were used and the maturation period was of 20 days. The experiment was conducted in a random customized design. The predominant biogenic amine during twenty days of ripened were cadaverine, putrescine and serotonin and the histamine was the amine with lower content in the three treatments . Observed lower content of putrescine, tiramine and histamine for the treatment with linseed oil. By the ten day of ripened the content of polyphenols were higher for linseed oil. The use of linseed oil was efficient and improvement a longer shelf life for the cheeses.

Keywords: cadaverine, ovine, polyphenols, putrescine, ripened.

Introdução

Grande parte da produção de leite de ovelhas é transformada em queijos. De acordo com a Faostat (2016) a produção de leite ovino no mundo é de aproximadamente 10.122.522 toneladas contra 625.754.261 toneladas de leite de vaca e representa 1,34% da produção de leite mundial. Países como Itália, Portugal, Espanha, Grécia e França, são considerados tradicionais na produção e produzem os queijos mais apurados do mundo.

A produção de queijos, em todo o mundo, é a principal forma de transformação do leite de ovelha, sendo realizada desde os primórdios da domesticação dessa espécie, evoluindo da produção artesanal e caseira para a definição de diferentes tipos de queijos finos que alcançam mercados internacionais. Esses queijos possuem denominação de origem protegida e são apreciados pelas mais diversas sociedades (PENNA, 2011). No Brasil, a produção de leite ovino e de seus derivados ainda é pequena. Existem criadores localizados no Rio Grande Sul, porém não conseguem atender todo o mercado brasileiro.

O diferencial do leite ovino é o elevado teor de gordura, o que colabora para a fabricação de queijos e derivados, visto que o rendimento do queijo é o dobro, quando comparado com o leite de vaca. Entretanto, existem alguns fatores que podem alterar o produto final oriundo da utilização do leite de ovelha, principalmente em queijos curados. O estudo de aminas biogênicas em alimentos apresenta correlação direta com esses fatores que alteram a composição dos queijos, interferindo na qualidade do alimento e na saúde do consumidor (CUNHA et al., 2012). A presença de altos valores de histamina e tiramina é responsável por intoxicações alimentares, que apresenta sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, cefaléia entre outros (CARMO et al., 2010). Sabe-se que o tempo de maturação e a utilização de leite de cru favorecem o aumento dessas aminas consideradas indesejáveis, porém não existem relatos de alternativas de fontes de alimentação que possam diminuir os teores de histamina e tiramina e conseqüentemente de cadaverina e putrescina, pois são aminas que podem potencializar o efeito da histamina.

Os polifenóis também são compostos importantes nos alimentos, pois são potentes antioxidantes, porém pouco se sabe a respeito da sua concentração no leite, e principalmente nos seus derivados.

Com o intuito de alterar os teores de amins biogênicas e polifenóis no queijo curado e torná-lo um alimento funcional têm-se utilizado óleos ou farelos na alimentação dos animais, e sendo assim, o estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com óleo ou farelo de linhaça no queijo curado feito com leite de ovelhas sob os teores de amins biogênicas e polifenóis.

Material e Métodos

Animais

O projeto foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa em Produção de Leite Ovino da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Botucatu/SP, no período de agosto a novembro de 2013 e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu/SP com o Protocolo nº 25/2013 – CEUA. O município de Botucatu está situado na latitude 22°52'47'' S, longitude 48°25'12'' W e altitude de 810 m. Segundo Köppen, apresenta clima temperado quente (mesotérmico) úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C (CUNHA & MARTINS, 2009).

O queijo curado (tipo minas) foi produzido a partir do leite de 70 ovelhas da raça Bergamácia na faixa de 2,5 a 3,5 anos de idade, distribuídas, 15 dias antes do parto, homogeneamente por idade, ordem de parição, peso e escore de condição corporal em três tratamentos: Controle (CT, n=24), Óleo de Linhaça (OL, n=22) e Farelo de Linhaça (FL, n=24).

Durante a gestação, os animais foram mantidos em pastagem de *Panicum maximum* cv. Tanzânia, foram confinados 15 dias antes do parto em baias coletivas que dispunham de comedouros e bebedouros com água potável à vontade. Após o desmame dos cordeiros aos 30 dias de idade, as ovelhas permaneceram em baias coletivas.

Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos por três dietas: Controle (CT) = sem adição de óleo ou farelo de linhaça; Óleo de linhaça (OL) = com adição de 30,5 g/kg MS de OL e Farelo de linhaça (FL) = com adição de 152 g/kg MS de FL. As dietas foram formuladas para atender as recomendações do NRC (2007) quanto às exigências de manutenção de uma ovelha adulta, com peso médio de 70 kg e produção de leite de 1,56 litros/dia; com 6,5% de gordura e 5,8% de proteína e calculadas por meio do programa Small Ruminant Nutrition System para fornecer as mesmas quantidades de energia metabolizável (EM), proteína metabolizável (PM) e cálcio (Tabela 1). A alimentação foi fornecida em cochos coletivos, uma vez ao dia, logo após a ordenha, pelo sistema de mistura total, composta por 60% de silagem de milho (*Zea mays*) e 40% de concentrado.

