

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) E CULTURAS ADJUNTAS (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) EM QUEIJO PRATO**

**Andréia Maria Faion**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL**  
**JULHO DE 2010**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) E CULTURAS ADJUNTAS (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) EM QUEIJO PRATO**

ANDRÉIA MARIA FAION

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Eunice Valduga, Dr<sup>a</sup>.  
Orientadora

---

Prof. Rogério Luis Cansian, Dr.  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Neila S. P. S. Richards, Dr<sup>a</sup>.

---

Prof<sup>a</sup>. Geciane Toniazzo, Dr<sup>a</sup>.

Erechim, 23 de julho de 2010

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

## DEDICATÓRIA

Ao meu querido esposo

Fausto, pela paciência, carinho, apoio, compreensão  
e incentivo durante a realização deste trabalho.

A minha irmã, Adriane pelo imenso apoio, incentivo e carinho.

À minha amada mãe, Rosa, por ter me ensinado o verdadeiro significado da vida e o verdadeiro valor das pessoas. Por ter me apoiado incondicionalmente em todas as minhas decisões. Por todo seu imenso amor, pelo seu carinho, cuidado e auxílio durante todos os momentos de minha vida

Ao meu amado pai, Irineu, por todo seu amor, pela dedicação e apoio.

A meus sogros Itacilio e Diva, por serem meus segundos pais, por toda ajuda apoio incondicional e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por mais esta conquista.

A minha querida família por fazerem parte da minha vida e serem sempre tão amorosos, um agradecimento muito especial a todos pelo carinho, incentivo e apoio.

Aos meus orientadores, Professor Dr. Rogério Cansian e a Professora Dr<sup>a</sup> Eunice Valduga, pela disponibilidade, oportunidade, compreensão, apoio, paciência e dedicação em todas as fases deste trabalho.

Aos professores Alexandre José Cichoski e Alice Terezinha Valduga pela ajuda prestada.

Aos membros da banca examinadora, que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho através das correções e sugestões apresentadas para a redação final deste trabalho.

A minha amiga e colega de curso Patrícia Beal, pelas longas conversas, pelos sorrisos e lágrimas compartilhadas, pela amizade, incentivo e força nos momentos difíceis.

Aos amigos que me foram acrescentadas nessa jornada Franciele, Rochele e Fabrício, pela ajuda no desenvolvimento das análises, pelas horas de convívio, pelas alegrias compartilhadas e pelo incentivo nos momentos difíceis. Muito obrigada.

Aos provadores da análise sensorial, que se dispuseram a colaborar.

Ao pessoal da Central de Materiais do prédio 9 pela paciência e ajuda na organização dos materiais necessários para as análises.

A Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, colegas, professores, e funcionários. A Engenharia de Alimentos pela oportunidade.

A todos que de alguma forma me ajudaram a superar os obstáculos e por estarem ao meu lado nessa caminhada.

Muito Obrigada!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) E CULTURAS ADJUNTAS (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) EM QUEIJO PRATO**

Andréia Maria faion

Julho/2010

**Orientadores:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Valduga

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian

**Resumo**

Nos últimos anos, algumas mudanças na tecnologia de fabricação do queijo prato têm sido efetuadas pelas indústrias de laticínios visando à melhoria de sua qualidade e na busca de produtos diferenciados. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi a elaboração de queijo prato contendo culturas adjuntas (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) e diferentes concentrações de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). O extrato de erva-mate foi obtido através extração (percolação) e secagem por atomização (spray-drier). No extrato avaliaram-se o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante. Para avaliar os efeitos da adição de culturas adjuntas mista e extrato em pó de erva-mate (0,1 a 0,2%, p/p) nas características físico-químicas (cor, umidade, pH, acidez, oxidação de lipídios e proteínas), microbiológicas (bactérias lácticas e culturas adjuntas mista) e sensoriais (aceitação geral, sabor e textura) durante 60 dias de maturação a 15 °C, empregou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo do teste de Tukey. O teor de polifenóis (0,40 a 1,01 mg/gEAC) e atividade antioxidante aumentaram proporcionalmente a concentração do extrato, sendo que a

atividade antioxidante foi de 99,5 % para a concentração 750 µg/mL fornecendo um IC<sub>50</sub> de 234,48 µg mL<sup>-1</sup>. Os queijos - Tipo Prato após o 7° dia de armazenamento foram classificados como queijos de alta umidade. O queijo prato com formulação contendo 0,1 e 0,2 % (p/p) de extrato após o 1° dia de armazenamento apresentaram os maiores valores de índice de cor a\* (0,95 a 2,86 e 0,89 a 3,17, respectivamente) e b\* (16,26 a 23,27 e 16,35 a 23,87, respectivamente), enquanto que os valores de L\* foram os menores (67,47 a 25,24 e 61,47 a 22,82, respectivamente). A adição do extrato de erva-mate no queijo Prato dificultou o crescimento das bactérias lácticas. Porém em relação a contagem das culturas adjuntas não se observou interferência do extrato de erva-mate no desenvolvimento desses microrganismos. Durante todo o período de armazenamento, os tratamentos que continham culturas adjuntas mistas juntamente com extrato de erva-mate e os queijos elaborados com extrato de erva-mate apresentaram diferença significativa (p<0,05) da formulação controle, em relação a oxidação lipídica de forma a apresentarem os menores valores de malonaldeído por Kg de amostra (0,031 a 0,082 mg MA/Kg), comprovando a ação antioxidante da presença do extrato da erva-mate no produto. Com relação a oxidação de proteínas o tratamento contendo 0,2 % (p/p) de extrato de erva-mate nos 60 dias de maturação apresentou diferença significativa (p<0,05) em relação ao tratamento considerado controle demonstrando ação antioxidante do mesmo frente a oxidação de proteínas também. As formulações adicionadas de culturas mesófilas e de 0,2 % (p/p) de extrato de erva-mate apresentaram as menores médias para os atributos aceitação geral, textura e sabor na avaliação sensorial.

Palavras-chave: Queijo Prato; *Ilex paraguariensis*; cultura adjunta.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

**INFLUENCE OF ADDITION OF YERBA MATE EXTRACT (*Ilex paraguariensis* St. Hil) AND ADJUNCT CULTURES (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis e cremoris*) IN PRATO CHEESE**

Andréia Maria Faion

July /2010

**Advisors:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Valduga  
Prof. Dr. Rogério Luis Cansian

**Abstract**

In recent years, some changes in manufacturing technology of cheese have been made by the dairy industry in order to improve their quality and the search for differentiated products. In this sense, the objective of this work was the preparation of cheese containing adjunct cultures (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis and cremoris*) and different concentrations of extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*). The extract of yerba mate was obtained by extraction (percolation) and spray drying (spray-drier). In the extract was evaluated in the polyphenol content and antioxidant activity. To evaluate the effects of addition of adjunct cultures mixed and powdered extract of yerba mate (0.1 to 0.2%) on the physical and chemical properties (color, moisture, pH, acidity, lipid oxidation and protein oxidation), microbiological (lactic acid bacteria and adjunct cultures mixed) and sensory (general acceptance, flavor and texture) during 60 days of ripening at 15 ° C, was employed to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. The polyphenol content (0.40 to 1.01 mg/GEAC) increased proportionally to the concentration of the extract. The antioxidant activity also increased proportionally to the concentration of extract reached 99.5% of antioxidant activity for the concentration 750 mg/mL providing

an IC50 of 234.48 g/mL. The physical-chemical analysis revealed that all cheeses after 7 days of storage were classified as high-moisture cheeses. The cheese plate with formulation containing 0.1 and 0.2% (w/w) of extract after the 1st day of storage showed the highest values of color index a \* (0.95 to 2.86 and 0.89 to 3.17 respectively) and b \* (16.26 to 23.27 and from 16.35 to 23.87 respectively), whereas the values of L \* were lower (67.47 to 25.24 and 61.47 to 22.82 respectively). The addition of the extract of yerba mate in cheese hindered the growth of lactic acid bacteria. But for the count of adjunct cultures there was no interference from the extract of mate in the development of these microorganisms. Throughout the storage period, the treatments containing adjunct cultures mixed together with extract and the cheeses made with yerba mate extract showed significant differences ( $p < 0.05$ ) than the control formulation in relation to lipid oxidation in order to submit the lowest values of malonaldehyde per kg sample (0,31 to 0,82 mg MA/Kg), confirming the antioxidant activity of the extract of yerba mate in the product. With respect to protein oxidation treatment containing 0.2% extract of mate within 60 days of ripening showed significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to treatment as the control showed the same antioxidant activity against protein oxidation too. The formulations added adjunct cultures and 0.2% of extract of mate had the lowest averages for the attributes of overall acceptability, texture and flavor on the sensory evaluation

Keywords: Prato cheese, *Ilex paraguariensis*, adjunct cultures.

## SUMÁRIO

Resumo .....	vi
Abstract .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Queijo Prato .....	3
2.2 Oxidação lipídica.....	6
2.3 Oxidação das proteínas .....	10
2.4 Antioxidantes .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Obtenção do extrato de erva-mate .....	20
3.2 Extração de compostos solúveis.....	21
3.3 Obtenção do extrato em pó de erva-mate.....	22
3.4 Determinações físico-químicas do extrato .....	23
3.4.1 Teor de polifenóis totais .....	23
3.4.2 Atividade antioxidante .....	24
3.5 Fabricação do queijo tipo Prato. ....	25
3.6 Determinações físico-químicas do queijo.....	28
3.6.1 Determinação da gordura.....	28
3.6.2 Nitrogênio total e/ou proteína total.....	28
3.6.3 Minerais totais .....	28
3.6.4 Cor objetiva .....	29
3.6.5 Determinação da Umidade.....	29
3.6.6 Determinação do pH.....	29

3.6.7	Determinação da acidez total .....	29
3.6.8	Oxidação de lipídios .....	30
3.6.9	Oxidação de proteínas .....	30
3.7	Análises microbiológicas .....	30
3.7.1	Contagem de bactérias lácticas.....	30
3.7.2	Contagem de culturas adjunta mista .....	31
3.8	Análise Sensorial .....	31
3.9	Análise estatística .....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1	Polifenóis totais e atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de erva-mate .....	34
4.2	Aspectos físicos dos queijos .....	37
4.2.1	Aspectos visuais.....	37
4.2.2	Cor objetiva .....	43
4.2.3	Umidade .....	50
4.2.4	pH.....	53
4.2.5	Acidez.....	56
4.2.6	Oxidação de lipídeos e proteínas. ....	59
4.3	Características microbiológicas .....	65
4.3.1	Bactérias lácticas.....	65
4.3.2	Culturas adjuntas.....	68
4.4	Características sensoriais .....	71
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	77
5.1	Conclusões .....	77
5.2	Sugestões para trabalhos futuros .....	79
6	REFERÊNCIAS .....	80
7	APÊNDICE A .....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica .	8
Figura 2 - Representação esquemática das reações das proteínas com produtos da oxidação lipídica	12
Figura 3 – Formação do complexo base de Schiff.	13
Figura 4 - Mecanismo de ação para os antioxidantes primários .	14
Figura 5– Aspectos das folhas de Erva-mate após secagem.	21
Figura 6 - Extrator de solúveis por percolação de solvente.....	21
Figura 7 - Vista frontal do secador por atomização	22
Figura 8 - Aparência do extrato de erva-mate após passagem pelo spray dryer	23
Figura 9 - Fluxograma do processo de elaboração do queijo tipo Prato.	27
Figura 10 - Material utilizado para a avaliação sensorial dos queijos tipo Prato.	32
Figura 11 - Ficha utilizada para a avaliação sensorial dos queijos tipo Prato.	32
Figura 12 – Aspectos físicos das formulações de queijo tipo prato aos 1(a), 7(b), 15(c), 30(d), 45(e) e 60(f) dia de armazenamento a 15C e UR de 85% respectivamente.....	40
Figura 13- Gráfico de dispersão para os valores de luminosidade aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.....	46
Figura 14- Gráfico de dispersão para os valores de a* aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%. .....	47
Figura 15- Gráfico de dispersão para os valores de b* ao 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%. .....	49
Figura 16- Gráfico de dispersão para os valores de umidade aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.....	52
Figura 17 - Gráfico de dispersão para os valores de pH aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%. .....	55

Figura 18 - Gráfico de dispersão para os valores de acidez aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.....	58
Figura 19 - Gráfico de dispersão para a oxidação lipídica das formulações de queijo prato aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.....	60
Figura 20 – Evolução da oxidação Protéica (nmol carbonil/ mg de proteína) nos queijos aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%. ....	63
Figura 21 - Gráfico de dispersão para os valores de UFC/ 100g de culturas lácticas aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.....	68
Figura 22 - Gráfico de dispersão para os valores de UFC/ 100g de culturas adjuntas aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.....	70
Figura 23 – Histograma de freqüência para Aceitação geral aos 30 (a), 45 (b) e 60 dias (c), respectivamente (9 - gostei muitíssimo, 8 - gostei muito, 7 - gostei moderadamente, 6 - gostei ligeiramente, 5 - nem gostei / nem desgostei, 4 - desgostei ligeiramente, 3 - desgostei moderadamente, 2 - desgostei muito, 1 - desgostei muitíssimo).....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de polifenóis no extrato erva-mate.....	34
Tabela 2 – Atividade antioxidante (AA) do extrato de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ). 36	
Tabela 3- Resposta ao rendimento (kg queijo/100 kg de leite) dos queijos tipo Prato..	40
Tabela 4- teor de proteína total, gordura, cinzas e umidade no 2º dia de armazenamento a 15 °C e 85% .	42
Tabela 5 – Índices de cor L*, a* e b* das formulações do queijo tipo Prato em diferentes períodos de armazenamento.....	43
Tabela 6 – Teores de umidade para as formulações do queijo Prato em diferentes períodos de armazenamento.....	50
Tabela 7 – pH das formulações de queijo Prato no 1º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15 °C.....	53
Tabela 8 – Acidez das formulações de queijo Prato para o 1º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15 °C.....	57
Tabela 9 – Oxidação e lipídios (mg de MA/ Kg amostra) para o 1º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15 °C em queijo Prato.....	59
Tabela 10 – Oxidação de proteínas (nmol carbonil/ mg proteína) das formulações de queijo Prato no 1º, 30º e 60º dias de armazenamento a 15 °C.....	62
Tabela 11 – Contagem de bactérias lácticas (log UFC/ 100g) das formulações de queijo Prato para o 1º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15 °C. ....	65
Tabela 12 – Contagem de culturas adjuntas para as formulações do queijo Prato para o 1º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15 °C. ....	69
Tabela 13 – Respostas dos atributos sensoriais de aceitação geral, sabor e textura do queijo Prato para o 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR.....	71

# 1 INTRODUÇÃO

Devido ao grande aumento na preocupação dos consumidores com relação as questões de saúde, a indústria de alimentos funcionais tem explorado cada vez mais, novos processos e aumentado a diversidade de produtos alimentares disponíveis para o consumo humano. Os consumidores modernos estão interessados em consumir alimentos que além de saudáveis também sejam capazes de prevenir doenças (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; MICHIDA et al., 2006). Nos países desenvolvidos é crescente a demanda por alimentos funcionais isto se deve ao fato de haver um incremento nos custos com a manutenção da saúde, dado o aumento da expectativa média de vida, e também ao interesse das pessoas idosas no prolongamento da sua qualidade de vida (HERNÁNDEZ e GUSMÁN, 2003). Além disso, há uma tendência geral em substituir ingredientes sintéticos por fontes naturais.

Os antioxidantes sintéticos como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT) normalmente utilizados na indústria alimentícia podem apresentar alguns inconvenientes; estudos têm demonstrado que essas substâncias podem causar efeitos adversos em animais, como por exemplo, extensa proliferação de células no pulmão, com mudanças bioquímicas, atuando como agente promotor no desenvolvimento de adenoma (WITSCHI & LOCK, 1978).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade antioxidante da erva-mate *in vitro* e *in vivo*. GUGLIUCCI e STAHL (1995) verificaram que extratos aquosos e alcoólicos de *Ilex paraguariensis* inibiram a oxidação da lipoproteína de baixa densidade “in vitro”, comparável ao ácido ascórbico. Propriedades antioxidantes de extratos aquosos de erva-mate *in vivo* foram confirmadas através da inibição da peroxidação lipídica em microsomas de fígado de ratos (SCHINELLA et al., 2000). CANTERLE et. al., (2005), verificaram que a erva-mate na forma de chimarrão possui uma importante quantidade de compostos fenólicos capazes de aumentarem o sistema de defesa antioxidante de um organismo sendo sua ingestão uma maneira eficaz e econômica de se usufruir de

seus benefícios. SALDANHA et al. (2005) verificaram, elevada atividade antioxidante em diferentes extratos de erva-mate (verde e tostada) e de chá verde, indicando o potencial uso dessas plantas como antioxidantes alimentícios. Mais recentemente o extrato de erva-mate foi investigado quanto a atividade antioxidante em produtos alimentícios tais como iogurte (PRECI, 2010) e carne de frango (PADILHA,2007).

O mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (RAMARATHNAM, OSAWA, KAWAKISHI, 1995)

A indústria de laticínios vem destacando-se nesse novo nicho de mercado de alimentos funcionais impulsionando a expansão principalmente de iogurtes, bebidas lácteas e de bebidas a base de soja (SAARELA et al., 2000; BISTRÖM et al., 2002; THAMER et al., 2006).

No Brasil o queijo Prato é um dos mais difundidos, com uma produção média de 70.000 ton, sendo considerado o segundo queijo mais consumido, com uma tendência cada vez maior no consumo de forma indireta, ou seja, como ingrediente culinário em sanduíches e lanches rápidos. Isto se deve principalmente pelo seu sabor suave, consistência macia e por sua fatiabilidade (BARROS, 2005).

Nesse contexto, o presente trabalho visou o acompanhamento da evolução de características físico-químicas (umidade, pH, acidez, oxidação de lipídios e proteínas), sensoriais (aceitação geral, sabor e textura) e contagem de bactérias lácticas e culturas mesófilas do queijo tipo Prato elaborado com leite contendo 3.2 % de gordura, adicionado de extrato de erva-mate e culturas mesófilas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*), durante o período de 60 dias de armazenamento a 15 °C e UR 85 %.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste item, são apresentados aspectos do processamento de queijo, principalmente do queijo prato e maturação. São abordados ainda, aspectos da legislação brasileira em vigor, fatores que afetam a maturação, oxidação de lipídeos e proteínas, antioxidantes sintéticos e naturais bem como as vantagens da adição de antioxidantes naturais na alimentação.

### **2.1 Queijo Prato**

O queijo prato começou a ser fabricado no Brasil na década de 20, por imigrantes dinamarqueses, que procuravam produzir um queijo similar ao Danbo dinamarquês e o Gouda holandês. A partir daí o Prato tornou-se um dos queijos mais fabricados no Brasil, perdendo apenas para o queijo Mussarela (SPADOTI, 2005).

Em 04 de setembro de 1997, o Ministério da Agricultura e Abastecimento através da Portaria 358 (BRASIL, 2009a), aprovou o Regulamento Técnico para Fixação da Identidade e Qualidade do queijo Prato, o qual teve por objetivo estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deve apresentar o queijo prato destinado ao consumo humano. Segundo este regulamento, o queijo tipo prato caracteriza-se por ser maturado, obtido por coagulação enzimática do leite, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo gordo, de média umidade. Apresenta como características, consistência elástica, textura macia e compacta, e pequenas olhaduras bem distribuídas. Tem como característica distinta no processo de elaboração a obtenção de uma massa semicozida por coagulação enzimática, com remoção parcial do soro, prensada, salgada e maturada (BRASIL, 2009b). Sua maturação é em torno de 45 a 60 dias e sua composição média esperada após a maturação é de 42 a 44% de umidade, 26 a 29%

de gordura, 1,6 a 1,9 % de sal, 23 a 25 % de proteína, apresentando pH entre 5,2 a 5,4 (AUGUSTO, 2003).

Além disso, o queijo deve se apresentar sem crosta ou com uma crosta fina, lisa sem trincas. Com a denominação “Queijo Prato” poderão ser encontrados diferentes tipos de produtos como o “Queijo Prato Lanche ou Sandwich” (na forma de paralelepípedo de seção transversal retangular), “Queijo Prato Cobocó” (de forma cilíndrica), e o “Queijo Prato Esférico ou Bola”. O peso varia de 0,4 a 5 kg de acordo com a variedade correspondente, sendo a variedade lanche a mais comercializada, já que o Prato é geralmente utilizado por sua boa fatiabilidade (BRASIL, 2009b). O rendimento de sua fabricação varia entre 9,0 a 10,0 L/Kg (SCOTT, 1991).

As etapas de fabricação do queijo Prato incluem a pasteurização do leite (72 °C/16 segundos), resfriamento a aproximadamente 32 °C, adição de cultura láctica e de coalho. As etapas de tratamento incluem corte, agitação, remoção parcial do soro e adição de água quente para promover o semicozimento da massa. Após a dessoragem, o queijo é enformado, salgado em salmoura, que posteriormente é seco e embalado a vácuo para posterior maturação (BRASIL, 2009b).

A operação de pasteurização na elaboração do queijo Prato é uma exigência legal trazendo, além da segurança sanitária, padronização tecnológica, uniformização do sabor e redução da incidência de defeitos e perdas, em consequência das fermentações anormais, sendo considerado, portanto, um dos fatores indispensáveis para a qualidade do produto oferecido ao mercado. O leite é um produto altamente perecível e a pasteurização é a forma de prolongar o seu tempo de conservação, preservando suas características naturais, além de torná-lo seguro sob o ponto de vista de saúde pública. A pasteurização consiste no emprego de calor, com o objetivo de eliminar totalmente a flora microbiana patogênica, a maioria fermentativa, sem alteração sensível de sua constituição física e do equilíbrio químico do leite, sem prejudicar seus elementos bioquímicos, como também suas propriedades organolépticas (SILVEIRA e ABREU, 2003).

O processo de maturação do queijo compreende um conjunto de modificações químicas, bioquímicas e microbiológicas, entre as quais se destacam a fermentação da

lactose, a hidrólise das proteínas e gorduras e a síntese de compostos aromáticos. A degradação da proteína modifica principalmente a textura, enquanto as hidrólises das gorduras liberam ácidos graxos livres, intensificando o aroma e a fermentação da lactose modifica o pH (acidez) e, conseqüentemente o sabor. Uma das principais características do queijo prato é a fatiabilidade e sua tendência de consumo de forma indireta em sanduíches e lanches rápidos (SCOTT, 1991).

A lipólise ou degradação da fração lipídica é produzida principalmente pela ação das lipases, que transformam os triacilglicerídeos em acilglicerídeos parciais e ácidos graxos livres. Estes podem permanecer no queijo, ou se transformarem em compostos como álcoois secundários, substâncias que contribuem intensamente na exaltação do aroma do queijo (ROSA, 2005).

A proteólise é o principal e o mais complexo evento bioquímico que ocorre durante a maturação da maioria das variedades de queijos, dando origem a numerosos produtos, como peptídeos, cetonas e aminoácidos livres (GARDE et al, 2002). Estes compostos responsáveis pelo sabor são liberados durante a mastigação. A proteólise contribui também para mudanças na textura pela quebra da cadeia de proteínas, aumento do pH (via formação de  $\text{NH}_3$ ) e aumento na capacidade de ligar água pela formação de novos grupos amínicos e carboxílicos (HENRIQUE, 2004). A proteólise em queijos é afetada por inúmeros fatores, incluindo atividade residual do coagulante, proteases naturais do leite (como plasmina), proteinases e peptidases liberadas pelos micro-organismos do fermento láctico, enzimas de micro-organismos presentes no queijo, como contaminantes e/ou sobreviventes à pasteurização. O coalho é responsável pela proteólise primária da caseína que resulta em mudanças na textura e formação dos compostos solúveis. As mudanças microbiológicas durante a maturação incluem a morte e a lise das células da cultura láctica e o crescimento da microbiota secundária (MCSWEENEY, 2004). As bactérias lácticas do fermento, responsáveis pela proteólise secundária, possuem um sistema proteinase/peptidase capaz de hidrolisar oligopeptídeos a peptídeos pequenos e aminoácidos que contribuem diretamente para o sabor. Os aminoácidos podem também servir como substratos para a formação de compostos de sabor adicionais. Outra importante consequência da

proteólise é a liberação de compostos de sabor que podem estar aprisionados no coágulo (BARROS, 2005).

Os *Lactococcus* são um dos grupos mais importantes de bactérias na indústria de laticínios. Entre as espécies deste gênero, apenas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris* são comumente usados no processamento do leite (GODON, 1992).

Dentre todas as espécies deste gênero, *Lactococcus lactis* é a mais importante comercialmente, composta das subespécies homofermentativas *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris* e da heterofermentativa *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Estas bactérias são utilizadas como fermento simples, misto ou múltiplo para fabricação de diferentes tipos de derivados lácteos (NASCIMENTO, 2007).

Esses micro-organismos são utilizados para a fabricação de diversos produtos lácteos, como leites fermentados, manteigas fermentadas e diversas variedades de queijos (PLATERO, 2008). A atuação das bactérias do fermento láctico é de fundamental importância no estabelecimento das características de queijos de massa curada.

A principal função das culturas iniciadoras e a produção de ácido, principalmente láctico como resultado de seu metabolismo. No entanto a contribuição das culturas iniciadoras para as características finais do produto não se limita ao processo de acidificação, mas é complementado com outras características tais como: atividade proteolítica, produção de compostos aromáticos, produção de CO<sub>2</sub>, síntese de polissacarídeos e produção de compostos inibidores (peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas) (MARTINEZ, 2005).

## 2.2 Oxidação lipídica

A oxidação espontânea (autooxidação) dos lipídios é um fenômeno natural em sistemas biológicos e do alimento. As reações de oxidação dos lipídios inicia-se nos

ácidos graxos insaturados sendo que nos alimentos essas reações podem ser divididas em duas categorias. Na primeira ocorre a oxidação das gorduras altamente insaturadas, (poliinsaturadas), podendo resultar na formação de produtos poliméricos. A segunda categoria relaciona-se a oxidação de gorduras moderadamente insaturadas levando ao aparecimento de ranço acompanhado de odores estranhos (PADILHA, 2007). Entre os diversos produtos formados na oxidação lipídica, o malonaldeído tem chamado a atenção da comunidade científica devido a sua provável relação com a formação de câncer (PEARSON et al., 1983) e propriedades mutagênicas (TORRES et al., 1998).

