

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

**EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM IOGURTE LIGHT
TRADICIONAL E PROBIÓTICO**

DAIANE PRECI

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
FEVEREIRO DE 2010

**EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM IOGURTE LIGHT
TRADICIONAL E PROBIÓTICO**

DAIANE PRECI

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:

Rogério Luis Cansian, D.Sc.

Orientador

Helen Treichel, D.Sc

Orientador

Gean Delise Leal Pasquali Vargas, D.Sc

Débora de Oliveira, D.Sc

Erechim, Fevereiro 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.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante" Charles Chaplin.

OFEREÇO e DEDICO

A minha mãe Liane

Ao meu pai Valdir

As minhas irmãs Daciele e Dainara

Ao meu noivo Diogo

As pessoas que trazem alegria e incentivo a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Valdir Pommer Preci e minha mãe Liane Ilse Preci, que sempre me apoiaram e incentivaram na realização dos meus sonhos, as minhas irmãs Daciele Paola Preci e Dainara Katrine Preci pelo carinho de todos os dias, ao meu noivo Diogo Feliciano Prates Thorstenberg pela paciência, dedicação e companheirismo, pessoas estas que longe ou perto motivaram e motivam minhas escolhas, me encorajam nos momentos difíceis e me fazem acreditar no futuro.

Ao meu orientador Rogério Luiz Cansian e minha orientadora Helen Treichel, pela paciência, dinamismo e conhecimento transmitido.

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

Aos meus colegas de mestrado: Jamile, Roger, Mara e Elizandra pela amizade e confiança.

Às voluntárias: Naira e Anelise, aos bolsistas: Renata, Franciele, Roberto e Pablo, companheiros de longas horas de laboratório, sem eles jamais teria conseguido.

Ao pessoal dos laboratórios: Rogério, Madalena, Marcilaine, da central de materiais: Andi, Juliana, Rose e Vera que foram sempre prestativas (os) e me auxiliaram nos momentos de dificuldade.

E a Deus que sempre esteve ao meu lado.

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.

**EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM IOGURTE LIGHT
TRADICIONAL E PROBIÓTICO**

DAIANE PRECI

Fevereiro/2010

Orientadores: Rogério Luis Cansian
Helen Treichel

O comportamento no consumo de alimentos vem sofrendo mudanças significativas nos últimos anos, motivado por um maior nível de consciência dos consumidores para com a saúde. Por outro lado, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade requer a adoção de algumas medidas a fim de limitar o fenômeno de oxidação durante as etapas de processamento e armazenamento dos produtos, como a adição de compostos antioxidantes nos mesmos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo utilizar extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em iogurte light tradicional e probiótico, avaliando sua atividade antioxidante neste produto. Também foi avaliado o comportamento dos iogurtes formulados durante a vida de prateleira através de determinações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Observou-se que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração de extrato adicionado, atingindo 99,5% de atividade antioxidante para a concentração $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ e que a correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado forneceu um IC_{50} de $254,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. No 60º dia de armazenamento sob refrigeração, os iogurtes tradicional e probiótico com 0,1% de extrato e ambos com 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 MA/kg de amostra, comprovando a ação antioxidante da presença do extrato da erva mate no produto. A presença de extrato de erva mate não influenciou significativamente na oxidação de proteínas ($p < 0,05$) e as seis formulações seguiram o mesmo comportamento em relação ao pH. No decorrer do tempo de armazenamento, na medida em que ocorre o abaixamento do pH, a acidez aumenta para todos os tratamentos. Não se observou interferência do extrato de erva-mate nos valores de acidez e não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) na contagem das bactérias lácticas, de

maneira que o extrato de erva mate não afetou o desenvolvimento microbiológico. Por fim, na avaliação sensorial das formulações testadas, as menores médias dos atributos sabor e cor apresentadas na análise sensorial corresponderam às duas formulações que receberam adição de 0,25% de extrato em sua formulação.