O período de adaptação iniciou-se 15 dias antes do parto quando os animais passaram a consumir cerca de 70% da quantidade diária das dietas experimentais estimada para o período inicial da lactação, o suficiente para atender as exigências nutricionais de ovelhas na fase final de gestação (NRC, 2007).

A partir do 31º dia da lactação, as ovelhas foram ordenhadas mecanicamente uma vez ao dia, às 6h30min, obtendo-se a produção de leite que foi mensurada diariamente durante 63 dias.

Tabela 1. Ingredientes e nutrientes das dietas experimentais

	Tratamentos			Farelo de Linhaça
	CT ¹	FL ²	OL ³	
Ingredientes (g/kg de MS)				
Silagem de Milho	599,8	598,0	600,0	
Milho grão moído	212,0	151,1		
Farelo de soja	165,1	76,9	184,7	
Farelo de linhaça		152,0		
Casca de Soja Peletizada			161,7	
Óleo de linhaça			30,5	
Calcário calcítico	11,0	9,9	11,0	
Sal Mineral ⁴	12,1	12,1	12,1	
Nutrientes (g/kg de MS)				
Matéria Seca	527,0	544,3	504,1	913,8
Extrato Etéreo	42,8	49,5	68,5	79,8
NDT ⁵	812,7	813,0	837,1	760,3
FDN _{ef} ⁶	261,8	220,3	241,1	141,0
Proteína Metabolizável	108,3	113,1	110,0	159,1
Energia Metabolizável (Mcal/kg)	2,94	2,94	3,03	2,63
Cálcio	8,3	8,2	8,3	
Fósforo	4,4	4,9	3,9	

¹ Controle = concentrado sem adição de óleo ou farelo de linhaça.

² Farelo de linhaça = concentrado com adição de 152 g de farelo de linhaça /kg de MS.

³ Óleo de linhaça = concentrado com adição de 30,5 g de óleo de linhaça /kg de MS.

⁴ Composição do Sal Mineral (kg do produto) 180g Ca,90g P, 10g Mg, 13g S, 93g Na, 145g Cl, 17mg Se, 1000mg Cu, 826mg Fe, 4000mg Zn, 1500mg Mn, 150mg I, 80mg Co, 900mg Fl.

⁵ NDT = Nutrientes Digestíveis Totais.

⁶ FDN_{ef} = Fibra em Detergente Neutro efetiva.

Produção de queijo

O leite ordenhado na Unidade de Pesquisa em Produção de Leite Ovino foi encaminhado logo após a ordenha ao laboratório do Departamento de Economia, Sociologia e Tecnologia Agroindustrial (DEST) – FCA/UNESP, Botucatu-SP e transformado imediatamente em queijo tipo minas curado.

Os queijos foram processados no laboratório do com o leite das 10^a e 11^a semanas. Foram utilizados 45 litros de leite para cada tratamento, sendo o processamento de elaboração realizado em duplicata, totalizando 90 litros de leite por tratamento. Os leites foram coletados durante 3 dias seguidos pasteurizados e resfriados.

O leite de cada tratamento foi filtrado e pasteurizado individualmente no pasteurizador Technogel (Mixtronic 60) pelo método lento de pasteurização, caracterizado pelo aquecimento a 65°C durante 30 minutos, seguido de resfriamento rápido a 4°C, colocados em cubas de aço inox com capacidade para 50 litros, aquecimento em banho-maria, e manutenção à temperatura de 35°C.

Para produção dos queijos acrescentou-se 1% de cultura láctica mesófila (iogurte natural integral marca Nestlé®), 0,05% de cloreto de cálcio (225ppm) e 0,07% de coalho comercial (marca Estrela®) diluído em 100 mL de água destilada. Estes ingredientes foram misturados e deixados em repouso até a coagulação da massa em torno de 45 minutos, conforme metodologia descrita por Bonassi (1999).

A massa formada foi cortada verticalmente e horizontalmente com auxílio de uma lâmina de aço inox, seguida de repouso (5 min). Efetuou-se a agitação lenta da massa alternando 3 minutos de agitação e 3 minutos de repouso durante 60 minutos. Retirou-se todo o soro e pressionou-se levemente a massa durante 10 minutos para remoção do soro residual. Em seguida, realizou-se a enformagem dos queijos e a primeira prensagem durante 30 minutos com 15 kg de pressão/kg de queijo. Após a primeira prensagem, fez-se a primeira viragem dos queijos e a segunda prensagem por um período de 15 horas. Depois foram realizadas a segunda viragem dos queijos e a terceira prensagem durante 40 minutos.