Os fenômenos de oxidação dos lipídios dependem de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. A natureza e o número das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes (como íons metálicos de transição) ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lipídios (COUPLAND e MCCLEMENTS, 1996). Todas as reações de oxidação envolvem espécies reativas do oxigênio, e a maioria destas reações envolvem radicais livres (AARDT, 2003; CARVALHO, 2007).

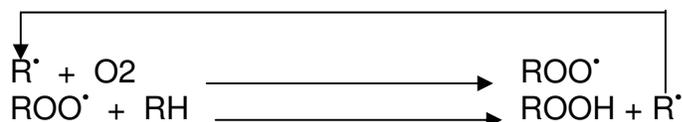
A presença de pró-oxidantes nos alimentos que contêm lipídios pode aumentar consideravelmente a oxidação. Os pró-oxidantes são geralmente metais de transição, particularmente aqueles que possuem dois ou mais estados de valência (CARVALHO, 2007). Esses metais podem atuar de duas formas: na redução da energia de ativação da reação inicial da oxidação e na decomposição de peróxidos (ARAUJO, 1999). A oxidação catalisada por cobre e ferro é provavelmente a mais importante do ponto de vista prático, porém outros metais, tais como manganês, cromo, níquel, zinco, cobalto e alumínio também podem promover a oxidação (CARVALHO, 2007).

A peroxidação lipídica ocorre por uma reação em cadeia, isto é, uma vez iniciado, ele se espalha rapidamente e atinge um grande número de moléculas lipídicas. O mecanismo da autooxidação, esquematizado na Figura 1 mostra o decurso da sequência reacional, onde é possível distinguir três etapas de evolução oxidativa: iniciação, propagação e terminação (COUPLAND e MCCLEMENTS, 1996; JADHAV, et al., 1996; ADEGOKE, et al., 1998; ARAÚJO, 2005; RAMALHO e JORGE, 2006).

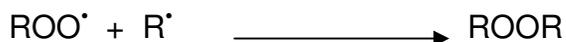
Iniciação - presença do catalisador - luz externa, íons metálicos.



Propagação - formação em cadeia de hidroperóxidos



Terminação - Inibe a propagação (R<sup>•</sup>)



R<sup>•</sup> = radical do ácido graxo; ROOH = hidroperóxido; ROO<sup>•</sup> = radical peróxido.

Figura 1 - Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica (CARVALHO, 2007)

*Iniciação:* a instabilidade de moléculas orgânicas associada a fatores catalisadores leva à formação do primeiro radical livre (R<sup>•</sup>), formado com um átomo de H retirado da molécula de gordura. Os principais catalisadores desta etapa são os íons metálicos, enzimas, meio alcalino, presença de calor ou luz, moléculas com insaturações, disponibilidade de oxigênio para reagir, etc. (SILVA et al., 1999; GORDON, 1990).

*Propagação:* o radical livre é atacado por molécula de O<sub>2</sub>, formando o radical livre peróxido (ROO<sup>•</sup>). Este radical peróxido ataca nova molécula de gordura, formando hidroperóxido e mais um radical livre, iniciando assim o processo de oxidação em cadeia. Se O<sub>2</sub> disponível for suficiente e nenhum antioxidante for adicionado, esta etapa continua degradando o produto (SILVA et al., 1999).

*Terminação:* Peróxidos (R-R, ROOR) se combinam, formando moléculas mais estáveis. Os hidroperóxidos (ROOH) formam várias outras moléculas com funções

ácidas, aldeídicas, etc. Nesta etapa, ocorre redução do consumo de oxigênio, diminuição dos peróxidos, e forte alteração sensorial, podendo haver alterações da cor e viscosidade (BOBBIO, 1992), ou seja, todo material é degradado irreversivelmente, levando a decomposição total do produto e gerando odores rançosos, provenientes das moléculas voláteis formadas (SILVA et al., 1999).

A oxidação lipídica gera produtos residuais, tais como aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois, hidrocarbonetos, etc. que além de produzirem sabores e aromas desagradáveis, diminuem a qualidade nutricional e a segurança dos alimentos (RIBEIRO et al., 2007; TRINDADE, 2007). Além dos lipídios, eventualmente outros componentes podem ser afetados como as proteínas, pigmentos e vitaminas (ARAÚJO, 1999).

Os hidroperóxidos formados na auto-oxidação dos ácidos graxos polinsaturados são considerados produtos primários e constituem uma mistura complexa de compostos que diferem tanto na posição do grupo peróxido da cadeia carbonada como na estrutura isomérica das ligações duplas. Estes produtos da oxidação são muito instáveis, em particular, a temperaturas altas e na presença de íons metálicos de transição, decompondo-se formando um grande conjunto de compostos que incluem aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos, etc. Estes compostos são denominados de produtos secundários da oxidação, sendo os responsáveis por odores e sabores típicos dos produtos oxidados, uma vez que os hidroperóxidos são insípidos e inodoros. Os produtos secundários da auto-oxidação provêm de intermediários como os radicais peróxidos ( $\text{ROO}\cdot$ ) (FARIA e BATISTA, 2007).

A estabilidade oxidativa nos alimentos é dependente do equilíbrio entre a composição e concentração do substrato e a presença de pró-oxidantes. A remoção do oxigênio, inativação de enzimas, proteção contra luz e íons metálicos são importantes para evitar ou minimizar a oxidação lipídica. No entanto, estas medidas nem sempre são aplicáveis. A adição de antioxidantes constitui prática mais comum para aumentar a estabilidade dos lipídios (DECKER, 1998).

## 2.3 Oxidação das proteínas

O termo “oxidação protéica” refere-se à modificação de uma proteína induzida diretamente por espécies reativas ou indiretamente através de reações com produtos secundários resultantes do estresse oxidativo (ROTTA, 2007).

Os produtos primários da oxidação lipídica (hidroperóxidos) e produtos secundários (aldeídos e cetonas) podem reagir com as proteínas, causando a oxidação da proteína (VILJANEN, 2005). O radical peróxido e, ou, os produtos oriundos de sua degradação, podem interagir com as proteínas e aminoácidos, promovendo alterações adversas na solubilidade, atividade enzimática e qualidade nutricional da proteína (ARAÚJO, 1999).

A oxidação da proteína ocorre através das reações com radicais livres como o radical peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ) formado durante a oxidação lipídica pode abstrair átomos de hidrogênio das moléculas de proteína (PH), (reação 1). Conseqüentemente, ocorre a formação dos radicais da proteína (P) que podem por sua vez criar uma rede da proteína (P-P) devido à ligação cruzada (reação 2) (VILJANEN,2005).



Os peróxidos podem agir na degradação das proteínas em dois sentidos: 1) produzindo a oxidação da cisteína a ácido cistéico e da metionina a sulfóxido de metionina; 2) reação do tipo *Maillard* com os aldeídos e cetonas resultantes da degradação dos peróxidos lipídicos (SGARBIERI, 1996).

Igualmente postula-se que o processo da oxidação da proteína pode ocorrer através da formação complexa não-covalente através de atrações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o hidroperóxido lipídico ( $\text{ROOH}$ ) (reação 3) ou produtos secundários da oxidação lipídica (principalmente aldeídos e cetonas, desagregação produtos de hidroperóxidos lipídicos) e os centros do nitrogênio ou do enxofre de resíduos reativos de aminoácidos da proteína (AUBOURG, 1999).



As reações da oxidação afetam a qualidade do alimento, mas igualmente têm um impacto na carga e na conformação da estrutura tridimensional da proteína (exposição de grupos hidrofóbicos e mudanças na estrutura secundária), perda da atividade enzimática, e alterações no valor nutritivo (perda de aminoácidos essenciais). A oxidação de proteínas e aminoácidos é afetada por vários fatores ambientais, tais como pH, temperatura, atividade de água, e a presença de catalisadores ou inibidores (AYNIES et al., 1992).

A suscetibilidade das proteínas sofrerem danos por produtos da oxidação lipídica depende dos seguintes fatores (WONG, 1995):

1. Acessibilidade dos aminoácidos reativos situados na superfície da molécula protéica.
2. Interação hidrofóbica ou formação de pontes (ligações) de hidrogênio entre as moléculas lipídicas e superfície protéica e que aproximem os reagentes e exponham as cadeias laterais ocultas dos aminoácidos, facilitando assim sua reação;
3. Presença no sistema de radicais iniciadores.

Na Figura 2 é mostrado as possíveis vias de oxidação protéica na presença de oxigênio e produtos da oxidação lipídica. O primeiro átomo de hidrogênio é abstraído da proteína (PH) por um radical não protéico ( $A^\cdot$ ), e há transferências das proteínas para radical proteínas ( $P^\cdot$ ) (a). Em seguida três maneiras possíveis para que o radical da proteína reaja: oxidação (b), transferência (c), e ligação cruzada (d). Na oxidação, o radical da proteína está reagindo diretamente com o oxigênio que conduz à proteína-peroxyl ( $\text{PO}_2^\cdot$ ) e finalmente cisão. Na transferência, o radical da proteína está abstraindo o hidrogênio de outros compostos atuais para dar forma à proteína ou ao hidroperóxido não radical da proteína dependendo dos compostos de participação. No mecanismo da ligação cruzada, a proteína não é modificada ocorrendo ligação cruzada com os produtos da oxidação lipídica tais como hidroperóxidos ou aldeídos (b) ou dois radicais da proteína interagem dando forma a ligações transversais de proteína-proteína (P-P) (VILJANEN, 2005).

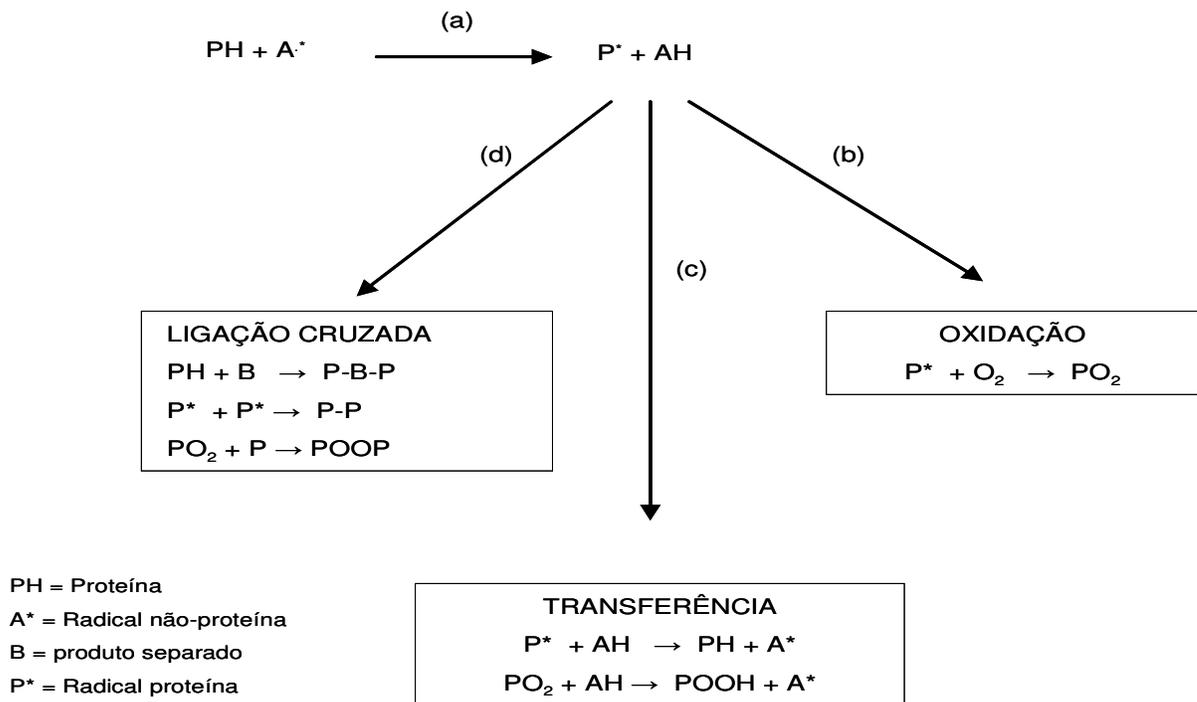


Figura 2 - Representação esquemática das reações das proteínas com produtos da oxidação lipídica (VILJANEN, 2005).

Segundo SGARBIERI (1996) dois tipos de reações de degradação parecem predominar nas interações de proteínas com lipídios oxidados: 1) reações de radicais livres; 2) reações do tipo carbonilamina. Radicais livres lipídicos como  $L^*$ ,  $LO^*$  (alcoxi), e  $LOO^*$  (peroxil) reagem com as proteínas (PH) em reações de adição resultando em complexos lipoprotéicos como:



Nas reações do tipo carbonilamina a reação ocorre entre aldeídos de cadeias longas ou curtas resultantes da degradação de peróxidos de ácidos graxos insaturados

e grupos amínicos da proteína, via formação de complexo do tipo base de Schiff (Figura 3).

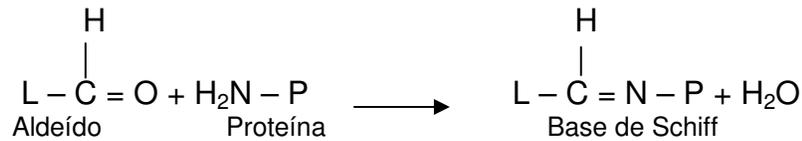


Figura 3 – Formação do complexo base de Schiff.

Como consequência do dano oxidativo, as proteínas podem sofrer modificações em aminoácidos específicos, mudanças conformacionais, fragmentação da cadeia peptídica ou alteração da carga elétrica. Estas alterações podem causar diversas consequências funcionais, tais como aumento da susceptibilidade à proteólise e inativação enzimática (ROTTA, 2007).

O efeito mais significativo da oxidação das proteínas nos alimentos é a mudança nas propriedades reológicas. Isto ocorre principalmente devido à desagregação trans-articular da estrutura primária da proteína, e alterações conformacionais. Como na oxidação lipídica, a oxidação protéica pode ser desencadeada por fatores incluindo a luz, irradiação gama, peroxidação de lipídeos, íons metálicos, entre outros. Algumas alterações oxidativas em proteínas e aminoácidos, que resultam no desenvolvimento de aromas anormais são aqui resumidas: (1) A oxidação de histidina, cisteína, metionina, triptofano, e tirosina pelo íon superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete pode ocorrer quando o alimento contém fotossensibilizadores como a riboflavina, e é exposto à luz; (2) Aminoácidos livres e aminoácidos residuais são submetidos a substancial oxidação na presença de lipídios peroxidados. Metionina, cisteína, histidina e lisina são os aminoácidos mais suscetíveis ou aminoácidos resíduos (AARDT, 2003).

## 2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes, de acordo com a 'Food and Drug Administration' (FDA), são substâncias usadas para preservar alimentos através do retardo da deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autooxidação (CANTERLE, 2005). Porém estes compostos não inibem somente a peroxidação de lipídios, mas também, a oxidação de outras moléculas como proteínas, ácido desoxirribonucléico (DNA), entre outras (OLIVEIRA et al., 2007), de um modo mais amplo pode-se definir antioxidantes como qualquer substância que em pequenas concentrações (0,01 %) em presença de substratos oxidáveis, retardam ou inibem significativamente a oxidação dos mesmos (SIES, 1993). Como substrato oxidável pode-se considerar quase todas as moléculas orgânicas ou inorgânicas que se encontram nas células vivas (proteínas, lipídios, hidratos de carbono e as moléculas de DNA) (GUTIÉRREZ, 2002).

Os antioxidantes são classificados em primários e secundários, considerando o modo como interagem com o substrato oxidável. Assim, os antioxidantes primários ou de tipo 1 atrasam ou inibem o passo de iniciação ou interrompem a etapa de propagação da auto-oxidação. Em geral, reagem com os radicais, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis como pode ser verificado na Figura 4 (RAMALHO e JORGE, 2006).



Onde: ROO<sup>•</sup> e R<sup>•</sup> são radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A<sup>•</sup> - radical inerte.

Figura 4 - Mecanismo de ação para os antioxidantes primários (RAMALHO e JORGE, 2006).

Já os antioxidantes secundários, preventivos ou de tipo 2 atuam através de vários mecanismos que incluem: (i) Decomposição dos hidroperóxidos em compostos inativos, como é o caso de vários tióis e sulfetos; (ii) Diminuição da sensibilidade dos sistemas com duplas ligações para formar radicais livres, como a estabilização do ácido

linoléico pelo hidróxido de potássio; (iii) Prevenção da iniciação por ação da luz ou de outra radiação, tais como os carotenóides que neutralizam o efeito de fotosensibilização da clorofila; (iv) Desativação de metais pesados, tal como agentes quelantes como ácido cítrico, fosfórico e fumárico (FARIA e BATISTA, 2007).

Na escolha de antioxidantes são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01 %); ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor ou em outras características do alimento; fácil aplicação e estabilidade nas condições de processo e armazenamento. Além destes fatores, outros devem ser considerados, incluindo legislação, custo e a preferência do consumidor por produtos naturais (RAMALHO e JORGE, 2006).

Há quatro mecanismos propostos pelos quais os antioxidantes agem: doação de hidrogênio pelo antioxidante; doação de elétrons pelo antioxidante; adição do lipídio ao anel aromático do antioxidante; formação de um complexo entre lipídio e o anel aromático do antioxidante (CARVALHO, 2005).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, arteriosclerose, artrite reumática, entre outras. A autooxidação dos ácidos graxos que compõem a membrana celular é apontada como o processo oxidativo mais frequente no organismo humano (RAMARATHNAM et al, 1995).

A maioria dos organismos aeróbicos desenvolveram sistemas diferentes para lidar com os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio. A primeira linha de defesa antioxidante envolve a prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio. Metais quelantes podem impedir a formação de espécies reativas de oxigênio por suprimir processos tais como a reação Haber-Weiss ( $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$ ) e conseqüentemente reduzindo a produção dos radicais hidroxila que são muito reativas. A segunda linha de defesa antioxidante é composta de enzimas antioxidantes e de compostos de baixo peso molecular que atuam bloqueando a etapa de propagação radicalar, sequestrando radicais intermediários e impedindo a formação de espécies

reativas. Os componentes antioxidantes decompõem então as espécies reativas evitando a formação de lesões oxidativas em biomoléculas (NETTO, 2001).

O sistema de defesa antioxidante humano é composto principalmente pelas enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase que fazem parte dos conhecidos antioxidantes endógenos. Essas enzimas são capazes de modificar radicais livres, inativando seus efeitos maléficos no organismo (VALQUEZ et al., 2006). Muitas destas enzimas são referidas geralmente como enzimas de duas fases porque catalisam a conversão do xenobióticos, de metabólitos mutagênicos ou de seus precursores aos compostos que são mais prontamente excretados (BLOMHOFF et al., 2006).

O mecanismo de defesa antioxidante também dispõe de meios exógenos que podem ser de natureza vitamínica ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico), minerais (zinco, selênio e cobre) ou ácido sulfúrico e substâncias bioflavonóides encontradas especialmente em alimentos de origem vegetal (frutas, legumes, cereais e leguminosas) (VALQUEZ et al., 2006). As defesas antioxidantes endógenas têm como função remover radicais livres tóxicos ou convertê-los em produtos intermediários não tóxicos (REITER et al., 2001).

É crescente o número de evidências que sugestionam que doenças degenerativas, principalmente disfunções cerebrais, câncer e as do coração podem ser resultados de danos celulares causados por radicais livres e a presença de antioxidantes naturais poderia ser um importante meio de prevenção dessas doenças. Além disso, a utilização de antioxidantes sintéticos, como BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e TBHQ (t-butil-hidroquinona), apresenta restrições em diversos países devido aos seus possíveis efeitos indesejáveis para saúde humana, mas ainda são muito utilizados pela indústria alimentícia devido a sua alta estabilidade, entre outras vantagens. A utilização destes produtos vem diminuindo pela suspeita de serem promotores do processo de carcinogênese (CARVALHO, 2007). Com isso vem aumentando o interesse por antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios e farmacêuticos, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos já que podem apresentar certa toxicidade e até mesmo serem potenciais carcinogênicos (PIECADE, 2007). Com relação às doenças

cardiovasculares, a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) tem sido considerada uma das mais significativas. Nesse contexto, há relatos do efeito antioxidante do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) sobre a oxidação dessa lipoproteína, *in vivo* e *in vitro* (SANTOS, 2004).

Os antioxidantes naturais funcionam como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como quelantes ou como desativadores de metais pró-oxidantes (PIEIDADE, 2007).

De acordo com sua modalidade da ação, os antioxidantes naturais podem ser classificados como os antioxidantes (de quebra) preliminares, que podem reagir diretamente com os radicais do lipídio e os converter em produtos estáveis, ou como os antioxidantes (preventivos) secundários, que podem abaixar a taxa de oxidação por mecanismos diferentes. Os antioxidantes preliminares atuam mais frequentemente doando um átomo de hidrogênio, enquanto antioxidantes secundários podem agir por ligação íons metálicos capazes de catalisar processos oxidativos, pelo sequestro de oxigênio, absorvendo radiação UV, por inibição de enzimas ou decomposição hidroperóxidos (EKLUND et al., 2005).

Os antioxidantes incluem uma variedade de vitaminas, carotenóides, os minerais, e fitoquímicos que desativam radicais livres e desse modo impedem dano às membranas celulares ou material genético dentro da célula (MURTAUGH et al., 2004).

Os antioxidantes naturais na dieta humana podem atenuar os efeitos dos genes mutagênicos e carcinogênicos. Alguns antioxidantes, como vitaminas A, C e E, podem minimizar os efeitos colaterais de drogas antineoplásticas e pode melhorar a quimioterapia. Um aumento no teor de antioxidantes da dieta através do aumento da ingestão de frutas e vegetais ricos desses compostos pode diminuir a oxidação do DNA por radicais livres, prevenindo câncer e outras doenças degenerativas. Danos oxidativos a biomoléculas provocadas pelo estresse estão entre os principais fatores de risco para aterosclerose, principalmente através da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue. Assim, o câncer, aterosclerose e outras doenças degenerativas, são partes de um mecanismo comum (VILELA et al., 2008).

O interesse no uso potencial da erva-mate para a promoção da saúde é relativamente recente. Segundo SALDANHA (2005), a erva-mate apresenta atividade

antioxidante equivalente ou superior à vitamina C, vitamina E e ao Trolox®, substâncias consideradas como padrão para essas propriedades. O mecanismo proposto relaciona-se com a presença de substâncias (principalmente polifenóis) capazes de sequestrarem radicais livres formados no início do processo de oxidação. Propriedades antioxidantes também foram encontradas nas folhas de infusões da erva mate (*Ilex paraguariensis*) (RIVELLI et al., 2007). A importância desta atividade está relacionada com o potencial da erva-mate ou de produtos derivados, de proteção frente aos radicais livres e a peroxidação lipídica envolvidos em várias doenças como diabetes e arteriosclerose (SILVA, 2007).

Em sua constituição química a erva-mate apresenta como principais fitoquímicos os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (ACGs) e seus isômeros, aos quais é atribuída a ação adstringente e antioxidante do produto (MATSUMOTO, 2008), que podem conferir um papel hepatoprotetor (função de auxílio ao fígado) (JACQUES, 2005) e apresentar efeito hipocolesterolêmico em função da redução da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), minimizando a formação do ateroma, característica essa atribuída aos constituintes fenólicos presentes nas folhas. Além desses compostos a erva-mate apresenta sais minerais, vitaminas, aminoácidos e outros flavonóides como quercetina e rutina (SANTOS, 2004).

Na composição fenólica da erva-mate os ácidos clorogênicos (CGAS), tem sido investigados com possível atividade antitumoral, bem como a capacidade de inibir a carcinogênese. Os mesmos revelaram propriedades benéficas durante o uso de nutracêuticos na terapia do câncer (MIRANDA et al., 2008). CGAS são compostos antioxidantes potentes e podem agir como doadores de hidrogênio ou de elétron e também como quelante de íons metálicos de transição (BASTOS et al., 2007). SILVA (2007) também relata que esses compostos são substâncias para as quais se tem atribuído o potencial antioxidante *in vitro* da *Ilex paraguariensis*.

Os compostos fenólicos estabilizam a oxidação lipídica ao ceder um hidrogênio de suas hidroxilas, formando uma ponte de hidrogênio com as moléculas dos radicais livres interrompendo a reação em cadeia (COLOMER, 2003). O hidrogênio ácido da hidroxila fenólica é mais facilmente abstraído pelos radicais livres que os hidrogênios

alílicos ou dialílicos das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e o radical arila do antioxidante é estabilizado por ressonância (RAMALHO e JORGE, 2006).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUZA et al,2007).

A utilização de plantas e ervas como antioxidantes em alimentos processados está tornando-se cada vez mais importante na indústria da alimentação como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos (ZHENG e WANG, 2001). MILANI et al. (2001) em estudo comparativo do efeito antioxidante de extratos hidro-etanólico e metílico de casca de maçã, folhas de alcachofra e erva-mate em carne mecanicamente separada (CMS) de frango mantidas sob refrigeração e congelamento constataram através do índice das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que o extrato metílico de erva-mate apresentou maior poder antioxidante com determinação de 1,68 mg de malonaldeído/kg de amostra, enquanto que os demais extratos testados apresentaram 7,95 mg de malonaldeído/kg de amostra. CAMPOS et al. (2007) trabalhando com salame, concluíram que a adição de extrato hidro-etanólico de erva-mate controlou a oxidação lipídica mantendo o produto cárneo com baixos valores (1,75 mg de malonaldeído/kg de amostra) de TBARS. Em iogurte *light* tradicional e probiótico acrescido de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), no 60º dia de armazenamento refrigerado os iogurtes tradicional e probiótico contendo 0,1 e 0,25 % de extrato de erva mate apresentaram diferença estatística em relação às duas formulações que não receberam a adição de extrato, de forma a apresentarem os menores valores de mg de MDA/kg de amostra, comprovando a ação antioxidante da presença do extrato da erva-mate no produto (PRECI, 2010).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Obtenção do extrato de erva-mate

As folhas de erva mate (*Ilex paraguariensis*) foram colhidas de um cultivo homogêneo de produção a pleno sol, localizada no interior do município de Barão de Cotegipe – RS, sob as coordenadas 27°37'15" S, 52°22'47" W, e 765m de altitude. Foram coletadas folhas e pequenos ramos maduros no mês de agosto de 2008, entre 9 e 11 horas da manhã, e acondicionadas em filmes plásticos até serem submetidas ao processamento.