SUMÁRIO

3. Material e Métodos.....	18
3.1 Obtenção do Extrato de Erva mate.....	18
3.2 Atividade antioxidante in vitro pela captura de radicais livres com o teste do DPPH...19	19
3.3 Elaboração do iogurte (açúcar de 6 a 8%, sorbato 0,05 a 0,1%, estabilizante 0,02 a 0,2%, leite em pó de 1 a 3%).....	20
3.4 Análises físico-químicas e microbiológicas.....	21
3.5 Análise Sensorial	24
3.6 Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Obtenção do extrato.....	25
4.2 Atividade Antioxidante in vitro.....	25
4.3 Oxidação dos Lipídeos.....	26
4.4 Oxidação das Proteínas.....	28
4.5 Reação de Maillard.....	29
4.6 Determinação do pH.....	32
No 30º dia de armazenamento o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate apresentou o maior valor de pH 3,81 diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais formulações, o iogurte tradicional com 0,25% de extrato apresentou o menor valor, pH 3,32 diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais iogurtes. Nesse dia foram obtidos os menores valores de pH para todos os tratamentos. MARTIN (2002) também observou diminuição de pH em iogurtes durante o período de 30 dias de armazenamento.....	34
4.7 Determinação da Cor.....	35
4.8 Determinação do Ácido Lático.....	40
4.9 Análise de Bactérias Lácticas	41
5. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
MARTIN, A. F. Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas. Escola superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Universidade de São Paulo. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Piracicaba. São Paulo. 62p, 2002. Dissertação.....	54

1. INTRODUÇÃO

O comportamento do consumo de alimentos vem sofrendo mudanças significativas nos últimos anos, motivado por um maior nível de consciência dos consumidores para com a saúde, via maior escolarização e maior acesso às informações (GEHLHAR e REGMI, 2005).

Neste contexto, os alimentos diet e light, muito antes de serem considerados alimentos para doença, são alimentos para saúde e se posicionam como uma possível solução para muitas necessidades dos consumidores. Estimativa do Ministério da Saúde mostra que a obesidade infantil atinge cerca de 20% das crianças no Brasil; além disso, um a cada dois brasileiros faz regime em algum momento de sua vida. Isso leva os produtos diet e light a

serem considerados um segmento em expansão, e por terem maior valor agregado gera um retorno financeiro maior para a indústria processadora do que os outros alimentos (ABIAD, 2004).

Dessa forma, a demanda por esses produtos tem crescido muito e tende a crescer ainda mais. Entre o ano de 1995 e 2005, o mercado de produtos diet e light subiu 870%, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais (ABIAD, 2009), enquanto que em 2009, a categoria Iogurtes cresceu 10,5% com os investimentos em linhas light e diet e o lançamento de embalagens econômicas (CENSO, 2009).

Por outro lado, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade requer a adoção de algumas medidas a fim de limitar o fenômeno de oxidação durante as etapas de processamento e armazenamento dos produtos, como a adição de compostos antioxidantes nos alimentos (SILVA et al., 1999). Segundo os mesmos autores isso vem estimulando a pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante.

Alimentos que possuem lipídeos em sua composição estão sujeitos à reação de rancificação. Esta é uma das reações mais importantes de deterioração da qualidade dos alimentos, alterando diversas propriedades, provocando formação de odores e sabores desagradáveis, perdas vitamínicas, destruição dos ácidos graxos, pigmentos e proteínas, características que contribuem para a depreciação do produto (BRASIL, 2002).

Neste contexto de inovação, aliada a nova tendência do aumento do consumo de alimentos saudáveis o presente trabalho tem por objetivo reunir, em um único produto de grande aceitação e consumo, os benefícios da presença de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em iogurte light tradicional e probiótico, avaliando sua atividade antioxidante neste produto. Também avaliar o comportamento dos iogurtes formulados durante a vida de prateleira através de determinações físico-químicas e microbiológicas.

O presente trabalho divide-se em uma breve revisão bibliográfica apresentada no Capítulo 2, seguida dos materiais e metodologias utilizadas, descritas no Capítulo 3. O Capítulo 4 apresenta e discute os resultados obtidos, seguidos das conclusões obtidas (Capítulo 5). As sugestões para trabalhos futuros, bem como o referencial teórico consultado estão nos Capítulos 6 e 7, respectivamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite e Iogurte

O leite é secretado pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos e, obtido em circunstâncias naturais, é uma emulsão de coloração branca, ligeiramente amarelada, possui odor suave e sabor adocicado (Valsechi, 2001). A água é constituinte majoritário do leite que apresenta quantidades variáveis de lipídeos, proteínas e carboidratos, sendo que pequenas quantidades de minerais também são encontrados (Varnam e Sutherland, 1994).

A gordura é um dos componentes mais ricos do leite e está presente na forma de glóbulos de diversos tamanhos que se encontram em suspensão na fase aquosa, formando uma emulsão relativamente estável. Os glóbulos são compostos por triglicerídios e cada um deles é envolvido por uma camada formada por um componente da gordura denominado fosfolípido. O leite de vaca possui aproximadamente 437 moléculas de ácidos graxos e entre os principais podem ser citados o ácido palmítico (C16:0) e o ácido oléico (C18:1). A gordura é o constituinte que mais sofre variações em razão da alimentação, raça, estação do ano e período de lactação (Behmer, 1979; Spreer, 1991; Albuquerque, 1997; Silva et al., 1997).