Os queijos foram pesados, salgados por salga a seco (1,5% de sal), mantidos em geladeira por 24 horas para secagem, revestidos por uma fina camada de óleo de soja, e maturados por 20 dias em incubadora BOD ($\pm 12^\circ\text{C}$) e ($\pm 85\%\text{UR}$). Durante o período de 20 dias de maturação, os queijos foram virados diariamente para evitar ressecamento desequilibrado.

Análises químicas

Queijo

Após a produção dos queijos, foram colhidas amostras nos dias 0, 10 e 20 de maturação. No total, três queijos por tratamento foram amostrados e analisados quanto às aminas biogênicas e aos compostos fenólicos.

Para que as amostras de queijo fossem avaliadas após o término do experimento, elas foram liofilizadas (Liotop® Model L108; Liobras, São Carlos, SP, Brasil). Após esse processo, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um pistilo.

Todas as análises dos queijos foram realizadas em triplicata. Segue uma descrição dessas análises:

- Teor de Poliaminas: Amostras de queijo foram extraídas de acordo com Lima et al. (2008) e determinadas através da cromatografia de ultra performance (UPLC) com detector fotodiodo em coluna C18 pelo método determinado por Dadáková et al. (2009) adaptado. Foram pesados 400 mg de queijo liofilizado pesado em tubo plástico para centrífuga, aos quais foram adicionados 3mL de ácido perclórico 5% e em seguida a amostra foi homogeneizado em um agitador para tubos tipo vórtex. As amostras permaneceram no banho gelado por 30 minutos. Após a centrifugação por 10 minutos a 5.000 rpm a 5°C, foi retirado o sobrenadante e armazenado em tubos de plásticos. Foi retirado uma alíquota de 200 µl do sobrenadante e foram adicionados 200µl de carbonato tampão ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NAHCO}_3$) e 400µl de cloreto de dansila e homogeneizados no vórtex por 10 segundos. Após 20 horas de escuro, foram adicionados 200µl de prolina e a mistura foi mantida por uma hora no escuro, homegeinizada no vórtex a cada 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1000µl de tolueno à mistura e agitados por 1 minuto. O sobrenadante foi recolhido e seco em linha de nitrogênio. Então, a amostra foi ressuspensa com 1mL de acetonitrila, grau HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), agitadas por 1minuto, levadas ao banho ultrassônico por 1 minuto e posteriormente centrifugada por 5 minutos a 5°C por 4.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em vial de vidro para a leitura no HPLC.

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Thermo Scientific modelo Dionex Ultimate 3000 e empregou-se uma coluna C18 (250nm x 4,6 nm, id. 5µm). O volume de injeção foi de 20 µl e o detector de UV foi programado a 225 nm. O tempo de corrida

para cada amostra foi de 28 minutos. Para a separação cromatográfica, foi utilizado um gradiente de eluição de (A) acetonitrila a 100% e (B) acetonitrila a 50% de concentração, com a seguinte proporção: 0-2 minutos, A 40%, B 60%; 2-4 minutos, A 40-60%, B 60-40%; 4-8 minutos, A 60-65%, B 40-35%; 8-12 minutos, A 65- 85%, B 35-15%; 12-15 minutos, A 85-95%, B 15-5%; 15-20 minutos, A 95%, B 5%; 20-21 minutos, A 95-85%, B 5-15%; 21-22 minutos, A 85-75%, B 15-25%; 22-25 minutos, A 75-40%, B 25-60%; 25-28 minutos, A 40%, B 60%. A alteração de concentração linear foi realizada em todos os casos. A taxa de fluxo foi mantida a 0,7 ml min⁻¹, com injeção de 20 µL por amostra, a temperatura da coluna foi de 25°C.

Os resultados foram expressos em mg 100g⁻¹ do liofilizado espermina, espermidina, serotonina, dopamina, tiramina, histamina, cadaverina e putrescina. A leitura das aminas foi realizada pelo programa Chromolean 2000 e os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich, foram submetidos ao mesmo processo.

- Teor de compostos fenólicos: As análises para a extração dos compostos fenólicos foram realizadas de acordo com o método descrito por Li et al. (2009) adaptado. A extração se deu a partir de uma solução de HCl (1N) : etanol 99% v/v (15:85). Em tubos de centrifuga foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra de leite liofilizado e adicionados 4 mL dessa solução. Em seguida, foram homogeneizados em agitador para tubos tipo vórtex e mantidos em banho ultrassônico por uma hora, sendo que a cada dez minutos eram agitados novamente. Por fim, os tubos foram centrifugados a 6.000 rpm a 5°C durante 15 minutos. O sobrenadante líquido foi recolhido e acondicionado a -18°C protegido da luz.