Logo após a colheita realizou-se o processo de sapeco da erva-mate, onde em cada batelada foram processadas 240g de folhas de erva-mate em sapecador experimental conforme metodologia descrita por VALDUGA et al. (2002).

A temperatura utilizada foi de 180°C/5 minutos a 60 rpm, a fim de promover a retirada da umidade superficial e inativação do complexo enzimático das folhas (peroxidases e polifenoloxidase) evitando que as folhas se tornassem escuras e de sabor desagradável. O processo seguinte consistiu da secagem da erva-mate, realizado a temperatura de 70°C /90 minutos em um mini-secador de bancada de leito fixo, com objetivo de garantir o parâmetro de comercialização de umidade inferior a 5%. A Figura 5 apresenta o aspecto das folhas de erva-mate após a secagem. Após o processo de secagem utilizando um triturador de facas Máster mixer (Walita), as folhas foram trituradas durante 20 segundos, na velocidade 2. Logo após, a amostra passou por uma peneira da série TYLER com mesh 16 (2,36 mm), sendo possível homogeneizá-la, descartando a fração retida na peneira. A erva-mate seca e triturada (cancheada) foi utilizada para a obtenção do extrato solúvel.



Figura 5– Aspectos das folhas de Erva-mate após secagem.

### 3.2 Extração de compostos solúveis

A extração de solúveis da erva-mate foi efetuada segundo metodologia descrita por VALDUGA (2002), em um extrator por percolação de solvente (Bialetti) (Figura 6) onde: A - depósito do solvente; B – filtro; C – válvula de segurança; D – coletor de extrato; E – filtro; F – borracha de vedação. O cilindro é conectado no interior do extrator. Através de fornecimento de calor, a água percola a erva-mate moída extraíndo os solúveis na parte superior do extrator. Para uma única extração, a percentagem de solúveis extraídos, com relação à massa de erva-mate pode atingir 35,5 %, em extração, neste processo utilizou-se 350 mL de água, 24 g de folhas de erva-mate trituradas a temperatura do extrato de 96°C.

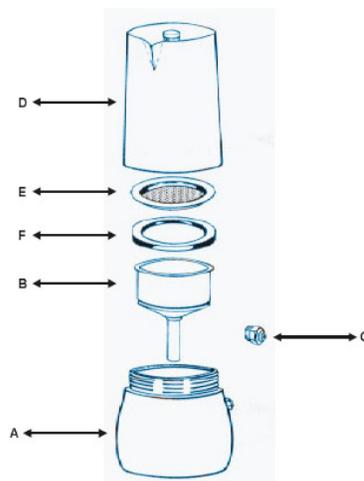


Figura 6 - Extrator de compostos solúveis por percolação de solvente.

### 3.3 Obtenção do extrato em pó de erva-mate.

A secagem do extrato de erva-mate foi realizada em um secador por atomização (LabPlant SD-05 Spray drying) produzindo partículas sólidas de solúveis de erva-mate. O extrato de erva-mate foi bombeado com uma bomba peristáltica até um atomizador. O ar aquecido é admitido no interior da câmara de secagem onde ocorre evaporação instantânea da umidade contida nas gotículas de solução de erva-mate. Como resultado da secagem, são produzidas partículas sólidas de solúveis de erva-mate. O próprio ar de secagem constitui o veículo de arraste do pó de extrato de erva-mate formado. A corrente ar-sólido é admitida em um ciclone onde ocorre a separação do pó de erva-mate. A Figura 7 apresenta a vista frontal do secador por atomização operando na secagem do extrato de erva mate.



Figura 7 - Vista frontal do secador por atomização

Para obtenção do extrato de erva-mate foi utilizada metodologia descrita por VALDUGA (2002), utilizando temperatura de ar 190°C, vazão de ar admitida pelo soprador de 47 m<sup>3</sup>/h e vazão do extrato admitida no secador de 600 mL/h. O extrato atomizado foi acondicionado em recipientes de vidro âmbar hermeticamente fechado até o momento da adição no queijo. O mesmo foi submetido à análise de atividade antioxidante *in vitro*. A Figura 8 corresponde à aparência do extrato após a passagem

pelo spray-dryer originando o extrato da erva-mate o qual foi utilizado para a realização dos experimentos



Figura 8 - Aparência do extrato de erva-mate após secagem em spray-dryer

### **3.4 Determinações físico-químicas do extrato**

#### **3.4.1 Teor de polifenóis totais**

A análise do teor de polifenóis totais do extrato foi efetuada de acordo com ZIELISKI e KOZOWSKA (2000), modificado. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL do extrato diluído na solução aquosa de acetona 50 % na proporção de 1:25, 2 mL de água destilada e 0,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos a temperatura ambiente (25°C) adicionaram-se 0,25 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio (75 g/L). Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C durante 30 min para o desenvolvimento da cor. A leitura da absorbância no comprimento de onda de 765 nm foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (Agilent Technologies, modelo 8453E). Para o preparo da curva de calibração foram utilizados alíquotas (0,25 mL) de uma solução de acetona e ácido pirocatecol nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg/g (de resíduo seco) ambos equivalente de ácido pirocatecol (respectivamente mg/mL/EAC).

### 3.4.2 Atividade antioxidante

A capacidade de sequestrar radicais livres foi determinada utilizando o radical estável 2,2 difenil-1-picrilhidrasil (DPPH) de acordo com o método de BRAND-WILLIAMS et al. (1995), com modificações. Aos extratos (750 µL) foi adicionado 1,5 mL de uma solução DPPH em acetona na concentração de 20 mg/mL (preparado diariamente). O meio de reação foi mantido em temperatura ambiente durante os 20 minutos do ensaio. Quando o DPPH reage com um antioxidante que pode doar hidrogênio ele é reduzido. As mudanças na coloração (de violeta escuro para amarelo claro) são medidas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. A leitura do decréscimo da absorbância foi realizada em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20 min). A equação 1 utilizada para o cálculo do percentual de captação do DPPH foi a seguinte:

$$\% \text{ de Captação do DPPH} = \frac{[(\text{Abs. do branco do DPPH}) - (\text{Abs. final da amostra} - \text{Abs. do branco da amostra})]}{\text{Abs. do branco do DPPH}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

- Abs. = absorbância
- Branco do DPPH: 0,75 mL de acetona + 1,5 mL da solução de DPPH
- Branco da amostra: 0,75 mL da amostra + 1,5 mL de acetona

A determinação foi feita em espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, modelo 8453E). Para verificação de interferentes da metodologia empregada, diluiu-se o extrato de erva-mate em etanol, na mesma faixa de concentração em estudo. Analisaram-se as amostras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm, com o objetivo de avaliar a absorbância das diferentes concentrações das amostras. Após, determinou-se a faixa de concentração na qual não ocorreria interferência da coloração do extrato. Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a

concentração de extrato necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH (IC<sub>50</sub>) por análise de regressão (CARBONARI, 2005).

### 3.5 Fabricação do queijo tipo Prato.

No delineamento experimental foram elaboradas 6 formulações de queijo tipo Prato:

Tratamento 1 - Queijo Prato controle sem adição de cultura e sem extrato de erva-mate;

Tratamento 2 - Queijo Prato com adição de cultura adjunta mista (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) ;

Tratamento 3 - Queijo Prato com adição de cultura adjunta mista (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) e com 0,1 % de extrato de erva-mate;

Tratamento 4 - Queijo Prato com adição de cultura adjunta mista (*Lactococcus Lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) e com 0,2 % de extrato de erva-mate;

Tratamento 5 - Queijo Prato sem adição de cultura adjunta mista e com 0,1 % de extrato de erva-mate;

Tratamento 6 - Queijo Prato sem adição de cultura adjunta mista e com 0,2 % de extrato de erva-mate.

O processamento dos queijos foi realizado na usina piloto de leite e derivados da URI Campus de Erechim (RS).

O leite utilizado na elaboração dos queijos foi pasteurizado na Corlac S.A., a 73 °C por 15 segundos, e padronizado com 3,2 % de gordura. Foi transportado até a Universidade em tarros plásticos, e ao chegar à universidade foi imediatamente armazenado em tanque de resfriamento de aço inox de parede dupla com sistema de refrigeração (Equilati) à temperatura de 4 °C, para em seguida ser utilizado na fabricação dos queijos.

Os queijos - tipo prato foram fabricados pelo método tradicional (OLIVEIRA, 1986) modificado, conforme fluxograma apresentado na Figura 9. Na elaboração das formulações, utilizou-se tanque de inox (Equilati) com capacidade para 50 L de leite, onde se colocou 30 L de leite, sendo que o mesmo foi aquecido a 34 °C através da injeção de vapor na camisa do tanque. Em seguida, adicionou-se 12 mL de solução de cloreto de cálcio (40 %) (Chr Hansen) e 12 mL de corante de urucum (Chr Hansen), a cultura adjunta mista na concentração indicada pelo fabricante e 27 mL de coagulante líquido quimosina (Chymax, Chr Hansen).

A temperatura de coagulação foi de 34 °C e o corte do gel efetuado com as liras (vertical e horizontal), em cubos de aproximadamente 0,5 cm de aresta. Iniciou-se a agitação, 5 minutos após o corte e foi do tipo lenta. Posteriormente, realizou-se o aquecimento da massa até 40 °C, elevando-se a temperatura gradativamente. Ao atingir o ponto da massa, efetuou-se a primeira dessoragem, com a retirada de aproximadamente 80 % do soro. A salga foi realizada na massa, com cloreto de sódio (Cisne) na razão de 2 % sobre o peso da massa. O Extrato de erva-mate em pó nas concentrações de 0,1 e 0,2 % (p/p) foi adicionado após realização da salga.

Posteriormente, realizou-se a enformagem em formas retangulares de 0,400 kg, que foram submetidas a duas etapas de prensagem. A primeira etapa ocorreu a 2 lbf/pol<sup>2</sup> durante 90 minutos, enquanto que a segunda etapa de prensagem ocorreu a 3 lbf/pol<sup>2</sup> por 90 minutos, com posição invertida dos queijos dentro das formas e das formas na prensa. Após a prensagem, os queijos foram embalados a vácuo (-690 mmHg), em máquina Selovac - Sistemas de vácuo 200 B, em embalagens plástica termoencolhível (Supravac VC2 - 55 micras, poliamidas (Nylon) e EVA (Etileno Vinil Acetato) em estruturas coextrusadas) e armazenados em câmara fria (Cia do aço - Jalp) a 15 °C e umidade relativa 85 % durante 60 dias.

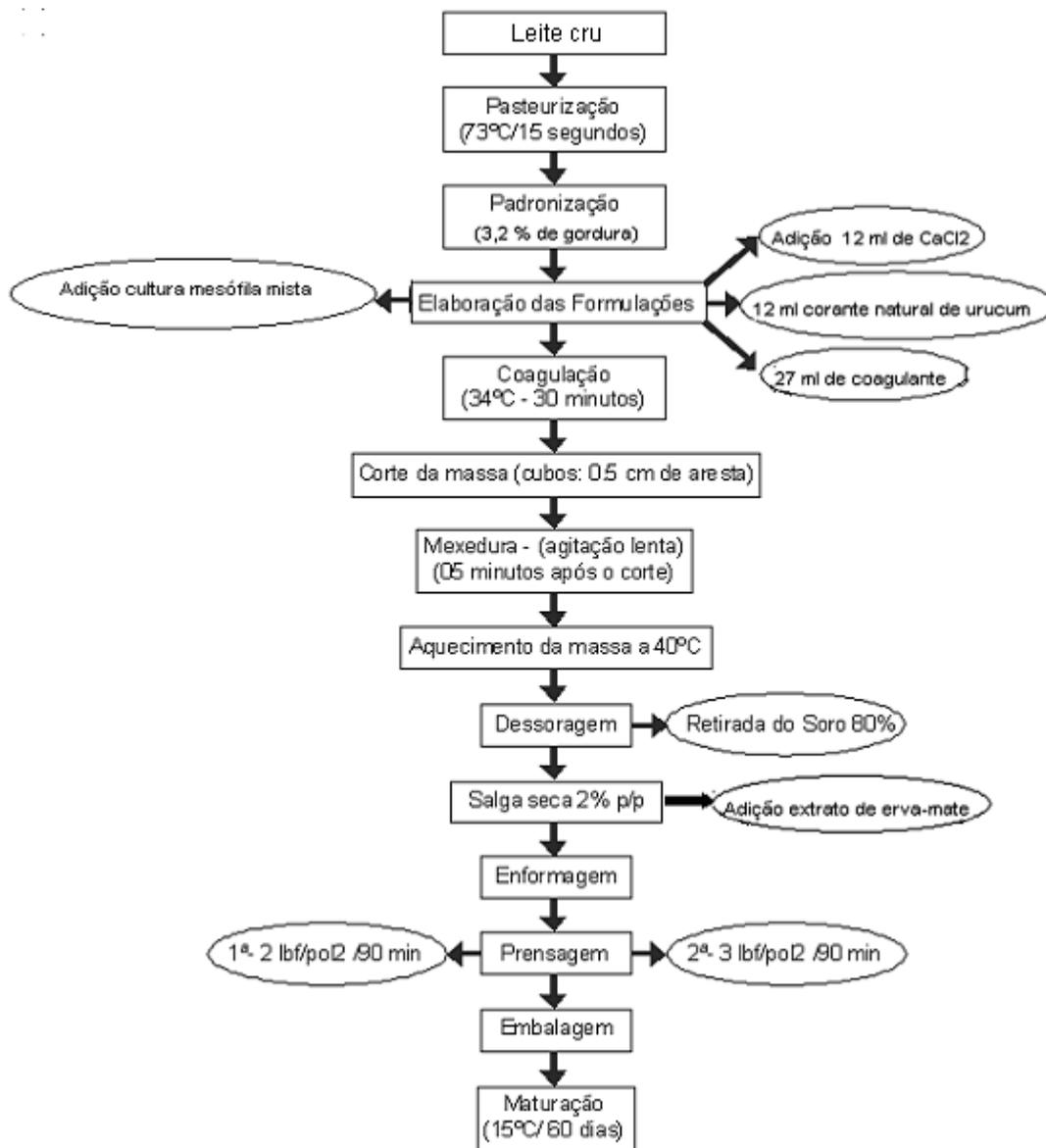


Figura 9 - Fluxograma do processo de elaboração do queijo tipo Prato.

## **3.6 Determinações físico-químicas do queijo**

As determinações físico-químicas (pH, acidez, umidade, cor, oxidação de lipídios e oxidação de proteínas), nos queijos foram realizadas no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dia de armazenamento. Para a caracterização dos queijos realizou-se as determinações do teor de proteínas, gordura e cinzas no 7<sup>o</sup> dia de armazenamento. Para as análises físico-químicas o queijo foi aleatoriamente escolhido e triturado em multiprocessador, homogeneizado e realizado o quarteamento manual, para ser utilizado nas determinações analíticas, constituindo-se assim uma amostra representativa. As análises foram realizadas em triplicata.

### **3.6.1 Determinação da gordura**

A gordura foi determinada conforme metodologia descrita pela norma FIL-IDF 5B (1986). A amostra foi previamente digerida em HCl à 25 % (v/v), e extração realizada com a mistura de éter etílico e petróleo (1:1 v/v). A quantificação foi realizada pelo método gravimétrico em estufa de recirculação (Fanem – 320 – SE) à 105 °C, até peso constante.

### **3.6.2 Nitrogênio total e/ou proteína total**

A quantidade de nitrogênio total nas amostras foi determinada, pelo método de Kjeldahl, utilizando sistema digestor-destilador (VELP- UDK 126 A), segundo metodologia nº 920.123 da AOAC (2000). A proteína total foi quantificada, utilizando-se o teor de nitrogênio total multiplicando pelo fator de correção 6,38.

### **3.6.3 Minerais totais**

O conteúdo de cinzas dos queijos foi determinado conforme metodologia descrita por FOSCHIERA (2004). Inicialmente, a amostra (~2 g) foi pré-carbonizada em chapa aquecimento, de modo a se evitar o espalhamento e a perda da gordura. Finalmente, a

amostra foi carbonizada em mufla (Quimis) a 550 °C por 10 h. A quantificação realizada pelo método gravimétrico, até peso constante.

#### **3.6.4 Cor objetiva**

A cor foi determinada utilizando um colorímetro portátil (Minolta CR400), com fonte de luz D65, na escala de L\*, a\*, b\* do sistema CIELab, realizando-se as leituras entre 20°C e 25°C. A calibração do aparelho foi realizada seguindo as instruções do fabricante. No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L\*, a\*, b\*, a coordenada L\* corresponde a luminosidade, a\* e b\* referem-se às coordenadas de cromaticidade verde(-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente. A leitura foi realizada em triplicata.

#### **3.6.5 Determinação da Umidade**

A determinação da umidade do queijo foi determinada gravimetricamente em estufa de recirculação (Fanem – 320 - SE) a 105 °C por aproximadamente 4 h e/ou até peso constante, segundo metodologia descrita por BRASIL (2005).

#### **3.6.6 Determinação do pH**

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, utilizando-se pHmetro (Marconi PA - 200) previamente calibrado em solução tampão pH 4 e 7. Para a leitura preparou-se um solução contendo 10 g de amostra de queijo em 100 mL de água destilada a temperatura de (20 °C), conforme método n.º 4022 da AOAC (2000).

#### **3.6.7 Determinação da acidez total**

A acidez total foi determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença do indicador fenolftaleína, segundo método n.º 947.05 da AOAC (2000). O resultado foi expresso em g de ácido láctico por 100 g de amostra.

### **3.6.8 Oxidação de lipídios**

Para avaliar a extensão da oxidação lipídica realizou-se o teste das substâncias reativas ao ácido 2 tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com RAHARJO et al. (1992). A concentração foi calculada por espectrofotometria (Parkin Elmer modelo Lambada EZ150) a 531 nm usando uma curva padrão com ácido 2 tiobarbitúrico ( $1.10^{-8}$  a  $1.10^{-7}$  mol/mL). Os resultados foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (MDA mg/ Kg amostra).

### **3.6.9 Oxidação de proteínas**

Para avaliar a extensão da oxidação das proteínas, realizou-se a determinação do grupo carbonil, conforme metodologia descrita por LEVINE et al. (1990), modificada. A concentração do grupo carbonil foi calculada medindo DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazina) quantificado através da leitura da absorbância 370 nm. A concentração de proteína foi calculada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976), por espectrofotometria (UV- visível, Agilent 8453E) a 280 nm, usando uma curva padrão com albumina bovina (0,260 mg/mL a 2,360 mg/mL) em guanidina 6 M. Os resultados foram expressos em nmol carbonil por mg de proteína.

## **3.7 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas nos queijos foram realizadas no 1°, 7°, 15°, 30°, 45° e 60° dia de armazenamento. Para a análise microbiológica (contagem de bactérias lácticas), os queijos foram aleatoriamente escolhidos, retirando-se três fatias (com aproximadamente 1 cm de espessura representativas do queijo).

### **3.7.1 Contagem de bactérias lácticas**

Pesou-se 25 g da amostra em embalagem plástica para *Stomacher* (Sward – Laboratory Blender - Stomacher 400) e adicionou-se 225 mL de citrato de sódio 2 %.

Homogeneizou-se a mistura durante 60 segundos, obtendo-se assim a diluição na  $10^{-1}$ . A partir desta diluição foram preparadas as diluições subsequentes necessárias para a análise. A inoculação foi realizada em meio Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS) pelo método de plaqueamento em profundidade, onde foi adicionada 1 mL da diluição da amostra, e uma sobre camada com meio Agar-Agar. As placas foram incubadas durante 48 horas, a temperatura de 30 °C (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

### **3.7.2 Contagem de culturas adjunta mista**

Pesou-se 25 g da amostra em embalagem plástica para *Stomacher* (Sward – Laboratory Blender - Stomacher 400) e adicionou-se 225 mL citrato de sódio 2 %. Homogeneizou-se a mistura durante 60 segundos, obtendo-se assim a diluição na  $10^{-1}$ . A partir desta diluição foram preparadas as diluições subsequentes necessárias para a análise. A inoculação foi realizada em meio Agar De Man, Rogosa & Sharpe (M-17) pelo método de plaqueamento em superfície, onde foi adicionada 0,1 mL da diluição da amostra. As placas foram incubadas durante 48 horas, a temperatura de 30 °C. (GONZÁLEZ et al., 2006).

## **3.8 Análise Sensorial**

As análises sensoriais foram realizadas no 30°, 45° e 60° dia de maturação das formulações. A análise sensorial foi realizada em escala laboratorial, com equipe de provadores semi-treinados de laboratório de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias (20 a 50 anos), que apresentaram interesse e hábito de consumo regular variável do produto.

As amostras (~ 2 cm de arestas) foram distribuídas em pratos plásticos codificados com números aleatórios de 3 dígitos, distribuição balanceada, juntamente com amostra do branco (água potável e biscoito salgado) (Figura 10). Foi realizado um teste de aceitação de consumidor, com escala hedônica estruturada (Figura 11) de 9 pontos (1 - desgostei muitíssimo e 9 - gostei muitíssimo), onde foram avaliados,

separadamente, os seguintes atributos: sabor, textura e aceitação geral, segundo metodologia descrita por FARIA et al. (2002). Os avaliadores preencheram uma ficha de avaliação (Figura 11) dos atributos durante o desenvolvimento do teste. As avaliações foram realizadas em cabines individuais, empregando luz natural e fluorescente.



Figura 10 - Material utilizado para a avaliação sensorial dos queijos tipo Prato.

<b>AVALIAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO PRATO</b>			
<b>Nome:</b> _____		<b>Data:</b> ___/___/___	
<p>Avalie cada uma das amostras codificadas de QUEIJO e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra, em relação à aceitação geral, sabor e textura.</p> <p style="text-align: center;">           9 gostei muitíssimo            8 gostei muito            7 gostei moderadamente            6 gostei ligeiramente            5 não gostei / nem desgostei            4 desgostei ligeiramente            3 desgostei moderadamente            2 desgostei muito            1 desgostei muitíssimo         </p>			
Amostras	Aceitação geral	Sabor	Textura
<b>Comentários:</b> _____			

Figura 11 - Ficha utilizada para a avaliação sensorial dos queijos tipo Prato.

### **3.9 Análise estatística**

Os efeitos da adição culturas adjuntas mista e concentração de extrato de erva-mate nas características físico-químicas, contagem de bactérias lácticas, contagem de culturas adjuntas e características sensoriais foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e comparação entre as médias através do teste de Tukey, utilizando o programa Statistica 6.0. Para as análises foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados os resultados e discussões referentes ao conteúdo de polifenóis totais e atividade antioxidante *in vitro* do extrato de erva-mate e os efeitos da adição do extrato de erva-mate e culturas adjuntas, na evolução de parâmetros físicos, físico-químicos, contagem de bactérias lácticas e análises sensoriais dos queijos tipo Prato, durante período de armazenamento.

### 4.1 Polifenóis totais e atividade antioxidante *in vitro* do extrato de erva-mate

Na Tabela 1 estão apresentados os teores de polifenóis totais encontrados no extrato de erva-mate nas concentrações testadas.

**Tabela 1** - Teor de polifenóis totais no extrato de erva-mate.

Concentração do extrato (%, p/p)	Teor de polifenóis* (mg/gEAC)
0,1	0,40
0,2	0,89
0,3	0,94
0,4	1,01

Verifica-se pela Tabela 1 que os teores de polifenóis variaram de 0,40 a 1,01 mg/g no extrato de erva-mate e que houve um aumento nos teores de polifenóis, sendo este proporcional a concentração de extrato de erva-mate.

Como os polifenóis constituem um dos maiores grupos de compostos presentes em plantas, atuando como antioxidantes primários ou captadores de radicais livres,

justifica-se a importância de se avaliar o teor destes compostos nos extratos (SALDANHA, 2005).

Os polifenóis são compostos fitoquímicos que têm apresentado grande interesse nutricional por sua contribuição na manutenção da saúde humana. Assim, muitas propriedades funcionais são descritas para os alimentos de origem vegetal, como frutos, folhas e sementes, por estarem associadas à atividade antioxidante relacionada à presença de flavonóides e compostos fenólicos totais. As características sensoriais dos alimentos de origem vegetal, tanto processados como frescos, estão relacionadas ao teor de compostos fenólicos. Sua contribuição para a coloração de vegetais é claramente comprovada, assim como na determinação do sabor amargo e adstringente desse tipo de alimento (MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO, 2000).

Buscando-se determinar o potencial de uso do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como agente antioxidante para posterior uso do mesmo no produto foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* pela captura de radicais livres com o teste de DPPH. A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH<sup>•</sup> consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup> em 50 % é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH<sup>•</sup> por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

No teste de DPPH, a habilidade do extrato de erva-mate agir como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons na transformação de DPPH na forma reduzida de DPPH – H (difenilpicrilhidrazina) é medido espectrofotometricamente. O DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente que produz uma solução violeta em etanol. Na presença de componentes antioxidantes o DPPH é reduzido produzindo uma solução etanólica transparente.

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato de erva-mate em diferentes concentrações encontram-se na Tabela 2. Pode-se observar que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração de extrato adicionado atingindo 99,17 % de atividade antioxidante para a concentração 750 µg mL<sup>-1</sup>. BASTOS et al. (2007) avaliaram o extrato aquoso de erva mate (*Ilex*

*paraguariensis*) e chá verde (*Camellia sinensis*) através do método DPPH e obtiveram uma capacidade antioxidante maior que 89 % comprovando assim a capacidade antioxidante destes vegetais. MILIAUSKAS et al. (2003) discutem que extratos que apresentam alta capacidade de captação de DPPH (superiores a 90 %) correspondem praticamente à totalidade de captação desde radical livre em função do método, pois o mesmo apresenta uma absorção residual permanente podendo equivaler até aproximadamente 7 % da absorção final.