A composição do leite de vaca depende de muitos fatores, como a raça, a variabilidade do animal, a idade, fase de lactação, estações do ano, a alimentação, o tempo de ordenha, o período de tempo entre as ordenhas, condições fisiológicas do animal (tranquilo ou nervoso), bem como o que recebe de medicação (Potter, 1995). Possui em média 3,5% de proteínas, 3,8% de gordura, 5,0% de lactose, 0,7% de minerais (cinzas) e 87% de água. De todos os componentes do leite, a fração que mais varia é a formada pela gordura. Os sólidos não-gordurosos, que compreendem todos os elementos do leite menos a água e a gordura, representam em média 8,9% do total no leite (Behmer, 1979; Spreer, 1991; Rapacci, 2000). Os valores encontrados para composição do leite podem sofrer variações e dificilmente coincidem exatamente com os valores encontrados na literatura (Potter, 1995).

A legislação brasileira denomina leite, sem outra especificação, como sendo o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Brasil, 2002).

Por ser a matéria-prima de maior importância na fabricação de iogurtes e para que o produto final apresente características desejáveis e maior vida útil, o leite deve ser da mais alta qualidade, apresentar uma baixa contagem de células somáticas e bactérias que podem dificultar o desenvolvimento das culturas lácticas usadas no preparo do iogurte, ser livre de bacteriófagos, isento de soluções de limpeza, desinfetantes e contaminantes. As principais

constantes físico-químicas utilizadas para determinar a qualidade do leite são: o pH (a 20°C) que varia de 6,5 a 6,7; a acidez titulável de 15°D a 18°D; a densidade variando de 1,028g/mL a 1,036g/mL; e a temperatura de congelamento que pode variar de -0,510°C a -0,550°C (GOURSAUD, 1991).

O iogurte é o produto lácteo fermentado mais antigo. Embora não existam registros em relação à origem deste produto, acredita-se que deva ser mais antigo que a própria Bíblia, pois os povos nômades que habitavam as regiões montanhosas próximas ao Mediterrâneo, atravessavam o deserto transportando leite “in natura” em camelos, acondicionado em bolsas confeccionadas com pele de cabra, encontrando condições ótimas de temperatura para o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido láctico, obtendo um produto de sabor agradável que não se deteriorava com a mesma facilidade que o leite, sendo essa preparação transmitida de pai para filho (BRANDÃO, 2002).

O mercado brasileiro vem sofrendo mudanças devido ao crescimento do consumo de leite e derivados, aumento do consumo de produtos de maior valor agregado (caso do leite longa vida) e produtos mais nobres (queijos fino e iogurte, entre outros) (REZENDE, 2005). Nos últimos anos, os iogurtes e iogurtes suplementados são os produtos lácteos fermentados que apresentam maior consumo e popularidade (SPREER, 1991).

O potencial de crescimento do mercado de iogurte no Brasil é grande, mas apesar disso o consumo desse produto comparado ao de outros países ainda é baixo devido ao custo elevado do produto provocado pela alta carga tributária, sendo o consumo no Brasil cerca de 2Kg de produtos refrigerados per capita incluindo bebidas e sobremesas lácteas, enquanto que no Chile o consumo é de 8Kg ao ano, França 25Kg, Irlanda de 18Kg e Bulgária 31Kg de iogurte. A produção brasileira de leite passou de 10,2 bilhões de litros no ano de 1979 para 22,3 bilhões em 2003, um aumento de 119% (EMBRAPA, 2009).

Segundo GOMES (1997) citado por REZENDE (2005) as empresas brasileiras produtoras de derivados lácteos na tentativa de enfrentar a concorrência do mercado externo, vêm atuando em duas frentes: na diversificação da produção de derivados lácteos e priorização da redução de custos. Atualmente 68% do consumo total de lácteos líquidos correspondem aos países emergentes incluindo Paquistão, Oriente Médio, Brasil e China, uma recente pesquisa da Tetra Pak Dairy Index (2009) mostra que o consumo de lácteos resistiu à crise econômica mundial e deve crescer 1,3% este ano e deverá aumentar a uma taxa anual composta de 2,2% entre 2009 e 2012.

Os produtos lácteos fermentados e leites fermentados são produtos que se caracterizam pelo caráter ácido e textura típica, através de fermentação láctica e produção de aroma

(SPREER, 1991). A fermentação do iogurte é resultado da atuação das bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (VEISSEYRE, 1988).

O iogurte pode ser classificado em alguns tipos, conforme o processo de elaboração, adição de ingredientes, composição, consistência e textura. São eles (SÁ, 1978):

- **Iogurte tradicional:** coagulado nas embalagens individuais de venda a retalho.
- **Iogurte batido:** coagulado a granel e embalado posteriormente.
- **Iogurte líquido:** produto com muito pouca viscosidade e que se consome como substituto do leite.