Para se determinar o conteúdo de polifenóis totais, o método espectrofotométrico foi utilizado usando o reativo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965) com as modificações por Li et al. (2009). Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para tubo de ensaio juntamente com 1,9 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 10 vezes e 1,9 mL de solução de carbonato de sódio a 6% (p/v). Após 1 hora de reação (completa precipitação do carbonato), foi realizada a leitura de absorbância a 725 nm. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em mg Eq. catequina x 100 g⁻¹ queijo liofilizado.

Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas segundo os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, conforme é exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes e para pesquisa de *Salmonella spp.* (BRASIL, 2003).

Análise estatística

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado e os dados avaliados por análise de variância ($P < 0,05$), sendo que as análises de amins biogênicas e polifenóis no queijo foram feitas com três repetições em função do período de maturação. Para avaliação dos tratamentos em função de cada momento de maturação foi utilizado a análise de parcelas subdivididas. Para comparação entre as médias dos tratamentos, foi aplicado teste de Bonferroni, com nível de significância de 5% e foi utilizado o software estatístico Minitab® 16 (2010). Os coeficientes de correlação de Pearson foram obtidos utilizando o programa estatístico SAS®, 2003 (PROC CORR) com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Queijo

As análises microbiológicas realizadas não detectaram a presença de *Salmonella spp* e os valores encontrados nas determinações do número mais provável (NMP) de coliformes totais, coliformes termotolerantes e contagem de *Staphylococcus aureus* encontram-se dentro dos parâmetros propostos pela Portaria nº 146, anexo II, do MAPA (BRASIL, 1996) (Tabela 2).

Nos queijos de leite de ovelha foram detectadas as seguintes aminas: espermidina, espermina, cadaverina, putrescina, histamina, tiramina, dopamina e serotonina.

O total de aminas biogênicas encontradas no queijo no 20º dia de maturação foi: 26,0 mg/100g no tratamento controle, 11,1 mg/100g no tratamento óleo e 6,0 mg/100g no tratamento óleo. Schirone et al. (2011), analisou dez queijos Pecorino di Farindola produzidos com leite de ovelha e maturados por 90 dias, e encontrou resultados variáveis do total de aminas biogênicas de 209,0 a 2393 mg/kg. Resultados elevados quando comparados com esse experimento. Mesmo o tempo de maturação tendo sido menor que do trabalho citado, observa-se que, ao suplementar os animais com óleo de linhaça, a somatória de aminas biogênicas foi menor quando comparado ao tratamento controle. De acordo com Taylor (1985), o limiar de risco do total de aminas no queijo é de 100 mg/kg, isso se a ingestão estiver associada a co-fatores potenciadores como drogas inibidoras da monoamino oxidase (IMAO) ou álcool, ou então, se houver doenças gastrointestinais pré-existentes (STRATTON et al., 1991). Monoaminas, em particular a tiramina podem causar reações hipertensivas em pacientes tratados com drogas IMAO. Esta interação entre IMAO e tiramina é conhecida como “reação do queijo” (TAKEBA et al., 1990).

Putrescina, cadaverina e serotonina foram as aminas biogênicas presentes em maiores concentrações nos queijos. No tratamento controle e farelo a putrescina representou em média, no 20º dia de maturação, 75,6% e 59% respectivamente do total de aminas. No tratamento óleo a serotonina foi a que teve maior representatividade sendo 47,6% do total de aminas no 20º dia de maturação. Em seguida veio a cadaverina (21,0%). Dados diferentes foram encontrados por Schirone et al (2011), que em seis de dez amostras coletadas de queijo Pecorino di Farindola, a tiramina foi a amina de maior representatividade, maior que 40%.

Nesse estudo os valores de tiramina foram baixos, menores que 1% no 20º dia de maturação, 0,23% no tratamento controle, 0,47% tratamento farelo e 0,26% tratamento óleo. Um dos fatores que pode ter diminuído esse nível é o fato do leite ter sido pasteurizado, o que não ocorre no leite utilizado no queijo Pecorino di Farindola. Roig-Sagués et al. (2002), Martuscelli et al. (2005), Pintado et al. (2008), Ladero et al. (2010) citado por Schirone et al (2011), reportaram a incidência de tiramina em queijos

produzidos com leite cru de ovelhas. Outro fator importante para a produção de amins no queijo é o tempo de maturação (NOVELLA-RODRIGUEZ et al., 2002).