**Tabela 2** – Atividade antioxidante (AA) do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Atividade antioxidante (%)
1	16,31
5	22,87
10	27,91
50	32,04
100	40,75
250	57,63
500	82,21
750	99,17

A faixa de concentração de 1 a 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi utilizada para construção da curva de calibração (Figura 1- Apêndice A). Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação à atividade antioxidante foi determinado a concentração de extrato de erva-mate necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH ( $\text{IC}_{50}$ ).

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado forneceu um  $\text{IC}_{50}$  de 234,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que é a concentração de extrato em pó necessária para apresentar 50 % de atividade antioxidante.

RIVELLI et al. (2007) ao determinarem a concentração de extrato de erva-mate necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC<sub>50</sub>) de diferentes extratos (extrato hidroalcoólico e aquoso de *I. paraguariensis*) obtiveram valores do IC 50 entre 10,1 e 15,1 µg mL<sup>-1</sup>. SCHINELLA et al. (2000) ao investigarem as propriedades antioxidantes de um extrato aquoso de *I. paraguariensis* usando um sistema gerador de radicais livres verificaram que o extrato inibiu a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática em microsomas hepáticos de ratos, dependente da concentração, com valores de IC<sub>50</sub> de 18 e 28 µg/mL, respectivamente, valores estes inferiores aos encontrados neste estudo. O maior valor de IC<sub>50</sub> (234,48 µg/mL) pode ser atribuído, principalmente, pela técnica de extração (percolação) e o método de secagem do extrato de erva-mate por atomização (spray-drier), onde utilizou-se temperatura de 190°C. Segundo MELLO e GUERRA (2002) a atividade antioxidante de um composto proveniente de uma fonte natural é influenciada por diversos fatores, como o país e/ou região na qual a planta foi cultivada, o solvente e a técnica de extração empregada, e ainda, a forma em que a amostra se encontrava para a análise, se em pó, em extrato ou como uma fração isolada.

A estabilidade dos compostos polifenólicos durante a desidratação e extração, é afetada por degradações químicas e enzimáticas e pela volatilização dos compostos, mas a decomposição térmica tem sido apontada como a maior causadora da redução do conteúdo de polifenóis. Na decomposição térmica, os fenóis podem reagir com outros componentes e impedir sua extração (MOURE et al., 2001). A temperatura durante a extração pode afetar os compostos bioativos de diferentes maneiras. O conteúdo total de fenólicos diminui com aumento da temperatura (CONDE et al., 1998).

## **4.2 Aspectos físicos dos queijos**

### **4.2.1 Aspectos visuais**

O queijo tipo Prato apresentou formato retangular (11,5 cm de comprimento, 6,8 cm de largura e 7,5 cm de altura) e peso médio de 450 g. Em relação ao aspecto visual de coloração os queijos no 1º dia de armazenamento (Figura 12), os tratamentos 5 e 6 apresentaram como os mais claros, porém após o 7º dia de armazenamento esses tratamentos apresentavam-se visualmente mais amarelados, mantendo esse comportamento até o final do período de armazenamento (60 dias). Essa cor amarela mais acentuada pode ser atribuída a combinação do extrato de erva-mate e o corante de urucum o qual confere a cor amarela característica do queijo Prato.

No 30º dia de armazenamento os tratamentos apresentaram consistência elástica, textura macia e compacta e com algumas olhaduras bem distribuídas de tamanhos variados. As formulações com adição de culturas adjuntas e extrato de erva-mate apresentaram consistência mais firme, compacta e esfarelenta ao corte. Nos tratamentos que continham apenas extrato de erva-mate, as olhaduras foram mais pronunciadas e as características visuais foram semelhantes ao tratamento 1 (controle).

Os queijos aos 45 e 60 dias de armazenamento apresentaram textura macia e compacta e olhaduras bem distribuídas e de tamanhos variados (Figura 12). Em relação aos tratamentos 2, 3 e 4, observou-se uma consistência mais firme, compacta, e esfarelenta ao corte. Isto pode ser atribuído a adição das culturas adjuntas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*), pois segundo FURTADO e AMORIM (2000) esses micro-organismos degradam a lactose do leite unicamente em ácido láctico, produzindo queijo de massa fechada e aroma mais suave, adequado ao fatiamento para consumo indireto em lanches, sanduíches e outros pratos culinários. Já os tratamentos 5 (0,1 % de extrato) e 6 (0,2 % de extrato) se apresentaram semelhantes ao tratamento 1 (controle), com consistência macia. No entanto, aos 60 dias de armazenamento, os referidos tratamentos, demonstraram grande quantidade de olhaduras e textura compacta e firme, quando comparada ao tratamento 1 (controle).



(a)

(b)



(c)

(d)

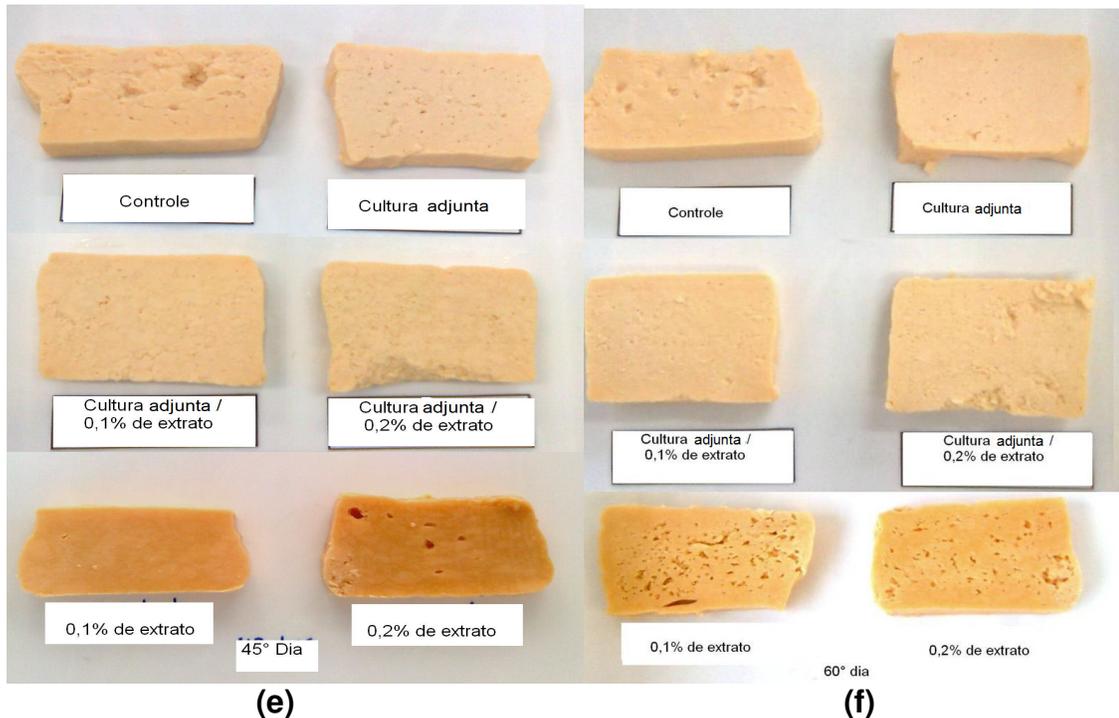


Figura 12 – Aspectos físicos das formulações de queijo tipo Prato no 1º (a), 7º (b), 15º (c), 30º (d), 45º (e) e 60º (f) dia de armazenamento a 15 °C e UR de 85 % respectivamente.

A Tabela 3 apresenta os resultados do rendimento das formulações de queijo - Tipo Prato.

**Tabela 3-** Rendimento (kg queijo/100 kg de leite) dos queijos - Tipo Prato.

Tratamento	Rendimento
	(kg de queijo/100 kg de leite)
1 (controle)	9,32 <sup>a</sup> (±0,48)
2 (culturas adjuntas)	9,17 <sup>a</sup> (±0,39)
3 (culturas/0,1% extrato)	9,07 <sup>a</sup> (±0,52)
4 (culturas/0,2% extrato)	9,10 <sup>a</sup> (±0,50)
5 (0,1% extrato)	8,70 <sup>b</sup> (±0,27)
6 (0,2% extrato)	8,75 <sup>b</sup> (±0,33)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Os menores rendimentos foram obtidos nos tratamentos 5 (0,1% extrato) e 6 (0,2% extrato) com valores de 8,70 e 8,75 kg de queijo/100 kg de leite, respectivamente. No tratamento 1 (controle) quando do corte da coalhada foram obtidos grãos maiores, que influenciaram no rendimento, que foi de 9,32 kg de queijo/100 kg de leite. Os menores valores encontrados nos tratamentos 5 e 6 podem estar associados a maior dessoragem realizadas nos mesmos e a obtenção de menores grãos no corte da coalhada. Segundo WALSTRA et al. (1999) as etapas de corte, agitação da massa e retirada de soro são fatores que influenciam no rendimento dos queijos, pois estas etapas contribuem para o deslocamento de gordura, finos de caseína, proteína, lactose e sais minerais afetando conseqüentemente o rendimento do queijo.

O conhecimento do rendimento das formulações é de suma importância, pois para a indústria queijeira, as principais preocupações são a qualidade e o rendimento, tendo em vista a maximização de seus lucros, sendo o rendimento um fator chave para garantir a sobrevivência de uma indústria no mercado (MARZIALI e NG-KWA-HANG, 1986; AUGUSTO, 2003; SPADOTI et al. 2003).

A Tabela 4 apresenta as médias e desvio padrão em resposta ao teor de proteína total, gordura e minerais totais (cinzas) dos queijos - Tipo Prato, no 2<sup>o</sup> dia de armazenamento a 15 °C e 85% UR . Observa-se na Tabela 4 que não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos para o teor de proteína total, gordura e cinzas.

**Tabela 4** - Teor de proteína total, gordura e cinzas no 2º dia de armazenamento a 15 °C e 85 % .

<b>Tratamento</b>	<b>Proteína (g/100g)</b>	<b>Gordura (g/100g)</b>	<b>Cinzas (g/100g)</b>
1(Controle)	21,96 <sup>a</sup> (±0,68)	24,79 <sup>a</sup> (±0,40)	3,41 <sup>a</sup> (±0,16)
2(Cultura adjunta)	21,48 <sup>a</sup> (±0,95)	25,04 <sup>a</sup> (±0,55)	3,12 <sup>a</sup> (±0,41)
3(Cultura / 0,1% extrato)	21,81 <sup>a</sup> (±0,50)	24,84 <sup>a</sup> (±0,81)	3,39 <sup>a</sup> (±0,23)
4(Cultura / 0,2% extrato)	21,23 <sup>a</sup> (±0,25)	24,43 <sup>a</sup> (±0,39)	3,65 <sup>a</sup> (±0,79)
5 (0,1% de extrato)	21,92 <sup>a</sup> (±0,14)	24,55 <sup>a</sup> (±0,53)	3,62 <sup>a</sup> (±0,45)
6 (0,2 % de extrato)	21,87 <sup>a</sup> (±0,25)	24,67 <sup>a</sup> (±0,47)	3,45 <sup>a</sup> (±0,82)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Os teores de gordura variaram de 24,43 a 25,04 %, estando estes abaixo dos citados por FURTADO e NETO. (1994) que foram de 26 a 29 % para queijo Prato elaborado com leite integral. Semelhantes aos obtidos por NARIMATSU et al. (2003), em queijo Prato tradicional em relação a proteína (18,16 %), gordura (24,89 %) e minerais (3,73 %). Os valores foram inferiores aos reportados por LEAL et al. (2008), com teores de 23,65 % de proteína, 28,68 % de gordura e 4,04 % de cinzas.

WALSTRA et al (1999) relatam que pode ocorrer perda de gordura e outros constituintes do leite, durante as etapas de corte e agitação da massa, pois contribuem para o deslocamento destes constituintes para o soro, o qual é retirado, afetando conseqüentemente o seu conteúdo no queijo.

### 4.2.2 Cor objetiva

A Tabela 5 apresenta a média e desvio padrão do índice de cor L\*, a\* e b\* dos queijos tipo Prato, no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR.

**Tabela 5** – Índices de cor L\*, a\* e b\* das formulações do queijo tipo Prato em diferentes períodos de armazenamento.

Tratamento	L* (luminosidade)					
	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
1(Padrão)	73,90 <sup>ba</sup> (±0,97)	55,23 <sup>ab</sup> (±0,62)	43,46 <sup>bc</sup> (±0,52)	42,16 <sup>bcd</sup> (±0,64)	43,19 <sup>abc</sup> (±0,62)	40,41 <sup>bd</sup> (±1,73)
2(Cultura Mesófila)	79,05 <sup>aA</sup> (±0,40)	52,83 <sup>abB</sup> (±0,76)	45,98 <sup>bC</sup> (±0,27)	45,86 <sup>aC</sup> (±0,37)	41,33 <sup>bd</sup> (±2,75)	41,46 <sup>bd</sup> (±1,70)
3(Cultura / 0,1% extrato)	63,26 <sup>cA</sup> (±0,44)	51,90 <sup>bBC</sup> (±0,79)	53,24 <sup>aB</sup> (±0,71)	48,08 <sup>aCD</sup> (±0,93)	46,73 <sup>ad</sup> (±1,94)	42,15 <sup>aE</sup> (±2,83)
4(Cultura / 0,2% extrato)	62,08 <sup>cA</sup> (±0,41)	45,77 <sup>cB</sup> (±1,05)	42,95 <sup>cC</sup> (±0,55)	39,93 <sup>bd</sup> (±0,42)	39,96 <sup>bd</sup> (±1,46)	34,49 <sup>cE</sup> (±0,90)
5 (0,1 % de extrato)	67,47 <sup>cA</sup> (±0,68)	45,45 <sup>cAB</sup> (±0,87)	42,61 <sup>cB</sup> (±2,10)	36,81 <sup>cC</sup> (±0,99)	30,56 <sup>cd</sup> (±0,92)	25,24 <sup>dE</sup> (±1,33)
6 (0,2 % de extrato)	61,47 <sup>eA</sup> (±1,16)	41,34 <sup>dA</sup> (±1,71)	36,65 <sup>dB</sup> (±0,67)	36,51 <sup>CB</sup> (±1,45)	28,22 <sup>cC</sup> (±2,23)	22,82 <sup>dD</sup> (±0,71)

<b>Índice de cor a*</b>						
1(Padrão)	1,04 <sup>abB</sup> (±0,017)	1,29 <sup>dB</sup> (±0,067)	1,75 <sup>aA</sup> (±0,195)	2,13 <sup>bA</sup> (±0,12)	1,97 <sup>cA</sup> (±0,14)	2,08 <sup>cA</sup> (±0,04)
2(Cultura Mesófila)	1,22 <sup>aD</sup> (±0,031)	1,76 <sup>cdB</sup> (±0,040)	1,38 <sup>bcC</sup> (±0,053)	2,04 <sup>bA</sup> (±0,06)	1,79 <sup>cdB</sup> (±0,04)	1,96 <sup>cdA</sup> (±0,06)
3(Cultura / 0,1% extrato)	1,28 <sup>aB</sup> (±0,015)	1,71 <sup>cA</sup> (±0,058)	1,71 <sup>abA</sup> (±0,100)	1,76 <sup>dA</sup> (±0,04)	1,69 <sup>dA</sup> (±0,03)	1,71 <sup>deA</sup> (±0,11)
4(Cultura / 0,2% extrato)	0,84 <sup>bc</sup> (±0,026)	1,23 <sup>bB</sup> (±0,036)	1,27 <sup>cB</sup> (±0,021)	1,40 <sup>eA</sup> (±0,03)	1,40 <sup>eA</sup> (±0,04)	1,46 <sup>eA</sup> (±0,09)
5 (0,1 % de extrato)	0,95 <sup>bc</sup> (±0,02)	1,89 <sup>bB</sup> (±0,09)	1,81 <sup>aB</sup> (±0,24)	2,86 <sup>cA</sup> (±0,06)	2,66 <sup>bA</sup> (±0,14)	2,36 <sup>bA</sup> (±0,16)
6 (0,2 % de extrato)	0,89 <sup>bD</sup> (±0,22)	2,07 <sup>aC</sup> (±0,15)	2,03 <sup>aC</sup> (±0,19)	3,17 <sup>aA</sup> (±0,03)	3,01 <sup>aAB</sup> (±0,12)	2,75 <sup>aAB</sup> (±0,10)
<b>Índice de cor b</b>						
1(Padrão)	22,03 <sup>bAC</sup> (±0,37)	20,30 <sup>abB</sup> (±0,59)	20,75 <sup>bB</sup> (0,41)	21,18 <sup>bAB</sup> C (±0,21)	18,38 <sup>aAB</sup> C (±0,44)	18,14 <sup>aB</sup> (±0,33)
2(Cultura Mesófila)	25,58 <sup>aA</sup> (±0,83)	18,61 <sup>bcB</sup> (±0,80)	16,15 <sup>dC</sup> (±0,29)	17,68 <sup>cBC</sup> (±0,37)	16,76 <sup>dC</sup> (±0,59)	16,29 <sup>bBC</sup> (±0,44)
3(Cultura / 0,1% extrato)	20,87 <sup>bA</sup> (±0,40)	19,92 <sup>aAB</sup> (±0,57)	19,02 <sup>cBC</sup> (±0,58)	18,31 <sup>cCD</sup> (±0,31)	17,13 <sup>cdD</sup> (±0,53)	17,24 <sup>bcD</sup> (±0,32)
4(Cultura / 0,2% extrato)	16,22 <sup>cB</sup> (±0,64)	17,81 <sup>cA</sup> (±0,87)	16,26 <sup>dA</sup> (±0,60)	16,26 <sup>dA</sup> (±0,15)	16,46 <sup>dA</sup> (±0,48)	17,53 <sup>bA</sup> (±0,53)
5 (0,1 % de extrato)	16,26 <sup>cE</sup> (±0,74)	20,32 <sup>abC</sup> (±0,46)	21,15 <sup>aB</sup> (±0,45)	23,27 <sup>bA</sup> (±0,61)	18,38 <sup>bcD</sup> (±0,71)	18,47 <sup>bD</sup> (±0,63)
6 (0,2 % de extrato)	16,35 <sup>cD</sup> (±0,49)	21,43 <sup>aB</sup> (±0,51)	21,97 <sup>aA</sup> (±0,16)	23,87 <sup>aA</sup> (±0,63)	19,14 <sup>bc</sup> C (±0,35)	19,10 <sup>abc</sup> C (±0,33)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente a nível de 5% (Teste de Tukey).

A cor tem papel de destaque entre as propriedades tecnológicas e é um importante atributo de qualidade, pois é um dos primeiros aspectos a serem avaliados

na linha de fabricação e pelos consumidores nas gôndolas de supermercados (OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2002).

O parâmetro  $L^*$  mensura a luminosidade e/ou o brilho do produto e quanto menores forem esses valores mais escura é a cor da amostra. As coordenadas de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  indicam as direções das cores. O parâmetro  $a^*$  refere-se à contribuição das cores verde (-)/vermelho(+) e o parâmetro  $b^*$  às cores azul(-)/amarelo(+).

Verifica-se pela Tabela 5, que do 1 para o 7º dia de armazenamento, houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de  $L^*$ , nas formulações de queijo Prato. Após o 15º dia de armazenamento houve pequenas variações nos valores de  $L^*$ , sendo significativa a redução aos 60 dias. O queijo Prato tradicional (Tratamento 1) e o com culturas adjuntas e sem extrato (Tratamento 2), logo após elaborados e no 7º dia de armazenamento apresentaram diferença significativa dos demais tratamentos (Tabela 5), com maiores valores de luminosidade ( $L^*$ ) de 73,90 e 79,05; 55,23 e 52,83, respectivamente. Os menores valores de  $L^*$  foram encontrados nos tratamentos 5 (0,1% de extrato) e 6 (0,2% de extrato) durante todo o período de armazenamento.

Durante o período de armazenamento as seis formulações de queijo seguiram a mesma tendência com diminuição dos valores de luminosidade ( $L^*$ ) (Figura 13) de maneira a apresentarem os menores valores no 60º dia de armazenamento onde apenas o queijo prato acrescido de culturas mesófilas não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do 45º dia de armazenamento.

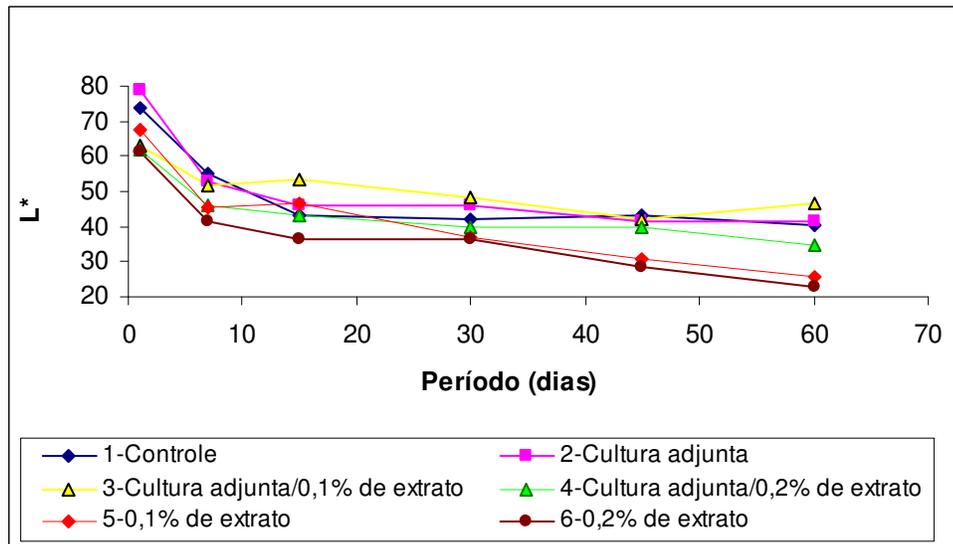


Figura 13- Gráfico de dispersão para os valores de luminosidade aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

Na determinação da cor, o parâmetro  $L^*$  indica a luminosidade e se refere à capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, variando numa escala de zero a 100. Quanto maior o valor de  $L^*$ , mais claro o objeto. Os valores de  $L^*$  variaram de 79,05 a 22,82 nos 60° dia de armazenamento, sendo que os tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram os maiores valores de  $L^*$  durante todo o período de armazenamento, considerados os queijos mais claros. Enquanto, que os tratamentos 5 e 6 (0,1 e 0,2 % de extrato de erva-mate) foram considerados os mais escuros, indicando que o extrato de erva-mate influenciou na redução dos valores de  $L^*$ .

SANCHEZ-RODRIGUES et al. (2001), afirmam que o conteúdo de água é o primeiro fator que influi sobre o parâmetro brilho ( $L^*$ ), embora o teor de gordura também tenha influência considerável. Portanto produtos com um maior teor de umidade tendem a apresenta maiores valores no parâmetro  $L^*$ . O decréscimo nos valores de brilho representa a formação da cor escura em decorrência de reações de escurecimento e da desidratação ocorrida (BOZKURT e BAYRAM, 2006). Fato esse observado nesse estudo onde com a redução do teor de umidade ocorreu diminuição no parâmetro  $L^*$ .

Em relação à coordenada de cromaticidade  $a^*$  (Tabela 5), logo após elaborados, os tratamentos 4 (cultura adjunta e 0,2% de extrato), 5 (0,1% de extrato) e 6 (0,2% de

extrato) apresentaram os menores valores de cromaticidade ( $a^*$ ) diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tratamentos. No entanto, no queijo contendo somente cultura adjunta (Tratamento 2) na formulação e o com cultura adjunta e 0,1 % de extrato de erva-mate (Tratamento 3) foi verificado valores superiores para o índice  $a^*$ , não diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si. A partir do 7º dia de armazenamento, os tratamentos 5 e 6, apresentaram-se significativamente superiores aos demais tratamentos, com exceção no 15º dia onde não diferiu do tratamento 1 (controle). Os menores valores de cromaticidade  $a^*$  foram encontrados no tratamento 4 (Cultura adjunta e 0,2% de extrato). Esse comportamento manteve-se durante todo o período de armazenamento (Figura 14) apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das demais formulações a partir do 30º dia de armazenamento.

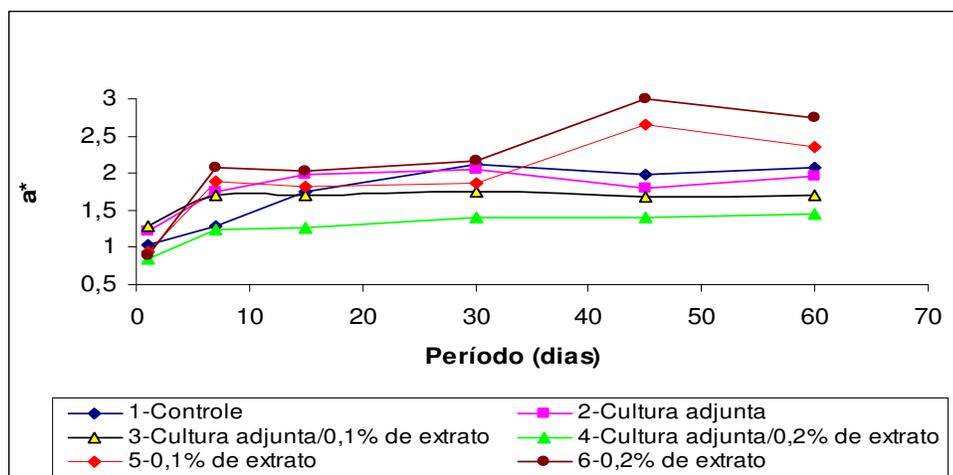


Figura 14- Gráfico de dispersão para os valores de  $a^*$  aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

Os valores de  $a^*$  positivos, que representam a intensidade da cor vermelha variaram significativamente entre os tratamentos sendo os maiores valores encontrados nos tratamentos 5 e 6 durante todo o período de armazenamento (Figura 14). Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos valores de  $a^*$  nas formulações do 1º para o 7º e do 15º para o 30º dia de armazenamento, seguido de uma redução no 45º dia de armazenamento. Segundo TIJSKENS et al. (2001), quanto mais ácido o pH do meio,

mais rápida é a descoloração de vegetais clorofilados. Portanto a perda da coloração verde pode estar relacionada ao decréscimo contínuo do pH (Tabela 7) ocorrido em todos os tipos de queijo que apresentaram uma redução nos valores de pH no 7º e no 30º dia de armazenamento, ocorrendo um aumento nos valores de  $a^*$  positivos e deslocando a cor para o vermelho. Predominando assim o a cor do corante de urucum sobre o verde do extrato de erva-mate. A clorofila é sensível ao pH, enzimas, temperatura, luz e oxigênio, os quais tem maior ou menor influência na sua degradação de acordo com a atividade de água do meio (SCHWARTZ e LORENZO, 1990; BOHN e WALCZYK, 2004).

No 60º dia houve novamente um aumento nos valores de  $a^*$  nos tratamentos com exceção dos tratamentos 5 e 6, porém não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do 45º dia. Na Figura 14 observa-se que durante todo o período de armazenamento encontrou-se somente valores positivos de  $a^*$  indicando tendência para a cor vermelha não deslocando para o verde apesar da adição do extrato de erva-mate. Esses valores positivos de  $a^*$  podem ser atribuídos a adição de corante de urucum que pode ter induzido o deslocamento da cor para o vermelho.

O valor de  $b^*$  positivo, que representa a intensidade de cor amarela, apresentou pequenas variações entre os tratamentos. No 1º dia de armazenamento, o queijo Prato acrescido de culturas adjuntas, demonstrou valor superior para o índice de cor  $b^*$ , diferindo estatisticamente das demais formulações (Tabela 5). Do 7º ao 60º dia de armazenamento o queijo prato sem adição de cultura contendo 0,1 % de extrato (Tratamento 5) e o queijo prato sem adição de cultura contendo 0,2 % de extrato (Tratamento 6), os valores de  $b^*$  foram superiores, sendo que aos 30º dia de maturação diferiram dos demais tratamentos. Durante todo o período de armazenamento, o queijo com adição de culturas adjuntas e 0,2% de extrato (Tratamento 4) foi o que apresentou cromaticidade  $b^*$  inferior, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tratamentos no 30º dia de armazenamento (Tabela 5).

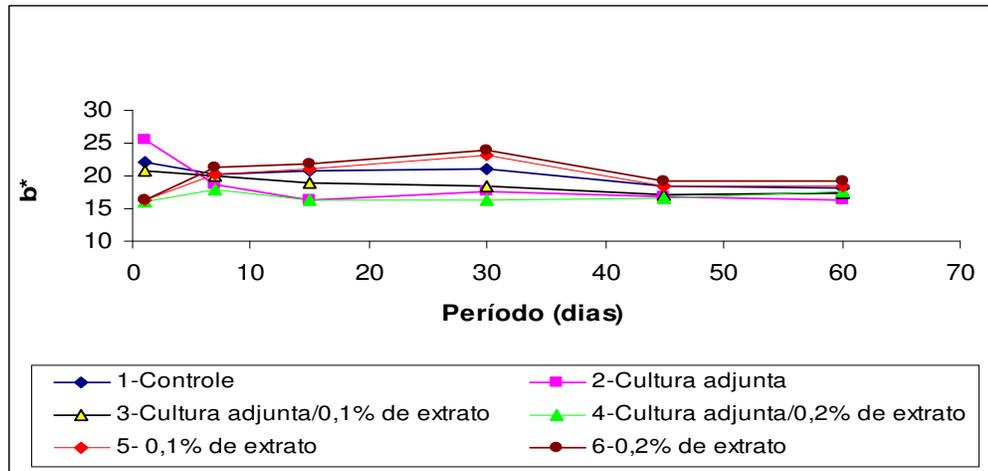


Figura 15- Gráfico de dispersão para os valores de  $b^*$  ao 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

Verifica-se pela Figura 15 que os maiores valores de  $b^*$  nas formulações 1, 2 e 3 foram obtidos no zero dia de análise. Durante todo o período de armazenamento ocorrerem oscilações nos valores de  $b^*$  em todos os tratamentos. Nos tratamentos 5 e 6 os maiores valores  $b^*$  foram encontrados no 30º dia de armazenamento.

Cabe ressaltar, que o queijo Prato com adição de 0,1 e 0,2 % de extrato de erva-mate, quando comparados com as formulações que não receberam a adição de extrato (Tratamentos 1 e 2), após o 1º dia de armazenamento obtiveram os maiores valores de cromaticidade  $a^*$  (Tabela 5 e Figura 14) e  $b^*$  (Tabela 5 e Figura 15). Enquanto, que os valores de  $L^*$  (Tabela 5 e Figura 13) foram os menores. A cor dos queijos está intimamente ligada à gordura do leite e, por isso mesmo, é sujeita a variações sazonais que são corrigidas pela adição de corantes. No caso de queijos azuis, ou seja, aqueles com mofos esverdeados é comum adicionar-se clorofila à massa para que esta adquira uma coloração pálida, contrastante com a do mofo. Queijos amarelos, como o Prato, podem ser corados com urucum (PERRY, 2004).

Na literatura não foram encontrados informações que definam uma referência para a cromaticidade  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  em queijo Prato em condições similares as utilizadas neste estudo.

### Características físico-químicas dos queijos durante o armazenamento

As características físico-químicas (umidade, pH, acidez, oxidação de lipídeos e oxidação de proteínas) dos queijos no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dia de armazenamento, foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias através do teste de Tukey, sendo que os resultados e as discussões são descritos a seguir.

#### 4.2.3 Umidade

A Tabela 6 apresenta a média e desvio padrão em resposta da umidade para os queijos tipo Prato, no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR.

**Tabela 6** – Teores de umidade para as formulações do queijo Prato em diferentes períodos de armazenamento.

Tratamento	Umidade (%)					
	1 dia	7 dia	15 dia	30 dia	45 dia	60 dia
1 (Padrão)	57,43 <sup>aA</sup> (±0,11)	53,44 <sup>aBC</sup> (±0,32)	53,86 <sup>aB</sup> (±0,27)	53,71 <sup>aBC</sup> (±0,15)	53,81 <sup>aB</sup> (±0,16)	53,91 <sup>aB</sup> (±0,06)
2 (Cultura adjunta)	57,95 <sup>aA</sup> (±0,13)	53,59 <sup>aB</sup> (±0,01)	52,29 <sup>bC</sup> (±0,33)	51,86 <sup>bcC</sup> (±0,42)	50,73 <sup>cD</sup> (±0,40)	50,57 <sup>cCD</sup> (±0,47)
3 (Cultura /0,1% extrato)	56,41 <sup>bA</sup> (±0,43)	51,94 <sup>bB</sup> (±0,09)	50,44 <sup>dC</sup> (±0,06)	49,38 <sup>cD</sup> (±0,34)	49,23 <sup>cCD</sup> (±0,48)	49,21 <sup>dCD</sup> (±0,11)
4 (Cultura /0,2% extrato)	57,40 <sup>aA</sup> (±0,13)	53,15 <sup>aB</sup> (±0,13)	52,15 <sup>bcC</sup> (±0,05)	50,02 <sup>cD</sup> (±0,36)	49,37 <sup>cE</sup> (±0,26)	49,22 <sup>dE</sup> (±0,30)
5 (0,1% de extrato)	55,59 <sup>bA</sup> (±0,05)	51,82 <sup>bB</sup> (±0,08)	51,58 <sup>cB</sup> (±0,16)	51,97 <sup>bB</sup> (±0,47)	51,94 <sup>bB</sup> (±0,63)	51,78 <sup>bB</sup> (±0,29)
6 (0,2% de extrato)	56,58 <sup>bA</sup> (±0,15)	51,02 <sup>bB</sup> (±0,06)	51,17 <sup>cB</sup> (±0,23)	51,51 <sup>bB</sup> (±0,48)	51,63 <sup>bB</sup> (±0,07)	51,53 <sup>bB</sup> (±0,04)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Em relação à umidade (Tabela 6 e Figura 16) verifica-se que após o 7° dia ocorreram poucas variações na umidade dos queijos 1, 5 e 6,. No entanto, nos tratamentos 2, 3 e 4 houve variações significativas ( $p < 0,05$ ) nos teores de umidade do 15° dia para o 45° dia, de 49 a 57%. Possivelmente este comportamento esteja associado a não lavagem da massa, menor pH provido pela adição das culturas adjunta o qual promoveu maior dessoragem da massa. GALLINA et al. (2002) obtiveram teores de umidade em torno de 55 % em queijo tipo Prato *light* com *Lactobacillus* como cultura adjunta. O mesmo foi verificado por VIANNA (2006), em queijo tipo Prato tradicional embalado a vácuo em embalagem termoencolhível e armazenado a 12 °C durante 54 dias, onde a umidade permaneceu constante entre 44 a 47 %.

De acordo com o conteúdo de umidade (%), os queijos são classificados pelo regulamento técnico de identidade e qualidade, Portaria n° 146, de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007a) em: queijos de baixa umidade (até 35,9 %), média umidade (36 a 45,9 %), alta umidade (46 a 54,9 %) e muita alta umidade (superior a 55 %). No 1° dia de armazenamento, todos os tratamentos apresentaram teores de umidade superiores a 55 %, se enquadrando nos tipos de queijo de muita alta umidade. Após o 7° dia, não houve grandes variações no conteúdo de umidade dos tratamentos e até o final do período de armazenamento, sendo estes classificados como queijos de alta umidade (49 a 53 %). Sendo que os maiores valores foram encontrados no tratamento 1 (controle). Possivelmente, este maior valor de umidade esteja atribuído ao grau de dessoragem dado a massa.

SILVEIRA e ABREU (2003) obtiveram em queijo tipo Prato com um dia de armazenamento, valores de 45,8 a 47,38 % de umidade, e ressaltam que um maior teor de umidade provoca maior maciez da massa do queijo, entretanto, deve-se considerar que este fator leva à diminuição do período de validade do produto. Valores semelhantes de umidade (47,11 %) foram encontrados por SPADOTI et al. (2005) em queijo tipo Prato com 10 dias de armazenamento.

A umidade é necessária para as atividades metabólicas dos micro-organismos. Diminuindo o teor de umidade do queijo diminui também a fermentação da lactose (FEREIRA, 2004). O teor de umidade é um fator que afeta a fermentação aromática. O teor de umidade do queijo, além de afetar sua consistência, tem grande influência sobre

as modificações físico-químicas que ocorrem ao longo do período de armazenamento e conseqüentemente a maturação (FURTADO 2002).

Os valores encontrados para umidade (Figura 16) em todos os ensaios foram superiores aos reportados por AUGUSTO (2003) em queijo Prato tradicional, com teores de 42 a 44 %. Os autores afirmaram que isto ocorreu em decorrência do tamanho dos grãos da massa obtida de caseína, os quais foram maiores do que grão de arroz, associados ao grau de dessoragem inferior dado a esses produtos.

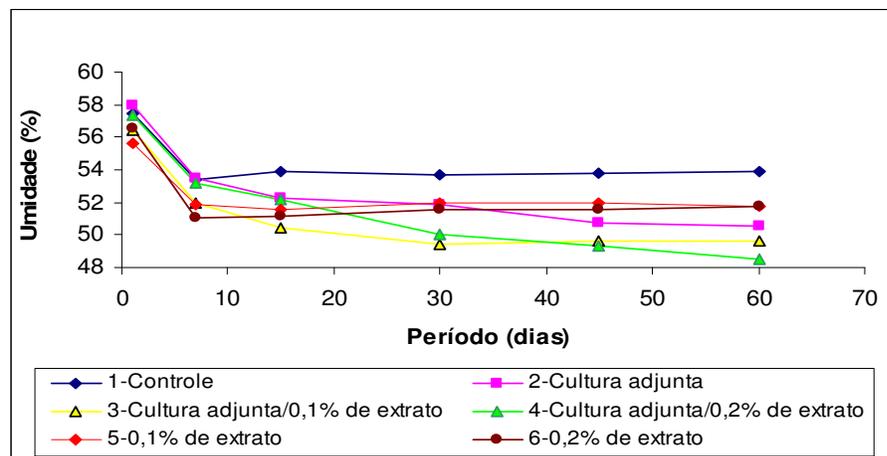


Figura 16- Gráfico de dispersão para os valores de umidade aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

De acordo com a Tabela 6, após o 1º dia de armazenamento os tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de umidade entre os dias analisados e aos 60 dias de maturação foram verificados os menores teores de umidade (Figura 16). Esta maior dessoragem pode estar associada à adição das culturas mesófilas pelo abaixamento maior de pH que esses microrganismos promovem no queijo pela produção de ácido láctico. Segundo, FOX et al. (2000) afirmam que o comportamento do pH é um fator determinante no processo de fabricação de queijos, sendo que seu abaixamento reduz o tempo de coagulação e favorece a sinerese e a desmineralização da massa.

O formato dos queijos é outro fator que pode direcionar perdas de umidade, normalmente queijos com forma de disco ou retangulares perdem mais água do que os esféricos devido à menor superfície específica destes últimos (FEREIRA 2004).

#### 4.2.4 pH

A Tabela 7 apresenta a média e desvio padrão em resposta aos valores de pH para as formulações de queijo prato no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR.

**Tabela 7** – pH das formulações de queijo Prato no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C.

Tratamento	pH*					
	1 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	15 <sup>o</sup> dia	30 <sup>o</sup> dia	45 <sup>o</sup> dia	60 <sup>o</sup> dia
1(Controle)	6,75 <sup>aA</sup> (±0,01)	5,10 <sup>cF</sup> (±0,01)	5,79 <sup>aB</sup> (±0,03)	5,57 <sup>aC</sup> (± 0,02)	5,21 <sup>aE</sup> (± 0,01)	5,38 <sup>aD</sup> (± 0,02)
2(Cultura adjunta)	5,20 <sup>fC</sup> (±0,01)	4,72 <sup>dF</sup> (±0,02)	5,47 <sup>bA</sup> (±0,02)	5,29 <sup>cB</sup> (±0,01)	4,81 <sup>cE</sup> (±0,01)	5,01 <sup>dD</sup> (±0,02)
3(Cultura /0,1% extrato)	5,41 <sup>eB</sup> (±0,01)	4,74 <sup>dE</sup> (±0,01)	5,62 <sup>bA</sup> (±0,02)	5,39 <sup>bB</sup> (±0,01)	4,85 <sup>bD</sup> (±0,01)	5,15 <sup>cC</sup> (±0,01)
4(Cultura /0,2% extrato)	5,65 <sup>dA</sup> (±0,02)	4,67 <sup>eE</sup> (±0,02)	5,28 <sup>cdB</sup> (±0,02)	5,26 <sup>cdB</sup> (±0,01)	4,72 <sup>dD</sup> (±0,01)	5,00 <sup>dC</sup> (±0,01)
5 (0,1% de extrato)	6,03 <sup>cA</sup> (±0,02)	5,16 <sup>bC</sup> (±0,01)	5,30 <sup>cB</sup> (±0,01)	5,22 <sup>dBC</sup> (±0,03)	5,15 <sup>aC</sup> (±0,01)	5,20 <sup>bBC</sup> (±0,01)
6 (0,2% de extrato)	6,32 <sup>bA</sup> (±0,02)	5,22 <sup>aBC</sup> (±0,02)	5,24 <sup>dB</sup> (±0,01)	5,30 <sup>cB</sup> (±0,03)	5,17 <sup>aC</sup> (±0,02)	5,28 <sup>abB</sup> (±0,01)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente à nível de 5% (Teste de Tukey).

Verifica-se a partir da Tabela 7 e Figura 17, que houve uma redução nos valores de pH do 1<sup>o</sup> para o 7<sup>o</sup> dia de armazenamento em todos os ensaios. Isto se deve ao fato de ter ocorrido degradação da lactose pelas bactérias lácticas e pelas culturas adjuntas

adicionados, e a obtenção de produtos finais, como CO<sub>2</sub> e ácido láctico (NARIMATSU et al., 2003). O ácido produzido ocasionou um aumento no teor de acidez (Tabela 8) e conseqüentemente uma redução do pH. Todas as formulações apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH em relação ao tratamento 1 (controle) durante o armazenamento, exceto no 45º dia para os tratamentos 5 e 6, os quais não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao padrão (Tratamento 1). As seis formulações seguiram o mesmo comportamento, com declínio do pH no início do armazenamento atingindo os menores valores no 7º e 45º dia de armazenamento e posterior aumento de pH. Este aumento de pH é característico de ocorrer durante o período de armazenamento, normalmente após 30 dias de maturação, em virtude de diminuir o conteúdo de lactose presente no queijo, e principalmente por ocorrer proteólise, pela ação das enzimas presentes, vindas pela adição do coalho e as produzidas pelas bactérias (bactérias lácticas nativas e culturas adjuntas- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*). COSTA et al (2005), afirmam que o maior consumo de proteínas que ocasiona um processo proteolítico mais intenso, promove a formação de compostos nitrogenados alcalinos (NH<sub>3</sub>), através de reações de descarboxilação de aminoácidos e, provavelmente decomposição do ácido láctico, ocasionando um aumento de pH. VIANNA (2006) ressalta que as caseínas são hidrolisadas pela atividade do coagulante residual retido na massa, produzindo grandes e médios peptídeos. Estes peptídeos são hidrolisados a pequenos peptídeos e aminoácidos pelas enzimas produzidas pelas bactérias da cultura láctica adicionada e pela microbiota secundária presente.

CICHOSKI et al. (2002) analisaram as características físico-químicas de 18 formulações queijos tipo Prato, sistema tradicional elaborados com leite não pasteurizado. Os referidos autores encontraram valores de pH em torno de 5,3 com 30 dias de maturação e não mostraram variações significativas ao longo dos 60 dias de armazenamento. Este valor foi próximo ao encontrado neste estudo para o tratamento 1, porém menor que os encontrados nos tratamentos 2, 3 e 4, com 30 e 60 dias de maturação, respectivamente. Possivelmente, isto está relacionado ao emprego de leite pasteurizado, associado à adição do extrato de erva-mate e cultura adjunta.

Os valores de pH nos queijos, geralmente, resultam da proporção entre a lactose presente no queijo e as substâncias tamponantes do coágulo protéico, demonstrando essa

uma boa capacidade proteolítica, com liberação de compostos aminados, que tendem a neutralizar a acidez natural da massa (AUGUSTO, 2003; GUTIERREZ, et al. 2004). Fato este, que foi observado nos queijos, estando este associado a proteólise promovida pela cultura adjunta (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) adicionada .

SPADOTI et al. (2005) e COSTA et al. (2005) encontraram valores semelhante de pH (5,2 a 5,7) em queijo Prato após 45 dias de estocagem a 12 °C e constataram que nesta faixa de pH, a proteólise é mais lenta, devido a esses valores de pH não serem ideais para a ação das proteases bacterianas e também para a quimosina do coalho.

Segundo CICHOSKI et al. (2007), o pH controla no queijo o tipo de fermentação e as atividades das enzimas, diminuindo o seu valor no início do armazenamento e como consequência aumenta a atividade proteases bacterianas e as naturais do leite. O pH também afeta a sinérese da massa e, desta forma a umidade do queijo. Quanto menor o pH, maior a sinérese. Sua variação é também responsável pelo teor de minerais no queijo. Quanto mais baixo o pH, mais desmineralizado é o produto. Além das consequências para a estrutura do queijo, a redução do pH também contribui para a segurança do produto, uma vez que inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis. As bactérias ácido-láticas constituintes do fermento são mais ácido-tolerantes do que os microrganismos contaminantes (FOX et al., 1990).

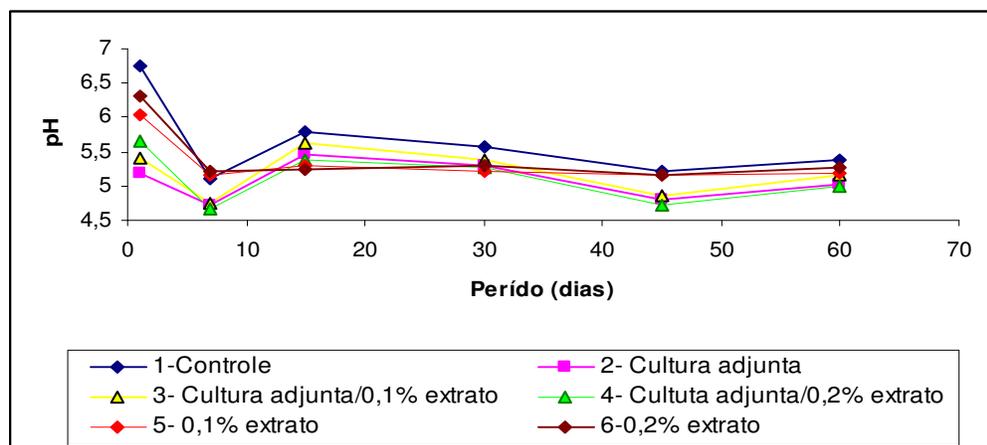


Figura 17 - Gráfico de dispersão para os valores de pH aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

Os queijos adicionados de culturas adjuntas e extrato de erva-mate apresentaram pH médio de 5,15 após 60 dias de maturação a 15°C (Figura 17), estando este valor abaixo do pH considerado típico para este tipo de queijo FURTADO e LOURENÇO NETO (1994). Possivelmente, este fato deve-se a adição das culturas adjuntas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) e também pode ser atribuído a adição de extrato de erva-mate que apresentou pH em torno de 5.5. Os *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (tipo "O"), são micro-organismos que degradam a lactose do leite unicamente em ácido láctico, produzindo queijo de massa fechada e aroma mais suave, adequado ao fatiamento para consumo indireto em lanches, sanduíches e outros pratos culinários (FURTADO e AMORIM, 2000).

#### 4.2.5 Acidez

A Tabela 8 apresenta a média e desvio padrão em resposta aos valores de acidez para o queijo Prato no 1º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15°C e 85% UR. Verifica-se que houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) e acentuado da acidez do 1º ao 7º dia de armazenamento de 0,35 a 1,99 g ácido láctico/100 g e uma redução aos 15 dias, indicando a ocorrência de proteólise. Todas as formulações apresentaram diferenças significativas nos valores de acidez em relação ao tratamento 1 (padrão) durante todo o período de armazenamento exceto, no 45º dia para os tratamentos 5 e 6, que não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao padrão, valores esses que concordam com os valores de pH (Tabela 7).

O aumento da acidez está diretamente relacionado com o aumento da população dos micro-organismos mesófilos, psicrotóxicos e principalmente as bactérias lácticas, as quais são os principais agentes na transformação da lactose em ácido láctico beneficiando o produto por inibir a microbiota patogênica (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

**Tabela 8** – Acidez das formulações de queijo Prato para o 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C

Tratamento	Acidez* (g ac. láctico/100g)					
	1 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	15 <sup>o</sup> dia	30 <sup>o</sup> dia	45 <sup>o</sup> dia	60 <sup>o</sup> dia
1(Controle)	0,35 <sup>fE</sup> (±0,02)	1,58 <sup>cA</sup> (±0,01)	0,93 <sup>dD</sup> (±0,02)	1,08 <sup>bC</sup> (±0,02)	1,47 <sup>cA</sup> (±0,02)	1,22 <sup>bB</sup> (±0,05)
2(Cultura adjunta)	1,57 <sup>aB</sup> (±0,01)	1,80 <sup>bA</sup> (±0,01)	1,07 <sup>cD</sup> (±0,04)	1,35 <sup>aC</sup> (±0,03)	1,64 <sup>bB</sup> (±0,03)	1,62 <sup>aB</sup> (±0,08)
3(Cultura /0,1% extrato)	1,32 <sup>bC</sup> (±0,01)	1,78 <sup>bA</sup> (±0,02)	1,11 <sup>cD</sup> (±0,02)	1,15 <sup>bD</sup> (±0,03)	1,61 <sup>bB</sup> (±0,02)	1,35 <sup>bC</sup> (±0,02)
4(Cultura /0,2% extrato)	1,09 <sup>cF</sup> (±0,03)	1,99 <sup>aA</sup> (±0,01)	1,42 <sup>aD</sup> (±0,02)	1,30 <sup>aE</sup> (±0,01)	1,71 <sup>aB</sup> (±0,01)	1,54 <sup>aC</sup> (±0,01)
5 (0,1% de extrato)	0,65 <sup>dD</sup> (±0,04)	1,42 <sup>dA</sup> (±0,04)	1,20 <sup>bC</sup> (±0,02)	1,29 <sup>aC</sup> (±0,05)	1,38 <sup>bB</sup> (±0,01)	1,26 <sup>bC</sup> (±0,02)
6 (0,2% de extrato)	0,53 <sup>eD</sup> (±0,05)	1,38 <sup>eB</sup> (±0,01)	1,36 <sup>aB</sup> (±0,01)	1,19 <sup>bC</sup> (±0,09)	1,40 <sup>cA</sup> (±0,02)	1,22 <sup>bC</sup> (±0,02)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Conforme a Tabela 8, verifica-se que a acidez foi mais acentuada nos tratamentos 2, 3 e 4, com exceção do 15<sup>o</sup> dia onde o tratamento 1 apresentou o menor valor de acidez (0,9 g ácido Láctico/100g de amostra). SILVA et al. (2006) ao avaliarem o efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* e cultura adjunta (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Prato obtiveram de 1,20 e 1,17 g ácido Láctico/ 100g no 30<sup>o</sup> e 48<sup>o</sup> dia de armazenamento, respectivamente. Sendo estes valores citados semelhantes aos encontrados para o 30<sup>o</sup> e menores no 60<sup>o</sup> dia de armazenamento no presente estudo.

Ao comparar a acidez do queijo tipo Prato durante o período de armazenamento aos 30 e 60 dias de armazenamento (Tabela 8) observa-se que os maiores valores de 1,22 e 1,36 g ac. láctico/100g, foram superiores aos relatados na literatura. Sendo que DELLA VECHIA et al. (2005), obtiveram valores de acidez que variaram de 0,64 %

(queijo controle) e 0,66 % (queijo acrescido de cultura) após 30 dias de maturação, em queijo tipo Prato adicionado de *Bifidobacterium lactis*. Para PENNA (2002), os valores de acidez após 33 e 90 dias de armazenamento foram de 0,69 % e 1,62 %, respectivamente. Enquanto, que CICHOSKI et al. (2002) encontraram 1,66 % de acidez em queijo tipo Prato colonial elaborado de maneira tradicional aos 60 dias de armazenamento valores médios próximos aos obtidos nesses tratamentos (1,36 g ac. Lático/ 100 g).