Diferença significativa ($P < 0,05$) foi encontrada no teor de amins biogênicas (espermidina, putrescina, cadaverina, tiramina, serotonina e dopamina) no queijo entre tratamento x tempo de maturação (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo de amins biogênicas e poliaminas presentes no queijo feito com leite de ovelhas da raça Bergamácia em função da interação dos tratamentos e período de maturação

Médias	Tratamento ¹	Dias de Maturação ²		
		1	10	20
Espermidina (mg/100g)				
0,36	CT	0,40 ± 0,02bA	0,30 ± 0,02bA	0,40 ± 0,03aA
	FL	0,20 ± 0,04cA	0,20 ± 0,02cA	0,20 ± 0,04bA
	OL	0,60 ± 0,06aA	0,50 ± 0,02 aAB	0,40 ± 0,02aBC
Putrescina (mg/100g)				
14,2	CT	8,70 ± 0,90 aB	21,80 ± 2,80 aA	22,10 ± 3,00aA
	FL	4,60 ± 0,06bB	6,00 ± 0,05bA	6,60 ± 1,80bA
	OL	1,30 ± 0,17cA	1,40 ± 0,06cA	1,10 ± 0,20cA
Cadaverina (mg/100g)				
1,80	CT	2,00 ± 0,40aB	3,50 ± 0,70aA	3,50 ± 0,14aA
	FL	1,10 ± 0,30aA	0,90 ± 0,06bA	1,00 ± 0,20bA
	OL	1,50 ± 0,04aA	1,80 ± 0,04bA	1,30 ± 0,05bA
Tiramina (mg/100g)				
0,02	CT	0,008 ± 0,0006aC	0,038 ± 0,010aB	0,066 ± 0,015aA
	FL	0,017 ± 0,018aB	0,027 ± 0,004aAB	0,053 ± 0,011aA
	OL	0,004 ± 0,0009aB	0,009 ± 0,004bB	0,016 ± 0,001bA
Serotonina (mg/100g)				
3,00	CT	2,60 ± 0,40bA	2,60 ± 0,40bA	2,90 ± 0,20aA
	FL	2,90 ± 0,30bA	2,50 ± 0,10bA	3,00 ± 0,07aA
	OL	3,90 ± 0,40aA	3,50 ± 0,08aA	2,80 ± 0,01aB
Dopamina (mg/100g)				
0,02	CT	0,030 ± 0,003aB	0,044 ± 0,004aA	0,053 ± 0,003aA
	FL	0,008 ± 0,007bA	0,007 ± 0,002bA	0,011 ± 0,008bA
	OL	0,016 ± 0,0007bA	0,011 ± 0,005bA	0,014 ± 0,002bA

¹Tratamento: Controle (CT): sem suplementação de óleo de linhaça; Farelo (FL): suplementadas com óleo de linhaça; Óleo (OL): suplementadas com óleo de linhaça.

²Maturação: Dia 1: dia do beneficiamento; Dia 10: dez dias de maturação; Dia 20: vinte dias de maturação.

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Bonferroni.

Observa-se que o período de maturação alterou todos os teores de espermidina, espermina, putrescina, cadaverina, tiramina, dopamina e serotonina em relação aos tratamentos. Os teores de espermidina foram maiores para o tratamento óleo nas amostras de queijos maturados nos dias 1 e 10. No dia 20, os valores encontrados foram semelhantes ao tratamento controle. Em relação aos momentos, só foi encontrada diferença ($P < 0,05$) nos momentos para o tratamento com óleo.

A inclusão de óleo ou farelo de linhaça alterou o teor de putrescina, levando-o a níveis menores em relação ao tratamento controle. Encontrou-se diferença ($P < 0,05$) na putrescina em todos os períodos de maturação em relação ao tratamento. Nos tratamentos controle e farelo, o teor de putrescina foi aumentando conforme aumentava o tempo de maturação, mas o mesmo não ocorreu com os queijos do tratamento óleo, o qual não foi significativo entre os momentos.

Observa-se que, nos queijos do tratamento óleo, o teor de putrescina manteve-se estável até o dia 20 de maturação, garantindo a qualidade do produto. No dia 20, o tratamento controle possuía 22,1 mg/100g, enquanto o tratamento farelo tinha 6,6 mg/100g e o tratamento óleo 1,1 mg/100g. Enfatiza-se que o tratamento óleo não elevou o teor de putrescina ao longo da maturação, diferentemente dos tratamentos controle e farelo.

A cadaverina foi encontrada nos queijos provavelmente devido ao fermento lácteo utilizado que intensifica não só ela, mas também outras aminas biogênicas e o próprio tempo de maturação. Segundo Perry (2004), entre as bactérias capazes de produzir as aminas biogênicas, têm-se as espécies *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Algumas destas estão presentes no queijo como parte de sua microbiota habitual, enquanto outras estão em decorrência de contaminação.