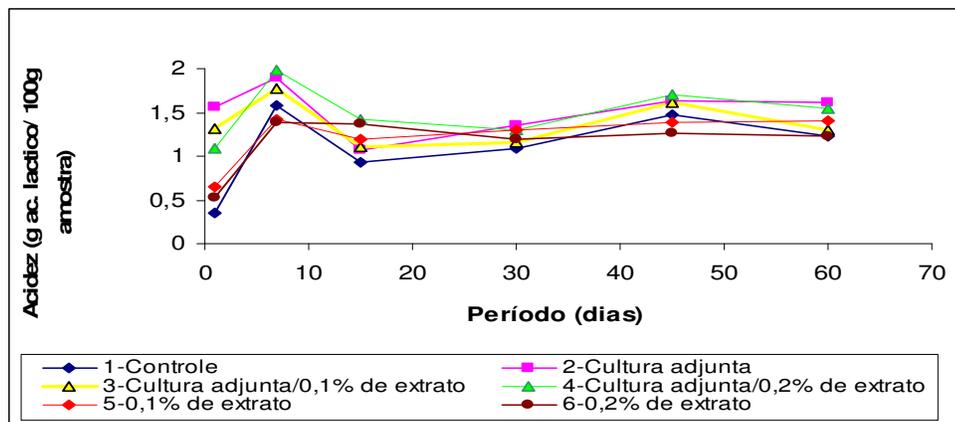


Figura 18 - Gráfico de dispersão para os valores de acidez aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

Verifica-se pela Tabela 8 e Figura 18 que houve um aumento no conteúdo de acidez do 30º para o 45º dia de armazenamento em todos os tratamentos, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e conseqüentemente ocorreu diminuição nos valores de pH (Tabela 7 e Figura 17). Como mencionado anteriormente essas oscilações nos valores de pH e no conteúdo de acidez são esperados durante o período de maturação do queijo prato devido à degradação da lactose residual que ocasiona decréscimo do pH e aumento da acidez enquanto que o comportamento contrario, ou seja, aumento do pH e redução da acidez que se devem à liberação de aminoácidos de caráter básicos decorrentes de uma proteólise secundária (PIZAIA et al., 2003).

#### 4.2.6 Oxidação de lipídeos e proteínas.

A oxidação dos alimentos é um grande problema durante o armazenamento, o que resulta na deterioração da qualidade dos alimentos. As reações de oxidação de proteínas ocorrerem simultaneamente com a oxidação lipídica, na maioria dos alimentos. A formação dos compostos carbonil (aldeídos e cetonas) são uma das mais proeminentes mudanças nas proteínas oxidadas, servindo sua concentração como um indicativo de oxidação de proteínas, sendo relativamente fácil de medir (LEVINE et al., 1990), como consequência é amplamente utilizada para a avaliação da extensão dos danos oxidativos sob diferentes estresses oxidativos.

A Tabela 9 apresenta a média e desvio padrão para a oxidação de lipídios das formulações de queijo prato para o 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR .

**Tabela 9** – Oxidação de lipídios (mg de MDA/kg amostra) para o 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C em queijo Prato.

Tratamento	Oxidação de lipídeos (mg de MDA/kg de amostra)					
	1 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	15 <sup>o</sup> dia	30 <sup>o</sup> dia	45 <sup>o</sup> dia	60 <sup>o</sup> dia
1(Controle)	0,086 <sup>aC</sup> (±0,002)	0,212 <sup>aA</sup> (±0,014)	0,187 <sup>aB</sup> (±0,006)	0,205 <sup>aAB</sup> (±0,006)	0,189 <sup>aB</sup> (±0,003)	0,185 <sup>aB</sup> (±0,003)
2(Cultura adjunta)	0,085 <sup>aB</sup> (±0,002)	0,103 <sup>dA</sup> (±0,003)	0,065 <sup>dC</sup> (±0,004)	0,075 <sup>cB</sup> (±0,001)	0,046 <sup>cD</sup> (±0,002)	0,042 <sup>cD</sup> (±0,002)
3(Cultura /0,1% extrato)	0,084 <sup>aA</sup> (±0,004)	0,082 <sup>eA</sup> (±0,002)	0,054 <sup>eC</sup> (±0,002)	0,066 <sup>cB</sup> (±0,004)	0,036 <sup>cD</sup> (±0,002)	0,031 <sup>eD</sup> (±0,001)
4(Cultura /0,2% extrato)	0,084 <sup>aA</sup> (±0,003)	0,091 <sup>deA</sup> (±0,002)	0,059 <sup>deB</sup> (±0,004)	0,078 <sup>cA</sup> (±0,004)	0,045 <sup>cC</sup> (±0,001)	0,035 <sup>deD</sup> (±0,002)
5 (0,1% de extrato)	0,082 <sup>aD</sup> (±0,002)	0,176 <sup>bA</sup> (±0,013)	0,118 <sup>bB</sup> (±0,003)	0,099 <sup>bC</sup> (±0,008)	0,075 <sup>bD</sup> (±0,005)	0,067 <sup>bE</sup> (±0,001)
6 (0,2% de extrato)	0,080 <sup>aC</sup> (±0,003)	0,136 <sup>cA</sup> (±0,002)	0,105 <sup>cB</sup> (±0,002)	0,078 <sup>cC</sup> (±0,004)	0,071 <sup>bC</sup> (±0,003)	0,042 <sup>cdD</sup> (±0,003)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Os tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a oxidação lipídica ao comparar ao tratamento 1, durante todo o período de armazenamento. Os menores valores foram encontrados no tratamento 3 (cultura/0,1% de extrato), sendo que este comportamento manteve-se até o final do período de maturação (60 dias).

Nas formulações sem adição de cultura adjunta e sem extrato de erva-mate (tratamento 1) foram verificados os maiores teores de TBARS (0,086 a 0,212 mg de MDA/ Kg) durante o período de maturação.

De maneira geral, verificou-se pela Figura 19 que houve um acréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) nos teores de TBARS até o 30º dia de armazenamento, com exceção dos tratamentos 5 e 6 onde verifica-se um decréscimo dos valores de TBARS a partir do 15 dia de armazenamento, após esse período ocorrerem pequenas variações com decréscimo a partir do 45º dia de armazenamento. Diversos autores sugerem que a redução nos valores de TBARS observados em função do tempo de armazenamento, está associada provavelmente com o aumento das concentrações de produtos altamente polares, resultantes da polimerização dos produtos de oxidação secundária. Foi relatado que o malonaldeído (MDA) reage com uma larga escala de compostos ou pode formar dienos ou trienos de MDA, o que diminui a quantidade de MDA disponível para reagir com o ácido tiobarbitúrico, em consequência, os valores de TBARS avaliados são reduzidos (GATELLIER et al., 2007).

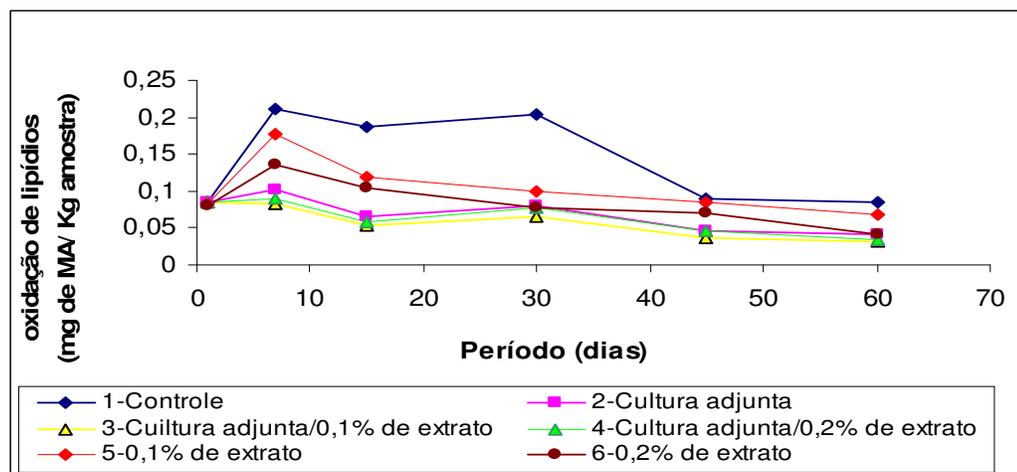


Figura 19 - Gráfico de dispersão para a oxidação lipídica das formulações de queijo prato aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

De acordo com TRINDADE et al. (2008) os odores de ranço podem ser detectados por provadores treinados e não treinados com rancidez (TBARS) na faixa de 0,5 a 1,0 e 0,6 a 2,0 mg de malonaldeído/kg amostra, respectivamente. Nos tratamentos os valores de TBARS foram inferiores aos citados pelo referido autor não sendo detectados odores ou sabores de ranço nas avaliações sensoriais (Tabela 13).

Os resultados deste estudo mostraram que no tratamento 3, formulados com 0,1 % de extrato e culturas adjuntas a partir do 7º dia de armazenamento, foi o que apresentou os menores valores de TBARS. Apesar de nos tratamentos formulados apenas com extrato de erva mate (tratamentos 5 e 6) os valores terem sido maiores que nos tratamentos 2, 3 e 4, esses ainda foram inferiores aos do tratamento controle (Figura 19). Portanto, não pode-se considerar que o extrato de erva-mate tenha apresentado efeito pró-oxidante quando da ação isolada, mas deve-se levar em consideração, que os constituintes da clorofila presentes neste extrato podem ter efeito catalítico no sistema lácteo em questão. WANASUNDARA e SHAHIDI (1998) encontraram diferenças significativas no comportamento oxidativo de diferentes óleos marinhos tratados com diferentes aplicações de extratos de chá verde com e sem clorofila, sendo que o primeiro apresentou efeito pró-oxidante em ambos os óleos e o extrato declorofilado (acima de 200 ppm) apresentou excelente atividade antioxidante, sendo mais efetivo que o BHA, BHT e  $\alpha$ -tocoferol, nas mesmas condições. MILANI et al. (2001) estudaram os efeitos antioxidantes dos extratos alcoólicos e metanólicos do chá verde, chá preto e de erva-mate em carne mecanicamente separada de frango, conservada a 5°C e a -25°C e também observaram que todos os extratos demonstraram ação antioxidante quando comparados com a amostra controle (sem antioxidantes). YANISHLIEVA e MARINOVA (2001) e TANG et al. (2001), observaram equivalência da ação entre antioxidantes naturais e antioxidantes sintéticos, destacando que os usos dos produtos naturais são importantes para saúde humana, uma vez que alguns antioxidantes sintéticos apresentam atividade carcinogênica.

Segundo KUMAR et al. (1986), outro fator que pode influenciar nos valores de TBARS é o pH. Quanto maior o valor de pH, maior a oxidação lipídica. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com esta afirmação, como pode ser verificado

pela Tabela 9 e Tabela 7 (pH), sendo que nos tratamentos 2, 3 e 4 foi verificado menores valores de TBARS e de pH (4,67 a 5,65), possivelmente pela adição de culturas adjuntas, que promoveram um abaixamento do pH das formulações.

A Tabela 10 apresenta a média e desvio padrão para a oxidação de proteínas (nmol carbonil/ mg proteína) para os queijos no 1°, 30° e 60° dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR dos queijos tipo Prato.

**Tabela 10** – Oxidação de proteínas (nmol carbonil/ mg proteína) das formulações de queijo Prato no 1°, 30° e 60° dias de armazenamento a 15 °C.

Tratamento	Oxidação de proteínas (nmol carbonil/ mg proteína)		
	1° dia	30° dia	60° dia
1 (Controle)	2,57 <sup>cB</sup> (±0,31)	4,52 <sup>dA</sup> (±0,35)	2,91 <sup>cB</sup> (±0,10)
2 (Cultura adjunta)	4,67 <sup>aB</sup> (±0,50)	8,59 <sup>aA</sup> (±0,23)	5,53 <sup>aB</sup> (±0,49)
3 (Cultura /0,1% extrato)	3,34 <sup>bB</sup> (±0,28)	6,50 <sup>bA</sup> (±0,39)	4,22 <sup>bB</sup> (±0,0,26)
4 (Cultura /0,2% extrato)	3,15 <sup>bcB</sup> (±0,02)	5,60 <sup>cA</sup> (±0,43)	4,17 <sup>bB</sup> (±0,11)
5 (0,1% de extrato)	2,59 <sup>cB</sup> (±0,41)	3,36 <sup>eA</sup> (±0,19)	2,55 <sup>cB</sup> (±0,10)
6 (0,2% de extrato)	3,48 <sup>bC</sup> (±0,20)	3,10 <sup>eA</sup> (±0,12)	1,43 <sup>dB</sup> (±0,11)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Verifica-se pela Tabela 10, que durante a maturação o tratamento 2 (cultura adjunta) apresentou significativamente os maiores índices de carbonil. No entanto, nos tratamentos 5 (0,1% de extrato) e 6 (0,2% extrato) no 30° dia de armazenamento,

constatou-se valores significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores para a oxidação de proteínas e este comportamento manteve-se até o final do período de maturação (60 dias).

BATIFOULIER et al. (2002) avaliaram a oxidação de lipídios e proteínas geradas em um sistema metamioglobina +  $H_2O_2$  incubado a  $37^\circ C$  com agitação de membranas microssomais do músculo de peru com uma dieta basal enriquecida com óleo de soja 6% e suplementada com vitamina E onde o valor inicial foi de 5 nmol carbonil por mg de proteína aumentando para 11 nmol carbonil/ mg proteína em 5 horas. Neste estudo, verifica-se que os valores de carbonil (Figura 20), também, aumentaram nos tratamentos, porém em 30 dias, por não se tratar de um sistema induzido. Além disso, os queijos foram armazenados a uma temperatura inferior a utilizado pelos autores citados acima ( $15^\circ C$ ) o que pode ter reduzido a disposição desses produtos a oxidação de proteínas em menor tempo de armazenamento e o sistema lácteo em questão não apresenta metamioglobina em sua composição sendo difícil estabelecer uma comparação com o sistema citado pelo referido autor.

Verifica-se pela Figura 20, que houve um acréscimo aos 30 dias de armazenamento apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos e aos 60 dias ocorreu redução no índice de carbonil em todos os tratamentos apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

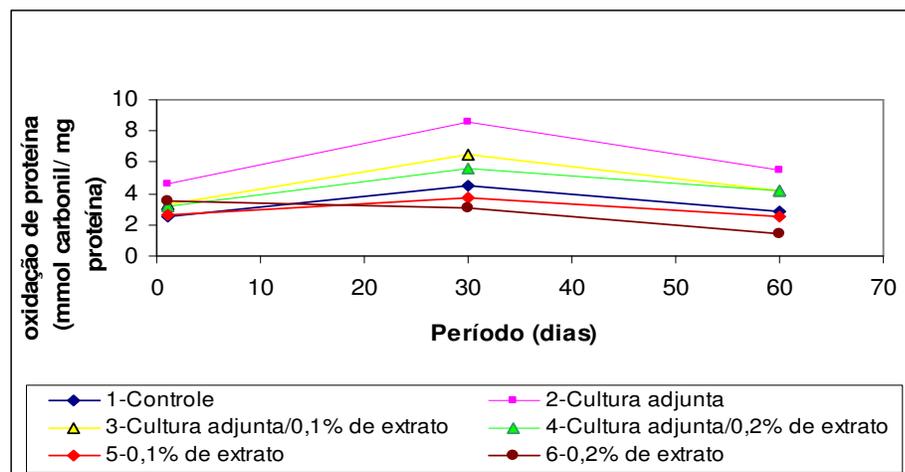


Figura 20 – Evolução da oxidação Protéica (nmol carbonil/ mg de proteína) nos queijos aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a  $15^\circ C$  e UR 85%.

O extrato de erva-mate apresentou efeito significativo na redução da oxidação de proteínas no 30° dia de armazenamento nos tratamentos 5 e 6 que só continham o extrato de erva-mate. Porém, no 60° dia o tratamento contendo 0,1% de extrato de erva-mate não apresentou diferença significativa no índice de carbonil quando comparado ao tratamento 1 (controle). No entanto na concentração de 0,2% de extrato ocorreu redução da concentração de carbonil indicando assim que nessa concentração o extrato pode ter exercido a função de antioxidante frente à oxidação de proteínas.

Diversos autores relatam que ocorrem interações entre os lipídios e as proteínas, e essa interação apresenta um efeito significativo nos processos de reações oxidativas nos alimentos. Devido a estas fortes interações as reações de oxidações podem facilmente se transferir dos lipídios para as proteínas afetando a qualidade do produto, tendo também um impacto na conformação da estrutura tridimensional da proteína expondo os grupos hidrofóbicos, trazendo mudanças nas estruturas secundárias e de grupos bissulfetos; perda da atividade enzimática e mudanças nos valores nutritivos pela perda de aminoácidos essenciais (SARKER et al., 1995; ZAMORA et al., 1999; HOWELL et al., 2001). Estes fenômenos oxidativos podem causar a degradação, fragmentação ou a agregação da proteína, e aumento na susceptibilidade proteolítica (DECKER et al. 1993).

Na literatura, não foram encontradas informações de oxidação de proteínas em queijo Prato em condições similares as utilizadas neste estudo. A maioria das pesquisas realizadas a processos oxidativos e suas implicações na qualidade dos alimentos, tem incidido sobre a oxidação lipídica e em sistemas cárneos. MERCIER et al. (2004) estudaram a influência do tipo de dieta (pastagem ou dieta mista) na carne sem gordura homogeneizada em relação às oxidações dos lipídios e das proteínas em bovinos tipo Charolês. Mediram essas oxidações no tempo zero, 0,5, 2 e 5 horas em um sistema químico formado por  $Fe^{2+}/H_2O_2$  determinando o grupo carbonil durante o experimento. O nível inicial de oxidação protéica foi cerca de 3 nmol de carbonil por mg de proteína, apresentando um aumento durante os primeiros 30 minutos de incubação para chegar a um nível máximo que foi de aproximadamente três vezes o nível inicial (9

nmol) e, depois, ligeiramente diminuiu para 6,5 nmol após 5 horas de incubação. Observaram que a carne vinda de bovinos alimentados de pastagens ocorreu redução significativa em relação a oxidação de lipídios, mas não foram significativas para a oxidação de proteínas. Para explicar este resultado, sugeriram que a produção do grupo carbonil estaria limitada a somente um grupo de aminoácidos e não representaria todos os fenômenos de oxidação que ocorrem.

### 4.3 Características microbiológicas

#### 4.3.1 Bactérias lácticas.

A Tabela 11 apresenta a média e desvio padrão em resposta a contagem de bactérias lácticas (log UFC/g) do queijos - tipo Prato, no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR.

**Tabela 11** – Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g) das formulações de queijo Prato para o 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C.

Tratamento	Culturas Lácticas (log UFC/g)					
	1 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	15 <sup>o</sup> dia	30 <sup>o</sup> dia	45 <sup>o</sup> dia	60 <sup>o</sup> dia
1(Controle)	6,04 <sup>cC</sup> (±0,12)	8,72 <sup>bA</sup> (±0,12)	7,74 <sup>bB</sup> (± 0,45)	7,75 <sup>aB</sup> (± 0,07)	7,57 <sup>aB</sup> (± 0,18)	7,43 <sup>aB</sup> (± 0,35)
2(Cultura adjunta)	7,36 <sup>aB</sup> (±0,11)	9,27 <sup>aA</sup> (±0,21)	9,05 <sup>aA</sup> (±0,50)	7,74 <sup>aB</sup> (±0,06)	7,58 <sup>aB</sup> (±0,14)	7,56 <sup>aB</sup> (±0,23)
3(Cultura / 0,1% extrato)	7,14 <sup>aB</sup> (±0,12)	8,97 <sup>abA</sup> (±0,14)	8,75 <sup>aA</sup> (±0,43)	7,54 <sup>aB</sup> (±0,11)	7,24 <sup>abB</sup> (±0,06)	7,20 <sup>abB</sup> (±0,12)
4(Cultura / 0,2% extrato)	7,19 <sup>aB</sup> (±0,15)	9,18 <sup>abA</sup> (±0,18)	9,05 <sup>aA</sup> (±0,51)	7,57 <sup>aB</sup> (±0,05)	7,16 <sup>bB</sup> (±0,20)	6,99 <sup>bB</sup> (±0,12)
5 (0,1 % de extrato)	6,56 <sup>bB</sup> (±0,29)	7,59 <sup>cA</sup> (±0,18)	7,53 <sup>bA</sup> (±0,28)	6,45 <sup>bB</sup> (±0,11)	6,43 <sup>cB</sup> (±0,12)	6,36 <sup>cB</sup> (±0,08)
6 (0,2 % de extrato)	6,92 <sup>abB</sup> (±0,29)	7,54 <sup>cA</sup> (±0,20)	7,52 <sup>bA</sup> (±0,06)	6,56 <sup>bB</sup> (±0,07)	6,53 <sup>cB</sup> (±0,50)	6,43 <sup>cB</sup> (±0,12)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Verifica-se pela Tabela 11, que após elaboração (1 dia), a contagem de bactérias lácticas variou de 7,26 log UFC/g (queijo adicionado de culturas adjuntas) a  $\log_{10}$  6,04 UFC/g (queijo controle), ocorrendo diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. No 7º dia de armazenamento, o tratamento 2 (queijo contendo culturas adjuntas), tratamentos 5 (queijo contendo 0,1%) e 6 (0,2% de extrato) diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do queijo controle, sendo que o tratamento 2 apresentou contagem superior quando comparado aos tratamentos 5 e 6 e menores em relação a formulação de queijo Prato tradicional (Tratamento 1).

No 15º dia de armazenamento, o queijo contendo cultura adjunta (Tratamento 2), cultura adjunta e 0,1% de extrato (Tratamento 3) e cultura adjunta e 0,2% de extrato (Tratamento 4) apresentaram contagem de bactérias lácticas estatisticamente superior a formulação controle e aos demais tratamentos. No entanto, após o 7º dia de armazenamento nos queijos acrescidos de 0,1 % de extrato (Tratamento 5) e 0,2 % de extrato (Tratamento 6) constatou-se contagens de bactérias lácticas significativamente inferiores aos demais tratamentos. Porém, nos tratamentos 2, 3 e 4 não diferiram estatisticamente do tratamento 1 e esse comportamento manteve-se até o final do período de armazenamento.

Verifica-se na Tabela 11 e Figura 21 que a adição do extrato de erva-mate no queijo Prato pode ter dificultado o crescimento das bactérias lácticas durante a maturação, pois nos tratamentos 5 (0,1 % de extrato) e 6 (0,2 % de extrato) apresentavam número maior de colônias de bactérias lácticas no primeiro dia de armazenamento, quando comparados ao tratamento 1, sendo esta diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Após esse período a contagem de bactérias lácticas nos tratamentos 5 e 6 foram inferiores aos demais tratamentos.

Para afirmar, que o extrato de erva-mate tenha atuado como um agente antimicrobiano, no presente estudo, seriam necessários maiores estudos dessas propriedades. Além disso, outros fatores podem ter promovido esta redução no número de bactérias lácticas. Cabe ressaltar, que os referidos tratamentos apresentaram menor conteúdo de umidade a partir do 7º dia de armazenamento, fato que possivelmente,

também tenha influenciado no crescimento de bactérias lácticas, já que o teor de umidade é essencial para o seu desenvolvimento.

Nos últimos anos, a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de erva-mate tem sido relatada, sendo que esta atividade deve-se a um grupo de compostos que incluem alcalóides, substâncias fenólicas e polifenóis, flavonas, taninos e cumarinas (GONCALVES et al., 2005). O mecanismo da atividade antimicrobiana é complexo, podendo ser devido ao efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995). Vários autores citam a adição de compostos fenólicos em alimentos com a finalidade de atuarem como agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos (ATROSHI et al., 2003) porém a natureza lipofílica dos fenóis pode reduzir suas propriedades antimicrobianas (BARANOWSKI e NAGEL, 1984).

Os tratamentos 3 e 4 que foram adicionados de culturas mesófilas e extrato de erva-mate não apresentaram diferença significativa na contagem de bactérias lácticas quando comparadas ao tratamento 1 (controle) demonstrando assim que não ocorreu ação do efeito antimicrobiano da erva-mate frente a culturas mesófilas empregadas, uma vez que a erva-mate apresenta esse efeito (GONÇALVES et. al., 2005; HECK et al., 2007; EFING, 2008), demonstrando que essas concentrações podem ser empregadas sem causar prejuízos ao produto elaborado.

VALDUGA et al., (2008), observaram em iogurte natural contendo 0,1 % de extrato de erva-mate maior número de colônias de bactérias lácticas, do que no iogurte natural sem extrato, sendo significativa a diferença durante os 45 dias de armazenamento.

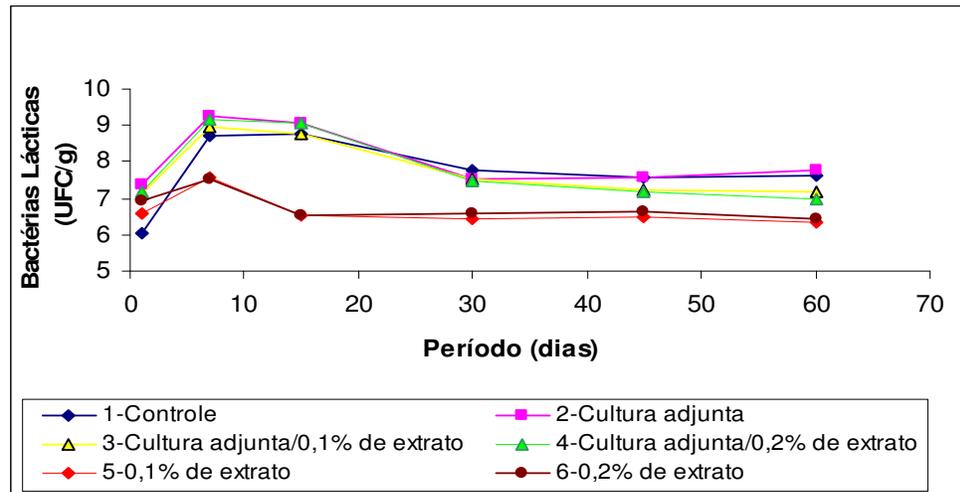


Figura 21 - Gráfico de dispersão para os valores de UFC/ g de culturas lácticas aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

Após o 30º dia de armazenamento nos tratamentos ocorreu pequenas variações, porém não significativas na contagem de bactérias lácticas em todos os ensaios.

A presença das bactérias lácticas pode ter sua origem no leite destinado à produção do queijo ou pela adição de cultura láctica durante o processamento do produto. O seu crescimento ocasiona o aumento da acidez pelo fato de fermentarem a lactose e formarem ácido láctico. As bactérias lácticas são responsáveis pelas transformações bioquímicas de lipídios e proteínas em diferentes compostos desenvolvendo *flavor*, caracterizando o produto final quanto ao sabor, aroma e textura (ESKIN, 1990; PERRY, 2004).

### 4.3.2 Culturas adjuntas

A Tabela 12 apresenta a média e desvio padrão em resposta ao número de colônias das culturas mesófilas (*Lactococcus Lactis* ssp. *Lactis* e *cremoris*) (log UFC/g) para o queijo Prato, no 1º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR.

**Tabela 12** – Contagem de culturas adjuntas para as formulações do queijo Prato para o 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C.

Tratamento	Culturas adjuntas (log UFC/g)					
	1 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	15 <sup>o</sup> dia	30 <sup>o</sup> dia	45 <sup>o</sup> dia	60 <sup>o</sup> dia
1(controle)	4,57 <sup>bB</sup> (±0,38)	5,57 <sup>bA</sup> (±0,04)	5,59 <sup>bA</sup> (±0,53)	3,72 <sup>bC</sup> (±0,26)	3,41 <sup>bC</sup> (±0,08)	2,47 <sup>bD</sup> (±0,24)
2(Cultura adjunta)	7,86 <sup>aB</sup> (±0,48)	9,13 <sup>aA</sup> (±0,05)	9,46 <sup>aA</sup> (±0,09)	7,00 <sup>aB</sup> (±0,04)	5,91 <sup>aC</sup> (±0,27)	5,20 <sup>aD</sup> (±0,15)
3(Cultura / 0,1% extrato)	7,93 <sup>aB</sup> (±0,09)	9,49 <sup>aA</sup> (±0,25)	9,42 <sup>aA</sup> (±0,22)	6,98 <sup>aC</sup> (±0,03)	5,87 <sup>aD</sup> (±0,11)	5,00 <sup>aE</sup> (±0,07)
4(Cultura / 0,2% extrato)	8,25 <sup>aB</sup> (±0,22)	8,95 <sup>abA</sup> (±0,24)	9,26 <sup>aA</sup> (±0,12)	7,09 <sup>aC</sup> (±0,17)	6,00 <sup>aD</sup> (±0,29)	4,95 <sup>aE</sup> (±0,08)'
5 (0,1 % de extrato)	4,43 <sup>bB</sup> (±0,05)	5,47 <sup>bA</sup> (±0,16)	5,39 <sup>bA</sup> (±0,09)	3,43 <sup>bC</sup> (±0,16)	2,93 <sup>cD</sup> (±0,13)	2,05 <sup>cE</sup> (±0,16)
6 (0,2 % de extrato)	4,47 <sup>bB</sup> (±0,05)	5,44 <sup>bA</sup> (±0,18)	5,40 <sup>bA</sup> (±0,08)	3,32 <sup>bC</sup> (±0,02)	3,01 <sup>cD</sup> (±0,04)	2,06 <sup>cE</sup> (±0,02)

\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

Verifica-se pela Tabela 12 e Figura 22 que houve um acréscimo na contagem de culturas adjuntas do 1<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia de armazenamento com exceção dos tratamentos 5 e, porém nenhum dos tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao 7<sup>o</sup> dia de armazenamento. Após esse período houve redução significativa no número de colônias de culturas adjuntas, com exceção do tratamento 1 que diferiu apenas aos 60 dias de maturação.

A contagem inicial de culturas lácteas adicionadas em queijo prato varia entre  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g (VARNAM e SUTHERLAND, 1995; FURTADO, 2002). No presente trabalho os valores iniciais no número de culturas adjuntas os tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram valores semelhantes ( $\sim 10^8$  UFC/g) ao encontrados pelos referidos autores.

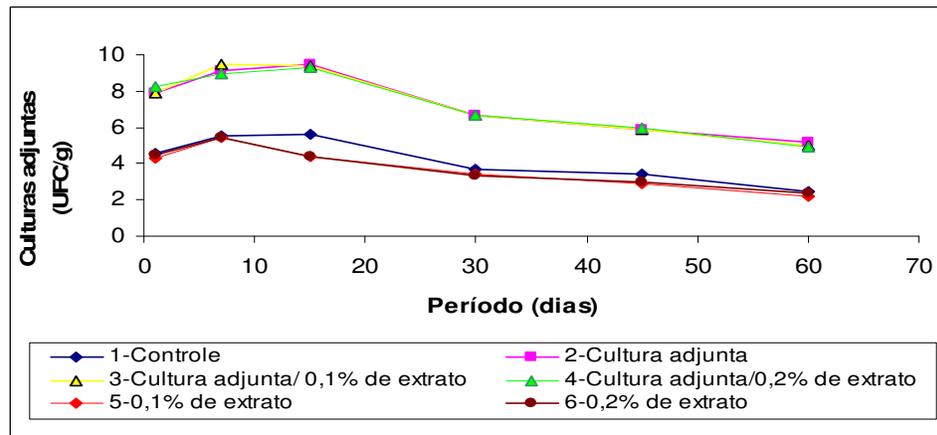


Figura 22 - Gráfico de dispersão para os valores de UFC/g de culturas adjuntas aos 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 15°C e UR 85%.

Durante todo o período de armazenamento os tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram os maiores valores de log UFC/g de culturas adjuntas apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao tratamento 1 (controle) comportamento esse esperado pela adição das culturas adjuntas nos respectivos tratamentos. No entanto os tratamentos 5 e 6 apresentaram valores significativamente inferiores quando comparados aos demais estatisticamente tratamentos durante a evolução da maturação.

Os tratamentos 3 (cultura e 0,1% de extrato) e 4 (cultura e 0,2% de extrato) não apresentaram diferença significativa na contagem de culturas adjuntas quando comparadas ao tratamento 2, demonstrando assim que o extrato de erva-mate não apresentou atividade antimicrobiana frente a estes micro-organismos.

Após a pasteurização o leite não possui uma microbiota dominante, assim na elaboração de certos queijos procede-se à adição dessas culturas lácticas, as quais fermentam a lactose, formando ácido láctico, diminuindo o pH e beneficiando a ação da renina (ESKIN, 1990). Além disso a redução do valor de pH também contribui para a segurança do produto, uma vez que inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis. As bactérias ácido-láticas constituintes do fermento são mais acidotolerantes do que os micro-organismos contaminantes (FOX et al., 1990).

#### 4.4 Características sensoriais

A Tabela 13 apresenta os resultados dos atributos sensoriais (aceitação geral, sabor e textura) dos queijos tipo Prato, no 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C e 85 % UR.

**Tabela 13** – Atributos sensoriais de aceitação geral, sabor e textura do queijo Prato para o 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de armazenamento a 15 °C e 85% UR.

Ensaio*	Atributos								
	Aceitação			Sabor			Textura		
	30 dias	45 dias	60 dias	30 dias	45 dias	60 dias	30 dias	45 dias	60 dias
1	7,30 <sup>abA</sup> (±1,44)	7,17 <sup>aB</sup> (±0,87)	7,73 <sup>aA</sup> (±0,78)	7,03 <sup>abA</sup> (±1,58)	7,33 <sup>aA</sup> (±0,84)	7,17 <sup>abA</sup> (±1,15)	7,17 <sup>abA</sup> (±2,07)	7,03 <sup>aA</sup> (±1,16)	7,23 <sup>aA</sup> (±1,25)
2	6,63 <sup>bcB</sup> (±1,33)	7,13 <sup>aA</sup> (±1,04)	7,07 <sup>bcdA</sup> (±0,98)	6,47 <sup>bcB</sup> (±1,41)	6,70 <sup>abA</sup> (±1,51)	6,47 <sup>bcB</sup> (±1,48)	6,27 <sup>bcA</sup> (±1,68)	6,20 <sup>abA</sup> (±1,83)	6,53 <sup>aA</sup> (±1,38)
3	6,71 <sup>bcB</sup> (±1,19)	6,79 <sup>abAB</sup> (±1,09)	7,23 <sup>abCA</sup> (±0,90)	6,67 <sup>bcB</sup> (±1,45)	6,07 <sup>bcC</sup> (±1,34)	7,10 <sup>abA</sup> (±1,12)	6,10 <sup>cb</sup> (±1,65)	6,10 <sup>abB</sup> (±1,50)	6,80 <sup>aA</sup> (±1,47)
4	6,43 <sup>ca</sup> (±1,41)	6,23 <sup>ba</sup> (±1,04)	6,40 <sup>ea</sup> (±1,28)	5,87 <sup>ca</sup> (±1,94)	5,43 <sup>ca</sup> (±1,48)	5,77 <sup>ca</sup> (±1,71)	5,77 <sup>ca</sup> (±1,89)	5,73 <sup>ba</sup> (±1,60)	5,63 <sup>ba</sup> (±1,54)
5	7,33 <sup>abA</sup> (±0,99)	7,27 <sup>aA</sup> (±1,08)	6,53 <sup>deB</sup> (±1,07)	7,20 <sup>abA</sup> (±1,13)	6,90 <sup>abAB</sup> (±1,52)	6,63 <sup>bcB</sup> (±1,52)	7,23 <sup>abA</sup> (±1,14)	6,80 <sup>ab</sup> (±1,35)	6,50 <sup>ab</sup> (±1,25)
6	7,10 <sup>abcA</sup> (±1,63)	7,33 <sup>aA</sup> (±1,03)	6,63 <sup>ceB</sup> (±1,77)	7,70 <sup>aA</sup> (±1,34)	6,80 <sup>abB</sup> (±1,35)	7,70 <sup>aA</sup> (±1,36)	7,53 <sup>aA</sup> (±1,04)	6,80 <sup>ab</sup> (±1,34)	6,60 <sup>ab</sup> (±1,73)

\*\*média ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas colunas/linhas não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste de Tukey).

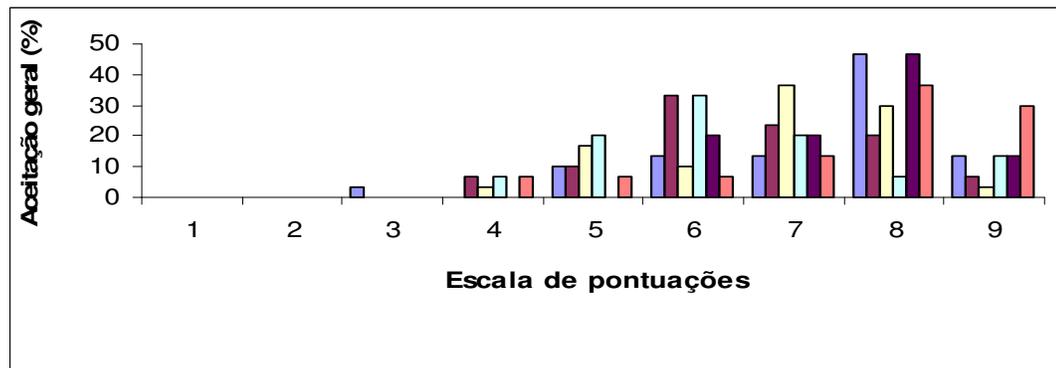
\*(1) Queijo prato sem adição de culturas mesófila e extrato; (2) queijo prato com culturas mesófilas; (3) queijo prato acrescido de culturas mesófilas e 0,1% extrato; (4) queijo prato acrescido de culturas mesófilas e 0,2% extrato; (5) queijo prato acrescido 0,1% extrato; (6) queijo prato acrescido de 0,2% extrato.

Verifica-se pela Tabela13 que para o atributo aceitação geral o tratamento 4 (cultura adjunta/ 0,2 % extrato) foi o único que apresentou diferença significativa

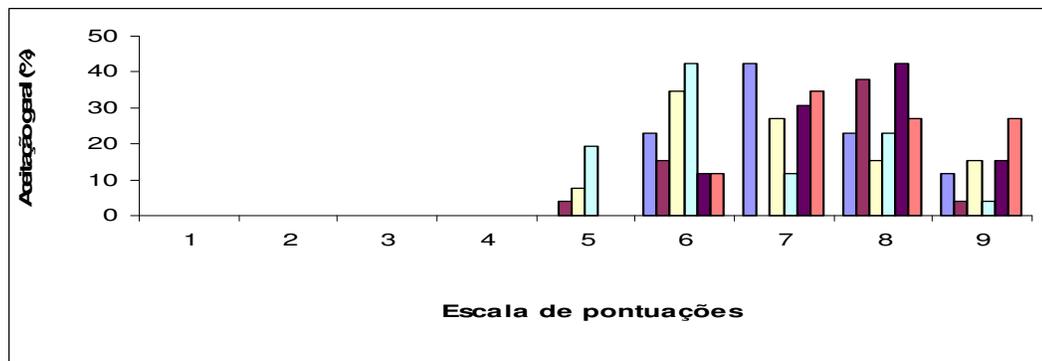
( $p < 0,05$ ) quando comparado ao tratamento 1 (controle), sendo que o mesmo apresentou a menor média de pontuação (6,23 a 6,43) aos 30, 45 e 60 dias, correspondendo na escala hedônica ao gostei ligeiramente.

O tratamento 5 aos 30 e 45 dias de maturação (Figura 23 a e b) sobressaiu-se aos demais tratamentos, com aceitação geral no histograma de frequência de 81,44 e 80,77 %, correspondendo na escala de pontuação ao gostei muito, respectivamente. Já nos 60 dias (Figura 23 c) o tratamento 1 (controle) e tratamento 3 (cultura adjunta e 0,1% extrato) apresentaram com a maior aceitação geral no histograma de frequência de 85,89 e 80,33%, correspondendo na escala de pontuação ao gostei muito, respectivamente.

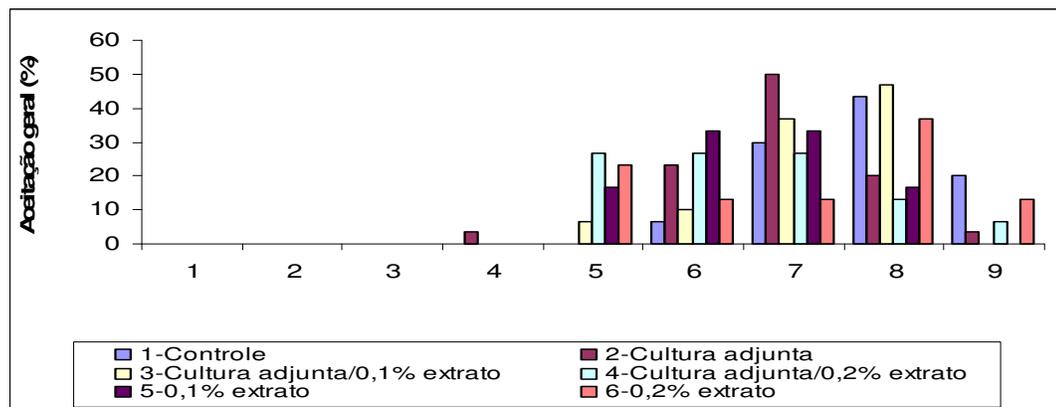
Em relação a aceitabilidade aos 30 e 45 dias de maturação, os tratamentos 5 e 6 apresentaram comportamento semelhante ao tratamento 1 (controle), com índices de aceitação de 79 a 81 %, respectivamente. Contudo, nos respectivos tratamentos aos 60 dias a aceitação geral apresentou um decréscimo (Tabela 13).



(a)



(b)



(c)

Figura 23 – Histograma de frequência para Aceitação geral aos 30 (a), 45 (b) e 60 dias (c), respectivamente (9 - gostei muitíssimo, 8 - gostei muito, 7 - gostei moderadamente, 6 - gostei ligeiramente, 5 - nem gostei / nem desgostei, 4 - desgostei ligeiramente, 3 - desgostei moderadamente, 2 - desgostei muito, 1 - desgostei muitíssimo).

Os valores médios obtidos para o atributo sabor (Tabela 13) mostram que para os tratamentos 1, 5 e 6 aos 30<sup>o</sup> dia de armazenamento, apresentaram como característica "gostei moderadamente". Apenas o tratamento 4 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao tratamento 1 (controle), mantendo este comportamento na evolução da maturação (45 e 60 dias), sendo que o mesmo obteve médias de 5 que correspondem na escala hedônica ao não gostei/nem desgostei. No 45<sup>o</sup> dia houve um decréscimo nos valores médios, com exceção nos tratamentos 1 e 2. O decréscimo deve-se ao fato de que, a maioria dos provadores detectaram sabor residual amargo, pronunciado aos 45 dias de maturação. Um dos fatores, que podem ter influenciado nessa redução, é que os referidos tratamentos continham extrato de erva-mate, o qual pode ter influenciado no quesito sabor. Fato, possivelmente associado a composição em polifenóis e flavonóides da erva-mate, os quais conferiram gosto adstringente e/ou amargo ao produto. Outro fator que pode ter influenciado nessa redução é que o sabor amargo também pode estar relacionado com o aparecimento de peptídeos menores, que são formados pela ação das enzimas proteinases do coalho e de algumas bactérias lácticas sobre peptídeos maiores (SOUZA et al., 2001).

SPADOTI et al. (2005) avaliaram sensorialmente queijo tipo Prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação do queijo com o uso de leite concentrado por ultrafiltração e pré-fermentação de 10 % do mesmo, e observaram a presença de um leve gosto amargo nas formulações dos queijos com 45 dias de estocagem a temperatura de  $7 \pm 1$  °C, prejudicando seu sabor.

Porém, aos 60<sup>o</sup> dia nos tratamentos 3, 4 e 6 ocorreu um aumento nas médias em relação ao sabor. O tratamento 4, mesmo apresentando um aumento nas médias do atributo sabor, manteve a classificação da escala hedônica "não gostei/nem desgostei". No entanto, os tratamentos 3 e 6 classificaram-se como "gostei moderadamente".

Em estudo com queijo Cheddar, LAW et al. (1993) observaram o aumento da proteólise ao longo do armazenamento atribuído a presença da cultura starter de *L. lactis*. Os autores consideraram que as enzimas proteinases do *starter* presente, juntamente com o coalho, possivelmente seriam os responsáveis pelo aumento dos peptídeos no queijo. Desta forma, o substrato para a ação das enzimas peptidases da

bactéria *starter* torna-se mais abundante, facilitando a produção de peptídeos menores e aminoácidos que contribuem para o *flavor* dos queijos.

MENÉNDEZ et al. (2000) também obtiveram a melhoria das características sensoriais de queijos Arzúa-Ulloa, através da redução do sabor amargo em relação ao queijo controle. Os autores utilizaram, individualmente, cinco cepas diferentes de *Lactobacillus*: *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudopantarum* (duas cepas) e *Lactobacillus casei* (cepa comercial) – conjuntamente à cultura *starter* composta de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*.

A textura pode ser definida como característica atribuída aos alimentos como resultado da combinação das propriedades físicas e químicas, e que são percebidas pelo sentido do tato, visão e audição, sendo considerado um fator de extrema importante na qualidade de muitos produtos lácteos (CHUNG e MEULLENET, 2001).

Em relação a textura (Tabela 13) no 30 dia de maturação dos tratamentos 1, 5 e 6 apresentaram as maiores pontuações (7,17 a 7,51) não diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ), sendo como classificação pela escala hedônica ao “gostei moderadamente”. No entanto, os tratamentos 3 e 4 apresentaram as menores médias, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento 1 (controle) e classificaram-se como “gostei ligeiramente” e “não gostei/ nem desgostei”, respectivamente.

Em relação ao 45° e 60° dia de maturação, somente o tratamento 4 (cultura e 0,2% de extrato) diferiu estatisticamente do tratamento 1, sendo atribuído as menores pontuações pelos provadores.

A proteólise que ocorre durante o armazenamento dos queijos é a responsável direta pelas modificações de textura dos queijos, devido à quebra na sua matriz protéica, que contribui significativamente no desenvolvimento do sabor (FOX et al., 2000; BURITI et al., 2005) este comportamento reflete o desenvolvimento esperado da maturação dos queijos.

Segundo LAWRENCE et al. (1987) o desenvolvimento da textura em queijos esta diretamente relacionada com o pH e a relação entre as  $\alpha$ -caseínas intactas e a umidade. Os autores relataram uma boa correlação entre a firmeza de um queijo e da quantidade de  $\alpha$ -caseína presente.

A hidrólise da caseína pelo coalho residual retido na massa e pela plasmina promove a mudança da textura na matriz protéica, proporcionando o amaciamento do queijo. Os produtos desta hidrólise são grandes e pequenos peptídeos e aminoácidos, precursores dos compostos que contribuirão para o sabor do produto (FOX et al., 2000).

Os principais defeitos na textura incluem aumento da firmeza, dureza e elasticidade. A textura é considerada uma característica importante usada principalmente para diferenciar e classificar as variedades de queijos e é considerada pelos consumidores como uma referência na qualidade e preferência global (BANKS, 2004; KEALY, 2006).

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 Conclusões

- O percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração de extrato adicionado atingindo 99,17 % de atividade antioxidante para a concentração 750 µg/mL.

- A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado forneceu um IC<sub>50</sub> de 234,48 µg/mL. Esta atividade antioxidante pode ser considerada boa, apresentando a mesma ordem de grandeza de atividade de extratos de diversas outras espécies.

- As formulações de queijo Prato apresentaram valores de rendimento dentro da faixa considerada aceitável para este tipo de queijo.

- Com relação a cor objetiva o queijo Prato com adição de 0,1 e 0,2 % de extrato de erva-mate, quando comparados com as formulações que não receberam a adição de extrato, após o 1º dia de armazenamento foram constatados valores superiores para a cromaticidade a\* e b\*, enquanto que menores para o L\*. Fato atribuído principalmente, pela adição do corante de urucum o qual sofreu sinergismo com o extrato de erva-mate.

Os queijos - Tipo Prato foram classificados como queijos de alta umidade (49 a 53 %),

- O pH do 1º para o 30º dia de armazenamento reduziu seus valores em todos tratamentos. Já no 60º dia de armazenamento ocorreu aumento do pH indicando a ocorrência de proteólise pela ação das enzimas presentes, favorecendo o desenvolvimento das culturas adjuntas adicionadas.

- Os queijos adicionados de culturas adjuntas e extrato de erva-mate apresentaram pH médio de 5,15 após 60 dias de maturação a 15°C estando este valor abaixo do pH considerado típico para este tipo de queijo. Este fato deve-se a adição

das culturas adjuntas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *cremoris*) e também pode ser atribuído a adição de extrato de erva-mate que apresentou pH em torno de 5.5.

- A adição do extrato de erva-mate no queijo Prato pode ter dificultado o crescimento das bactérias lácticas durante a maturação, pois nos tratamentos 5 (0,1 % de extrato) e 6 (0,2 % de extrato) apresentavam número maior de colônias de bactérias lácticas no primeiro dia de armazenamento, quando comparados ao tratamento 1, sendo esta diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Após esse período a contagem de bactérias lácticas nos tratamentos 5 e 6 foram inferiores aos demais tratamentos.

- Os tratamentos 3 (cultura e 0,1% de extrato) e 4 (cultura e 0,2% de extrato) não apresentaram diferença significativa na contagem de culturas adjuntas quando comparadas ao tratamento 2 (cultura adjunta mista), demonstrando assim que o extrato de erva-mate não apresentou atividade antimicrobiana frente a estes microrganismos.

- Durante o armazenamento todas as formulações apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores de TBARS quando comparadas ao tratamento controle (sem adição de extrato e sem adição de culturas adjuntas), comprovando a ação antioxidante da presença do extrato da erva mate no produto.

- A presença de extrato de erva mate influenciou significativamente na oxidação de proteínas ( $p < 0,05$ ). Na concentração de 0,2 % de extrato ocorreu redução da concentração de carbonil, indicando assim que nesta concentração o extrato pode ter exercido ação antioxidante frente à oxidação de proteínas.

- Para o atributo aceitação geral o tratamento 5 aos 30 e 45 dias de maturação sobressaiu-se aos demais tratamentos apresentando aceitação geral no histograma de frequência de 81,44 e 80,77%, correspondendo na escala de pontuação ao gostei muito, respectivamente.

- Em relação ao atributo sabor no 45º dia houve um decréscimo nos valores médios em todos os tratamentos com exceção dos tratamentos que não continham extrato de erva-mate na sua formulação (Tratamento 1 e 2). O decréscimo deve-se ao fato de que a maioria dos provadores detectaram sabor residual amargo pronunciado

aos 45 dias de maturação. Um dos fatores que podem ter influenciado nessa redução é que os referidos tratamentos continham extrato de erva-mate o qual pode ter influenciado no quesito sabor.

- Em relação à textura, observou-se que no 30º dia de armazenamento, os tratamentos 5 (0,1% extrato) e 6 (0,2% extrato) apresentaram as maiores pontuações (7,17 a 7,51) não diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) sendo como classificação pela escala hedônica ao “gostei moderadamente”.

## **5.2 Sugestões para trabalhos futuros**

- Realizar ensaios *in vivo* do extrato de erva-mate para avaliar os efeitos do consumo do queijo prato com adição de extrato de erva-mate e culturas adjuntas;
- Obter o extrato de erva-mate por liofilização para evitar possíveis alterações na composição química;
- Formulações de queijo prato sem adição de corante e com adição de extrato de erva-mate;
- 
- Avaliar a influencia da adição de extrato de erva-mate e características de proteólise do queijo;
- Treinamento dos provadores para análise sensorial.

## 6 REFERÊNCIAS

AARDT, M.V. Controlled Release of Antioxidants via Biodegradable Polymer Films into Milk and Dry Milk Products. Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Food Science and Technology. November 21, Blacksburg, Virginia, 2003.