Ressalta-se que foram encontradas em baixos valores (Tabela 2) nos queijos a *Escherichia* e *Clostridium*, o que pode ter aumentando a produção dessas aminas, porém quando o óleo de linhaça foi utilizado, os valores diminuiram.

Os teores de cadaverina também foram influenciados pela interação tratamento x maturação ($P < 0,05$). Apenas foi encontrada diferença ($P < 0,05$) entre tratamentos nos momentos 10 e 20, com valores menores para o tratamento com farelo e óleo, sendo que

o tratamento farelo foi o que obteve o menor valor de cadaverina em todos os momentos.

Baixos teores de cadaverina e putrescina nos queijos são considerados satisfatórios, visto que os teores de histamina (uma das principais causas de intoxicação alimentar) podem ser intensificados com a presença de outras aminas. A putrescina e a cadaverina foram identificadas como potenciadores de efeito tóxico de outras aminas devido à inibição de enzimas desintoxicantes (SHALABY, 1996; VALSAMAKI et al., 2000). Ressalta-se também que as aminas putrescina e cadaverina em teores elevados são indesejáveis, visto que são encontradas em produtos em decomposição e putrefação, causando sabor pútrido ao alimento (GLÓRIA, 2005).

Houve efeito da interação tratamento x maturação sobre a amina tiramina. No tratamento controle houve diferença em todos os momentos, ocorrendo um aumento no teor de tiramina no decorrer da maturação, o mesmo comportamento aconteceu com os tratamentos óleo e farelo. Observa-se que em relação aos tratamentos, o tratamento com adição de óleo de linhaça apresentou menores valores e foi significativo em relação aos outros tratamentos no período de maturação 10 e 20 dias. O mesmo comportamento foi verificado para a amina cadaverina no tratamento óleo. Em relação ao período de maturação, o tratamento farelo foi significativo no momento 1 e 20.

Os níveis de serotonina foram maiores ($P < 0,05$) no tratamento com adição de óleo de linhaça para os períodos de maturação 1 e 10, e houve uma queda no dia 20 de maturação. Essa queda do nível de serotonina só foi observada no tratamento com óleo. Sugere-se, então, que o farelo de linhaça funcione como um bom estabilizador das aminas.

Os teores de dopamina foram maiores ($P < 0,05$) em todos os momentos no tratamento controle. Comportamento diferente dos teores de serotonina, onde os mesmos foram maiores no tratamento óleo. No tratamento controle houve um aumento nos níveis de dopamina dos períodos 1 ao 10 e manteve do 10 ao 20, porém esse mesmo aumento não foi notado nos tratamentos farelo e óleo.

Diferenças entre tratamentos ($P < 0,05$) foram encontrados para os teores de histamina, sendo significativo no tratamento com adição de óleo (0,0033 mg/100g) em relação ao farelo (0,0044 mg/100g) e controle (0,0071 mg/100g), porém não foi observada diferença entre farelo e óleo. O mesmo comportamento aconteceu com a

cadaverina e putrescina que apresentaram menores valores no tratamento óleo. Vale ressaltar que esses dados são de grande importância, pois as aminas cadaverina e putrescina podem potencializar o efeito da histamina.

Houve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos e maturação para a espermina. Obtendo maiores valores no tratamento óleo (0,40 mg/100g) e o tratamento com farelo com valores de 0,30 mg/100, e menores valores no tratamento farelo (0,20 mg/100g). Observa-se que durante a maturação só houve diferença no período 1, e mantendo no período 10 e 20 respectivamente, 0,40, 0,30 e 0,30 mg/100g. Sugerindo também que a suplementação é uma boa alternativa para aumentar as poliaminas que podem ajudar no organismo.

Para verificar a influência das aminas biogênicas no queijo tipo frescal curado foram estimadas a correlação entre as mesmas (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre os teores de amins biogênicas no queijo produzido com o leite de ovelhas da raça Bergamácia.

Parâmetros	Aminas Biogênicas								
	EPD	EPM	PUT	CAD	SRT	DPM	TIM	HIM	TOTAIS
EPD		<u>0,856</u> <0,0001	-0,316 0,1085	0,138 0,4909	<u>0,683</u> <0,0001	0,039 0,8430	<u>-0,486</u> 0,0102	-0,271 0,1719	-0,213 0,2861
EPM			-0,104 0,6051	0,295 0,1347	<u>0,484</u> 0,0105	0,209 0,2941	<u>-0,493</u> 0,0089	-0,200 0,3170	-0,012 0,9535
PUT				<u>0,869</u> <0,0001	<u>-0,417</u> 0,0307	<u>0,884</u> <0,0001	<u>0,713</u> <0,0001	<u>0,749</u> <0,0001	<u>0,993</u> <0,0001
CAD					-0,139 0,4897	<u>0,898</u> <0,0001	<u>0,481</u> 0,0112	<u>0,608</u> 0,0008	<u>0,914</u> <0,0001
SRT						-0,239 0,2304	<u>-0,315</u> 0,1091	-0,289 0,1429	-0,329 0,0938
DPM							<u>0,496</u> 0,0085	<u>0,730</u> <0,0001	<u>0,909</u> <0,0001
TIM								<u>0,479</u> 0,0114	<u>0,684</u> <0,0001
HIM									<u>0,738</u> <0,0001