ADEGOKE, G. O. *et al.* Antioxidants and lipid oxidation in foods: A critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v.35, n.4, p.283-298, 1998.

AUGUSTO, M, M, M. Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato. Campinas – SP, 2003. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2003.

ARAÚJO, J.M.A. Química dos Alimentos - Teoria e prática. 2ª ed. Viçosa: UFV, 1999. 416p

ARAÚJO, J.M.A. Oxidação de lipídios em alimentos. **Química de alimentos- Teoria e prática**, 3 ed, Viscosa- MG: Editora UFV, 2005, cap 1, pág. 1- 65.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17.ed. USA, 2000.

ATROSHI, F; RIZZO, A; WATERMARCK, T; ALI-VERHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2003.

AYNIES, L. E. et al. Interactions between lipids and milk proteins in emulsion, **Journal food Science**, v. 57, p. 883-886, 1992.

BANKS, J. M. The technology of low-fat cheese manufacture. **International Journal of Dairy Technology**. Huntingdon. v. 57, n. 4, p.199-207, 2004.

BARANOWSKI, J. D; NAGEL, C. W. Antimicrobial and antioxidant activities of alkyl hydroxycinnamates (alkacins) in model systems. **Canadian of Institute Food Science and Technology Journal**, v.17, p. 79-85, 1984.

BARROS, C. M. V. Uso de culturas adjuntas e ultrafiltração para melhoria de sabor e textura de queijo prato com reduzido teor de gordura. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. Campinas-SP, 2005.

BASTOS, D, H. M; OLIVEIRA, D. M; MATSUMOTO, R. L. T; CARVALHO, P. O; RIBEIRO, M. L. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, n. 1, p. 7- 46, 2007.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P.O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**. v.12, p. 423–432, 2007b.

BATIFOULIER, F., Y. MERCIER, P. GATELLIER, AND U. M. RENERRE. Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. *Meat Sci*. 61:389–395. 2002.

BISTRÖM, M.; NORDSTRÖM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 372 – 379, 2002.

BOBBIO, P. A. BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. Ed. Varela, 2ª ed. 1992.

BOHN, T.; WALCZYK, T. Determination of chlorophyll in plant samples by liquid chromatography using zinc-phthalocyanine as an internal standard. **Journal of Chromatography**, v. 1024, p. 123-128, 2004.

BOZKURT H.; BAYRAM, M. Colour and textural attributes of sucuk during ripening. **Meat Science**, v. 73, n. 2, p. 344–350, 2006.

BLOMHOFF, R.; CARLSEN, M. H.; ANDERSEN, L. F.; AND JACOBS JR, D. R. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. **British Journal of Nutrition**, v. 96, Suppl. 2, S52–S60, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemical**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Portaria n.º 358, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, jun. 1997. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 05 de janeiro de 2009a.

BRASIL. Portaria n.º 146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos. O Ministério de Estado da Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária institui: **Regulamento técnico de identidade e**

**qualidade de queijos.** Diário Oficial da União, Brasília, 11 março, 1996. Seção 1. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 05 de setembro de 2009b

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos. 4. ed. Brasília, DF, p. 1018, 2005.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279-1288, 2005.

CAMPOS, R. M. L.; HIERRO, E.; ORDÓÑEZ, J. A.; BERTOL, T. M.; TERRA, N. N.; HOZ, L. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1159–1167, 2007

CANTERLE, L, P. Erva mate e atividade antioxidante. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Santa Maria-RS, 2005.

CARBONARI, K. A. Avaliação do Potencial Antioxidante (*In vitro* e *In vivo*) e Antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Santa Catarina. 108p, 2005.

CARVALHO, P. R. Aditivos dos alimentos. **Revista LOGOS**, n. 12, p. 57-68, 2005.

CARVALHO, S. M. Efeito da adição de tocoferóis sobre a qualidade de óleo de soja embalado em pet. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro

de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos. Florianópolis – SC, 2007.

CHANDRA, S; MEJIA. E.G. Polyphenolic compounds antioxidant capacity and quinone reductase activity of aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinesnsis*) teas. **J Agric Food Chem** 2004, 52: 3583-3589.

CHUNG, W. K. & MEULLENET, J. F. Prediction of cheese texture attribute by fundamental rheological analyses using a stress controlled dynamic rheometer. In: IFT Annual Meeting, New Orleans, 2001.

CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**. v. 13, p. 329-336, 2002.

CICHOSKI, A. J.; STEFFENS, C. BERTOLDI, C. Bactérias lácticas e mesófilas, lactose, acidez, pH, atividade de água, umidade e cloretos em queijo prato elaborado com leite semidesnatado concentrado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, n. 355, p. 12-19, 2007.

COLOMER, M. F. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenolicos. Tesis presentada o Programa de Doctorado em la Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, 2003.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCIA-VALLEJO, M. C.;SIMÓN, B. F. Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different spanish provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 8, p. 3166-3171, 1998

COUPLAND, J.N.; MCCLEMENTS, D.J. Lipid oxidation in food emulsions. **Trends in Food Science and Technology**, V. 7, n.83, p. 34-38, 1996.

COSTA, R.G.B.; LOBATO, V.; ABREU, L. R. Aspectos físico-químicos do queijo prato submetido á saga em salmoura estática e com agitação. **Revista Instituto Laticínios “Candido Tostes”**, v. 59, n. 344, p.3-15, mai-jun. 2005.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science and Technology**. v. 9, p. 241-248, 1998.

DELLA VECHIA, C.; ZAGO, D.; SCHOFFEN, V.; KATSUDA, M. S. Avaliação química e físico-química do queijo tipo prato adicionado de bifidobacterim lactis durante a maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios, v. 60, n. 345, p. 268-271, 2005.

EFING, L. M. A. C. Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.). Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. Curitiba-PR, 2008.

EKLUND, P.C; LANGVIK, O. K; WÄRNA J. P., SALMI T. O., WILLFÖR, S. M. e SJÖHOLM R. E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **O r g. B i o m o l. Chemical**, n. 3, p.3336-3347, 2005.

ESKIN, M. N. A. Biochemistry of foods. 2 ed. London: Academic Press, p.557, 1990.

FARIA, M. G E BATISTA, I. Actividade antioxidante de hidrolisados proteicos de bacalhau, salmão e solha. Relatório Científico Técnico IPIMAR, n. 36, p.1-43, Lisboa, 2007. Série digital disponível em <http://ipimar-iniap.ipimar.pt>,

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial**. Campinas: ITAL/LAFISE, p.116, 2002.

FEDERATION INTERNACIONALE LE LAITIERE. FIL – IDF 5B: determinacion de la gordura, 1986.

FEREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijo. **Revista leite e derivados**, n. 76, p. 90-96, 2004.

FOSCHIERA, J. L. **Industria de laticínios**- Industrializacao do leite, análises e produção de derivados. Dezembro, 2004.

FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; COGAN, T. M. Glycolysis and related reactions during manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food in Science and Nutrition*, v.29, n.4,p.237-253, 1990.

FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg Maryland: An Aspen Publication, Inc. 587p. 2000.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

FURTADO, M.M.; AMORIM, A.C.B. Os pioneiros laticinistas dinamarqueses e a história do queijo Prato – Parte 1. *Indústria de laticínios*, São Paulo, v.4, n.25, p.18-22, 2000.

FURTADO, M. M. A formação de olhaduras em queijos semiduros através da fermentação de citratos. **Revista indústria de laticínios, São Paulo**, p. 32-39, jul./ago. 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos** São Paulo; Editora Atheneu, p.187, 2005.

GALLINA, D. A.; BARROS, C. M. V.; VIOTTO, W. H. Aceitação sensorial do queijo prato light com *Lactobacillus* como cultura adjunta. **Anais XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de alimentos**, p. 3006-3010, Porto Alegre – RS e CD-Rom com ISBN: 85-89123-01-4, 2002.

GARDE,S; TOMILLO,J; GAYA, P; MEDINA,M AND NUÑ EZ, MANUEL. Proteolysis in Hispánico Cheese Manufactured Using a Mesophilic Starter, a Thermophilic Starter, and Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* INIA 415 Adjunct Culture. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3479-3485, 2002.

GATELLIER, P.; GOMEZ, S.; GIGAUD, V.; BERRI, C.; BIHAN-DUVAL, E.L.; SANTE´LHOUTELLIER, V. Use of a fluorescence front face technique for measurement of lipid oxidation during refrigerated storage of chicken meat. *Meat Science*, v. 76, n. 3, p. 543-547, 2007.

GODON,J, CHOPIN, M.C, AND EHRLICH, S.D. Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis Genes in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. **JOURNAL OF BACrERIOLOGY**, p. 6580-6589 Vol. 174, No. 20, Oct. 1992.

GONZÁLEZ, L; SANDOVAL,H SACRISTÁN, N; CASTRO, J. M; FRESNO, J. M E TORNADIJO, M. E. IdentifiWcation of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control** n. 18 (2007) 716–722

GONÇALVES, A. I.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Biol.**, v. 72, n.3, p. 353-358, jul./set. 2005.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSN, B.J.F. Food Antioxidants, London: Elsevier Applied Science, p.1-18. 1990.

GUGLIUCCI, A and STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical Mol Biol Int**, v. 35, p.47-56, 1995.

GUTIÉRREZ, J.R.V. Dano oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana medicina**, v.31,n. 2, p.126-133, 2002.

GUTIERREZ, E. M. R.; DOMARCO, R. E.; SPOTO, M. H. F.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 596-601, 2004.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE J.M.C; CROSS,C.E Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? **J Lab Clin Med**, n. 119, p.568-620, 1992.

HECK, C.I. AND MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*):A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **JOURNAL OF FOOD SCIENCE**, Vol. 72, Nr. 9, 2007.

HENRIQUE, V.S. M. Comportamento da fase aquosa e efeito do pH sobre a proteólise e propriedades funcionais do queijo prato. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. Campinas-SP, 2004.

HERNÁNDEZ, E. R. S e GUZMÁN, I. V. Revision: Alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 53, n° 4, p.333-346, Veracruz, México, 2003.

HOWELL, N. K.; HERMAN, H.; LI-CHAN, E. C. Y. Elucidation of protein-lipid interactions in lysozyme – Corn oil system by fourier transform raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1529-1533, 2001.

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L. Lipid oxidation in biological and foods system. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, p. 5-63, 1996.

JACQUES, R.S . Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): Aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Química da UFRGS como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Porto Alegre-RS, 2005.

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

KUMAR, S; PEDERSEN- WISMER, J; CASPERSEN, C. Effect of raw materials deboning methods of chemical additives on microbial of mechanically deboned poultry meat during frozen storage. **Journal of Food Science and technology**, v. 23, n. 4, p. 217-220, 1986.

LAW, J.; FITZGERALD, G. F.; UNIACKE-LOWE, T.; DALY, C.; FOX, P. F. The contribution of *Lactococcal* starter proteinases to proteolysis in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 2455-2467, 1993.

LAWRENCE, R.C., CREAMER,L.K., and GILLES, J. Texture Development During Cheese Ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1748 -1760, 1987

LEAL, E.S; OKADA, F. M; ZAMORA, P. P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 31, n. 7, São Paulo, 2008.

LEVINE, R. L.; REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 357–363, 1990.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARZIALI, A. S.; NG-KWA-HANG, K. F. Effects of milk composition and genetic polymorphism on cheese composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 10, p. 25333-25420, Oct. 1986.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch. Latinoam. Nutr.** v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MARTINEZ, J. I. S. Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis presentada DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL (Área de Microbiología) da UNIVERSIDAD DE OVIEDO para optar al grado de Doctor , Villaviciosa, 2005.

MATSUMOTO, R.L.T. Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo em Saúde Pública para fins da Obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. São Paulo-SP, 2008.

MATTILA-SANDHOLM T.; MYLLARINEN P.; CRITTENDEN R.; MOGENSEN G.; FONDEN R.; SAARELA M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MCSWEENEY, P L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy technology**, v. 57, n. 2 3, p. 127-144, 2004.

MELLO, E.A; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 36,n, 1, p. 1-11, jan-jun, 2002.

MENÉNDEZ, S.; CENTENO, J. A.; GODÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Effects of *Lactobacillus* strain on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.59, p.37- 46, 2000.

MICHIDA, H.; TAMALAMPUDI, S.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 73-78, 2006.

MILANI, L. I. G. et al. Antioxidantes e antimicrobianos naturais para carne mecanicamente separada de frango. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, CAMPINAS. **Anais...** Campinas, 2001. p.122.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, PR, VAN, TA.; Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts **Food Chem** 2004; 85:231-237

MIRANDA, D. D. C; ARÇARI, D. P; PEDRAZZOLI JR, J; CARVALHO, P. O; CERUTTI, S. M; BASTOS, D. H. M AND RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, p. 1- 5, 2008.

MORENO, I; LERAUER, A. L. S; LEITÃO, M. F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, vol. 30, n 2, apr.- jun. 1999.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

MURTAUGH, A. M; MA, K; BENSON, J; CURTIN, K; CAAN, B; SLATTERY, M. L. Antioxidants, Carotenoids, and Risk of Rectal Cancer. **American Journal of Epidemiology**, V.159, n° 1, p. 32-41, 2004.

NARIMATSU, DORNELLAS, J. R. F; SPADOTI, L. M; PIZAIA, P. O e ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e derretimento do queijo prato obtido por ultrafinação. **Ciência e tecnologia de alimentos**, V.23 (supl), pag. 177-182, Campinas-SP, dez de 2003.

NASCIMENTO, M. S. Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL. Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. Campinas-SP, 2007.

NETTO, L. E. S. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v.24 n.1-4 São Paulo jan./dez. 2001.

OLIVEIRA, M. S; DORS, G.C; SOARES, L. A. S; FURLONG, E. B. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alim. Nutr**, v.18, n° 3, p. 267-275, jul / set, 2007.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos fundamentos tecnológicos**. 2 ed. São Paulo: Editora da UNICAMP, 146p, 1986.

OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. Carnes: no caminho da pesquisa. 2 ed. Cocal do Sul: Imprint, 155p, 2002.

PADILHA, A.D.G. Antioxidante natural da erva-mate na conservação da carne de frango *in vivo*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Carnes, da

Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria, RS, 2007.

PEARSON, A. M; GRAY, J . I; WOLZAK, A . M and HORESTEIN, N. A . Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food technology**, v. 27, n. 7, p. 121-129, 1983.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n.2, São Paulo, mar/abr,2004.

PENNA, A. L. B. Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – UNESP/ São José do Rio Preto – São Paulo. **Avaliação da Maturação do Queijo prato, Anais do XIX Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora – MG, 2002.

PIEADADE, K. R. Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de files de sardinha (*Sardinella brasiliensis*). Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Piracicaba-SP, 2007.

PIZAIA, P. D.; SPADOTI, L. M.; NARIMATSU, A. Composição, proteólise, capacidade de derretimento e formação de “blisters” do queijo mussarela obtido pelos métodos tradicional e de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.485-491, 2003.

PLATERO, A.M. M. Estudio polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados com m leche cruda de cabra. Tesis presentada a Univeisidad de Granada, Departamento de Microbiologia da Facultad de Ciencias para optar al grado de Doctor, Granada, 2008.

PRECI, D. **Extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em iogurte light tradicional e probiótico.** Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2010.

RAHARJO, S.; SOFOS, N. J.; SCHIMIDT, R. G. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C<sub>18</sub> method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 40, p.2182 – 2185, 1992.

RAMALHO, V.C E JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, V. 29, n° 4, p-755-760, 2006.

RAMARARHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

REITER, R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; TAN, D.X.; BURKHARDT, S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. **Ann N Y Acad. Science**, v.939, p.200-215, 2001.

RIBEIRO M. A.; ESQUÍVEL, M. M., GIL, M,G, B. A Extração Supercrítica e os Antioxidantes Naturais. **DOSSIER COMUNICAÇÕES-QUÍMICA**, 2007.

RIVELLI, D. P; SILVA, V. V; ROPKE, C. D; MIRANDA, D. V; ALMEIDA, R. L; SAWADA ,T. C. H; BARROS, S. B. M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.

ROSA, T.D. Atividades proteolíticas e microrganismos envolvidos na maturação do queijo serrano. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia celular e molecular da Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul para obtenção do título de Doutor em Biologia celular e molecular, Porto Alegre, 2005.

ROTTA, R.B. Estudo da atividade da enzima glutathione peroxidase em carne de frango. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional e Integrada do Alto Uruguai e das Missões para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. Erechim, RS. 2007.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉM, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SALDANHA, L.A. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. São Paulo-SP, 2005.

SANCHEZ-RODRIGUES, M. E. *et al.* Parametros de color del Jamon Iberico de Bellota D. O. Guijuelo al final del periodo de maduracion. **Alimentaria**, p. 33-39, 2001.

SANTOS, K. A. Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hill.) em embalagens plásticas. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

SARKER DK, WILDE PJ AND CLARK DC. Control of surfactant-induced destabilization of foams through polyphenol-mediated protein-protein interactions. *J Agric Food Chem* 43: 295-300, 1995.

SCHWARTZ, S.J.; LORENZO, T.V. **Chlorophylls in foods**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 1-17, 1990.

SCHINELLA G. R; TROIANI, G; DAVILA, V; BUSCHIAZZO,P.M; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects an aqueous extract of *ilex paraguariensis*. **Biochem. Biophys. Research**, v.269, p. 357-360, 2000.

SCOTT, R. **Fabricación de Queso**. 2.ed. Espanha: Editora Acríbia S.A, 1991. 520 p.

SGARBIERI, V. Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas.In: SGARBIERI, V. **Proteínas em alimentos protéicos - propriedades, degradações e modificações**. São Paulo-SP: Varela Ltda, 1996, cap.5, p. 387-515.

SIES, H. *Review: Strategies of antioxidant defense*. **Europe journal biochemical**, n° 215, p. 213-219, February 10 /March 16. Germany, 1993.

SILVA, F. A.M; BORGES, M.F.M; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, V. 22, n°1, p. 94- 103, 1999.

SILVA, C. R. B., NABUCO, A . C; MORETTI , B. R, PENNA, A. L. B. Efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Prato. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.3, n.65, p. 199-203, 2006.

SILVA, F.A. Avaliação tecnológica e antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Illex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate). Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre -RS, 2007.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n. 6, p.1340-1347, 2003.

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

SOUSA, C. M. M; SILVA, H. R; VIEIRA-JR, G. M; AYRES, M. C.C; COSTA, C. L. S; ARAÚJO, D. S; CAVALCANTE, L. C. D; BARROS, E. D. S; ARAÚJO, P. B. M; BRANDÃO, M. S. e CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, Vol. 30, No. 2, p- 351-355, 2007.

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

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. Avaliação sensorial de queijo prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.705-712, Campinas, out/dez, 2005.

TANG, S. Z. *et al.* Antioxidative effect of dietary tea catechins on lipid oxidation of long-term frozen stored chicken meat. **Meat Science**, v. 57, p. 331-336, 2001.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, Campinas, 2006.

TIJSKENS, L.M.M.; BARRINGER, S.A.; BIEKMAN, E.S.A. Modelling the effect of pH on the colour degradation of blanched broccoli. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, p. 315-322, 2001.

TORRES, E.A.F.S; RIMOLI, C.D; OLIVO R; HATANO, M.K e SHIMOKOMAKI; M. Papel do sal iodado na oxidação lipídica em hambúrgueres bovino e suíno (misto) ou de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.18,no.1, Campinas Jan./Apr. 1998.

TRINDADE, R.A. Influência de antioxidantes naturais sobre o perfil lipídico de hambúrgueres bovinos submetidos á irradiação por  $^{60}\text{CO}$  e aceleradores de elétrons. Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações. São Paulo-SP, 2007.

TRINDADE, M. A ; FELÍCIO, P. E. de; CASTILIO,C. J.C. Estabilidade oxidativa e microbiologica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante periodo de armazenamento a 18 C. **Ciencia e tecnologia de alimentos**, V.28, n.1, p.160-168, 2008.

VALDUGA, A. T. Uso sustentado e processamento da *Ilex paraguariensis* St. Hil (Erva-mate). Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Concentração em Ecologia e Recursos Naturais. São Carlos-SP, 2002.

VALDUGA, A. T., CICHOSKI, A. J., MORGAN, F. **logurte com leite desnatado e extrato de erva-mate, evolução da cultura pura adicionada.** Revista Higiene Alimentar, v. 22, n. 162, p.77 – 82, 2008.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Queso In: **Leche y productos lácteos.** Espanha: Editorial Acribia, S.A. Zaragoza 1995. p. 291 364.

VÁZQUEZ, M. R; EL-BACHÁ, R. S; ORDÁS, C. Á; RIBEIRO, E. B; VICENTE, J. G. V; RODRIGUES, L. E. A. Dieta afro-bahiana, estrés oxidativo y ejercicio físico. **Revista de Nutrição.** V.19 n° 6. Campinas nov./dez. 2006

VIANNA, P. C. B. Efeito da contagem de células somáticas do leite sobre a microbiota de maturação e características sensoriais do queijo Prato. Campinas-SP 2006. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Campinas –SP, p. 71, 2006.

VILELA, A. L. M; RESCK, I. S; GRISOLI, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n° 4. São Paulo-SP, 2008

VILJANEN, K. Protein oxidation and protein-lipid interactions in different food models in the presence of berry phenolics. ACADEMIC DISSERTATION. To be presented, with the permission of the Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, for public criticism in lecture hall B3, Viikki, on October 7<sup>th</sup> 2005. University of Helsinki.

WALSTRA, P., NOOMEN, A., GEURTS, T. J. Dutch – **Types Varieties.** In: Fox, P. F. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 2. ed. Aspen Publishers Inc. Maryland. p. 39 – 82,1999.

WANASUNDARA, U. N; SHAHIDI,F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v. 63, p. 335-342, 1998.

WONG, D.W.S. Proteínas. In. WONG, D.W.S. **Química de los alimentos: Mecanismos y teoría**, Zaragoza, Espana: Acribia,S.A. 1995, cap.2, p. 53-109.

WOLFSCHOON-POMBO, A. L.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 44, n. 261-266, p. 50-52, 1989.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. European, **Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, p. 752–767, 2001.

WITSCHI, H. & LOCK, S. Toxicity of butylated hydroxy toluene in mouse following oral administration. **Toxicology, Shannon**, v. 9, p.137-46, 1978.

ZAMORA, R.; ALAIZ, M.; HIDALGO, F. J. Contribution of pyrrole formation and polymerization to the nonenzymatic browning produced by amino-carbonyl reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3152-3158, 2000.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 5165- 5170, 2001.

ZIELISKI, H; KOZOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000; 48; 2000-2008.

## 7 APÊNDICE A

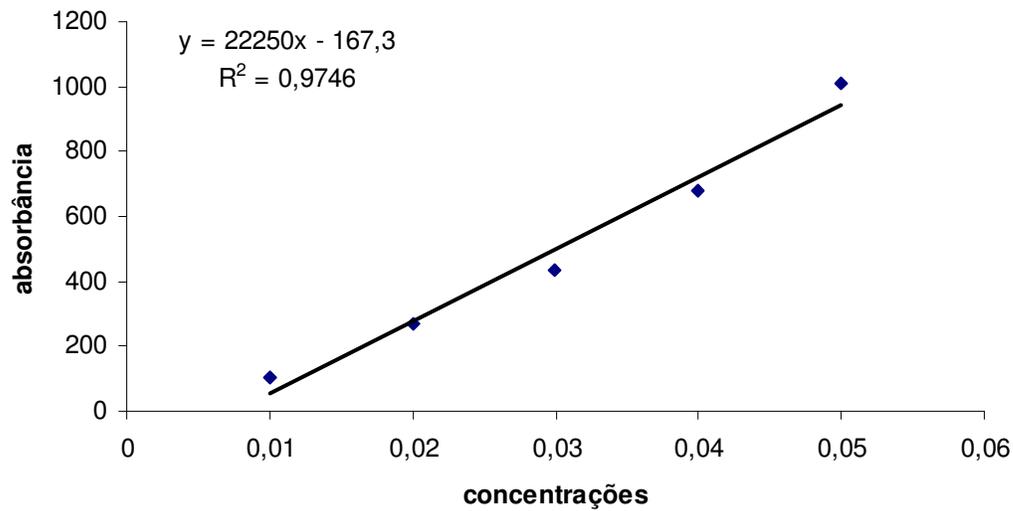


Figura 1- Curva de calibracao teor de polifenóis

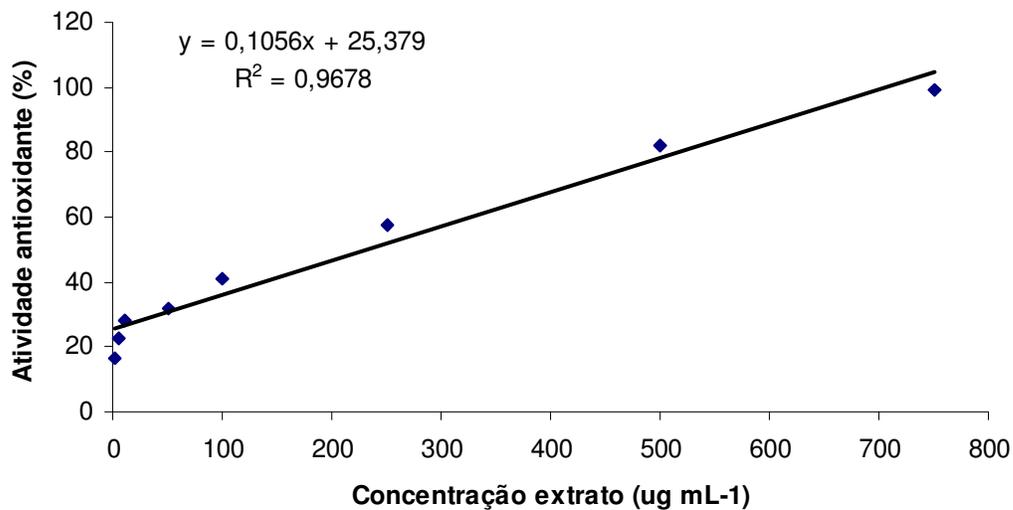


Figura 2 – Curva de calibração da atividade antioxidante do extrato de erva-mate.