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

A espermina apenas se correlacionou com a espermidina, serotonina e tiramina, esses dados diferem dos encontrados por Rigueira (2010) que analisando as amins biogênicas no queijo mussarela realizado com leite de vaca, encontrou a espermina como a amina que mais se correlacionou com a putrescina, cadaverina, tiramina, agmatina e espermidina. Observou-se correlação da putrescina com a cadaverina serotonina, dopamina, tiramina e histamina, sendo negativa apenas para a serotonina. A cadaverina obteve correlação positiva com as mesmas amins da putrescina com exceção da serotonina.

A amina tiramina foi a que apresentou maiores números de correlações negativas (espermidina e espermina) e correlação positiva (putrescina, cadaverina, dopamina e histamina). A putrescina e a cadaverina demonstraram alta correlação com a histamina e a tiramina afirmando o que vários autores relatam sobre a potencialização da histamina e tiramina na presença da cadaverina e putrescina.

O conteúdo de polifenóis totais do queijo está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Conteúdo de polifenóis totais (mg Eq. catequina/100 g) presentes no queijo feito com leite de ovelhas da raça Bergamácia em função da interação dos tratamentos e período de maturação

Tratamento ¹	Maturação ²		
	1	10	20
CT	49,5 ± 2,1bC	66,9 ± 2,0cB	76,8 ± 4,3Ac
FL	57,5 ± 2,2bC	77,4 ± 2,0bB	92,3 ± 5,6Aa
OL	68,4 ± 2,6aB	83,5 ± 1,2abA	82,2 ± 1,9Ab

¹Tratamento: Controle (CT): sem suplementação de óleo de linhaça; Farelo (FL): suplementadas com óleo de linhaça; Óleo (OL): suplementadas com óleo de linhaça.

²Maturação: Dia 1: dia do beneficiamento; Dia 10: dez dias de maturação; Dia 20: vinte dias de maturação. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Bonferroni.

Foi encontrado efeito significativo (P<0,05) da interação tratamento x maturação. Dentre os três períodos de maturação, o tratamento óleo foi o que apresentou maiores valores de polifenóis, apenas no período 20 o tratamento farelo apresentou um aumento. Nota-se também um aumento no teor de polifenóis durante o período de maturação; apenas o tratamento óleo se manteve igual a partir do 10º dia de maturação. Esse fato provavelmente ocorreu, pois a linhaça é uma rica fonte em polifenóis.

Na tabela 6 encontra-se a correlação dos polifenóis com as aminas biogênicas no queijo tipo minas curado elaborado com leite de ovelhas. Observa-se que apenas houve correlação dos polifenóis com a tiramina.

Tabela 6. Correlação entre os teores de polifenóis e aminas biogênicas no queijo de ovelhas da raça Bergamácia

Parâmetros	Coeficiente de correlação entre polifenóis e aminas biogênicas								
	EPD	EPM	PUT	CAD	SRT	DPM	TIM	HIM	TOTAIS
POLF	-0,015	-0,358	0,141	0,186	0,186	-0,209	0,387	-0,232	-0,144
	0,9377	0,0665	0,4824	0,3511	0,3507	0,2954	0,0463	0,2438	0,4720

Coeficiente de correlação em negrito e sublinhados são significativos a 5% de probabilidade. POLF – polifenóis, EPD – espermidina, EPM – espermina, PUT – putrescina, CAD – cadaverina, SRT – serotonina, DPM – dopamina, TIM – tiramina, HIM – histamina. Os valores abaixo do coeficiente são as probabilidades obtidas.

Conclusão

A suplementação com óleo de linhaça no queijo tipo minas curado mostrou-se mais eficiente na redução das amins putrescina, tiramina e histamina o quê favorece um melhor tempo de vida de prateleira para os queijos curados e menores índices de intoxicação.

Referências bibliográficas

BONASSI, I. A. **Elaboração de queijos e de outros produtos lácteos** - Manual Prático para pequena produção rural. Botucatu: ITESP/FUNDUNESP, 1999. 57p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] república Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] república Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003.

CARMO, F.B.T. et al. Histamina em conservas de sardinha. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n.1, p. 174-180, 2010.

CUNHA, A. R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. **Irriga**, Botucatu, v.14, n.1, p.1-11, jan./mar. 2009.

CUNHA, F.L. et al. Determinação de aminas biogênicas em diferentes tipos de queijos por cromatográfica líquida de alta eficiência. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.1, p. 69-75, 2012.

DADÁKOVÁ, E.; KRIZEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 116, p. 365-370, 2009.

FAO. Food and agriculture organization of the united nations. 2012, Disponível em: <http://www.faostat.fao.org.com>. Acesso em: 23 julho 2014.

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.

LADERO, V. et al. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutritional and Food Science**, v. 6, p. 145-156, 2010.

LI, W. et al. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. **Nutrition**, New York, v. 25, p. 105-114, 2009.

LIMA, G.P.P. et al. Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, p.1838–1843. 2008.

MARTUSCELLI, M. et al. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v.15, p.571 – 578, 2005.

MINITAB®16. Version 16.1.1. State College, PA: Minitab Inc., 2010. Software.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of sheep**. 6. ed. Washington: National Academy Press, 2007.

NOVELLA-RODRIGUEZ, S. Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milk. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 67, p. 2940-2944, 2002.

PENNA, C. F. A. M. **Produção e parâmetros de qualidade de leite e queijos de ovelhas Lacaune, Santa Inês e suas mestiças submetidas a dietas elaboradas com soja ou linhaça**. 2011. 155 p. Tese (Doutorado em Produção Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.2, p. 293-300, 2004.

PINTADO, A.I.E. Microbiological, biochemical and biogenic amine profile of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, p. 631-640, 2008.

RIGUEIRA, J.C.S. Influência da contagem de células somáticas no perfil e teores de amins bioativas e na qualidade de leite cru e queijo mussarela. 2010. 147f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ROIG-SAGUÈS, A.X.; MOLINA, A.P.; HERNANDES-HERRERO, M.M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **European Food Research and Technology**, v. 215, p.96-100, 2002.

SAS 2003. SAS/STAT. User's guide. Version 8.02. SAS Institute Incorporation, Cary, USA.

SCHIRONE, M. et al. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. **Food Microbiology**, London, v. 28, p.128-136, 2011.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965.

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

TAKEBA, K.; MARUYAM, T.; MATSUMOTO, M. Determination of tyramine in cheese by reserved-phase high-performance liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 4, p. 441-504, 1990.

TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. **World Health Organization**, Switzerland, p. 1-47, 1985.

VALSAMAKI, K.; MICHAELIDOU, A.; POLYCHRONIADOU, A. Biogenic amine production in feta cheese. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.71, p.259-266, 2000.

CAPÍTULO IV
IMPLICAÇÕES

Implicações

A ovinocultura de leite no Brasil é uma atividade recente e com grande potencial para crescimento, visto que todo o leite produzido é destinado a queijos e derivados devido à grande concentração do teor de gordura, o que favorece maior rendimento em relação às outras espécies.

O leite de ovelha e, principalmente o queijo, têm sido alvos de estudos e pesquisas para melhorar a produção, e melhorar a qualidade do produto. E uma maneira de se fazer isso é por meio da utilização de ingredientes na alimentação animal, que ajudem a melhorar a qualidade do leite e do queijo e essa inclusão pode ser feita de maneira industrial sem ocasionar maiores custos. E o uso de óleos e farelos de linhaça podem contribuir para isso, alterando a composição de ácidos graxos, a composição centesimal e os compostos antioxidantes.

Neste trabalho, os teores de espermidina, putrescina, cadaverina, serotonina, tiramina, dopamina e polifenóis não foram alterados no leite pelos tratamentos, e não foram encontradas publicações que possam concordar ou discordar desses dados encontrados. Por isso a necessidade de mais estudos nessa área de pesquisa.

Constatou-se também que a utilização do óleo e farelo de linhaça é uma alternativa para modificar os teores de putrescina e cadaverina nos queijos tipo minas curado conforme o tempo de maturação, detalhe relevante, pois essas duas aminas em excesso podem intensificar a concentração da histamina e tiramina, responsáveis por intoxicações e alergias. Também não foram encontrados trabalhos utilizando a suplementação lipídica e teores de poliaminas. Porém diversos trabalhos relatam que conforme aumenta o tempo de maturação, ocorre aumento nos teores dessas aminas.

O custo com óleo ou farelo de linhaça é alto, pois são produtos de grande valor agregado, porém o preço de venda do queijo realizado com leite de ovelha também é elevado o que acaba sendo diluído no seu preço final. Contudo recomenda-se a utilização dessas suplementações, ressaltando que o óleo de linhaça apresentou melhores valores.