O iogurte também pode ser classificado em três tipos segundo o aroma que apresentam (BRANDÃO, 2002):

- Iogurte natural: é o iogurte tradicional com seu típico sabor ácido acentuado;
- Iogurte com frutas: é produzido por adição de frutas, usualmente fruta natural, congeladas, purês, polpas, pedaços ou geléias de frutas;
- Iogurte aromatizado: preparado por adição ao iogurte natural, de açúcar e outros agentes adoçantes, saborizantes, corantes sintéticos e/ou isolado protéico de soja.

2.2 Alimentos funcionais

Nos últimos anos vem aumentando o número de consumidores que se preocupam com a saúde, e os mesmos vem optando por alimentos saudáveis e inovadores. Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimento que surgiu no Japão por volta de 1980 através de um programa de governo que visava à redução de custos seguro saúde através do desenvolvimento de alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (COLLI, 1998).

Os alimentos funcionais são definidos como alimentos ou ingredientes alimentares capazes de proverem benefícios à saúde, além de possuírem os nutrientes tradicionais requeridos (HALSTED, 2003). A procura por esse tipos de alimento estimulou o desenvolvimento de novos produtos pela indústria láctea a nível mundial (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

A indústria de laticínios está reagindo frente ao mercado consumidor cada vez mais exigente a fim de aumentar sua competitividade no segmento de produtos e manter a liderança tecnológica na indústria de alimentos (BRANDÃO, 2002; PUPIN, 2002). Este tipo de produto, na verdade, não é exatamente uma novidade, desde os anos 30 a empresa Japonesa Yakult já comercializava a bebida láctea contendo lactobacilos vivos para regular e estimular o funcionamento do intestino (MORAES e MESQUITA, 2007).

Este tipo de produto confere alguns benefícios de maneira a reforçar os mecanismos de defesa imunológico, prevenção ou tratamento de alguns tipos de doenças ou disfunção, retardamento do processo orgânico de defesa, melhoria das condições físicas e mentais e do estado geral de saúde (MORAES e MESQUITA, 2007).

As indústrias alimentícias vêm sendo estimuladas pela nova visão do mercado consumidor que busca no consumo de alimentos bem-estar e saúde a investirem em pesquisas utilizando novos componentes naturais e novos ingredientes (MATSUBARA, 2001). Foram publicados numerosos trabalhos científicos sobre os benefícios à saúde que os produtos lácteos promovem (MODLER et al., 1990; HUGHES et al., 1991; KURMANN e RASIC, 1991). Durante a década de noventa, os micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* ssp., passaram a ser mais utilizados em alimentos e fármacos (DAVE e SHAH, 1998). As indústrias de produtos lácteos são as que mais apresentam alimentos funcionais, destacando-se os iogurtes e outros produtos fermentados (ANTUNES et al., 2007).

2.2.1 Probióticos

Probióticos são micro-organismos que agem benéficamente no “hospedeiro”, melhorando o balanço microbiano intestinal, ajudando no controle de infecções intestinais; controlando os níveis de colesterol sérico; e melhorando a utilização da lactose em indivíduos intolerantes (KRASAEKOOPT et al., 2003). As bactérias ácido lácticas intestinais presentes nos seres humanos estão associadas com a saúde de seu hospedeiro, porque representam um importante fator de biodefesa, uma vez que previnem a colonização e a proliferação das bactérias patogênicas presentes no intestino (GOLDIN e GORBACH, 1992; NAIDU et al., 1999).

Para que os probióticos exerçam efeito benéfico ao organismo humano devem atender algumas exigências, como sobreviver à acidez do estômago quando ingeridos na forma oral (COLLINS et al., 1998).

Segundo BRASIL (2009) a quantidade mínima viável para os probióticos deve situar-se na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante onde valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. SGARBIERI e PACHECO (1999) mencionam que os probióticos devem estar presentes na quantidade de 10^6 microrganismos vivos por mililitro (10^6 /mL). A necessidade de monitoramento da sobrevivência do *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* em produtos fermentados foi

freqüentemente abandonada, resultando em vários produtos que chegaram ao mercado contendo poucas bactérias viáveis (ANONYMOUS, 1992; SHAH et al., 1995).

De acordo com KIM (1998) e O'SULLIVAN et al. (1992), citado por BISCAIA et al. (2004) atualmente é bastante comum a utilização de bactérias probióticas em produtos lácteos, devido aos efeitos benéficos proporcionados na redução dos efeitos da intolerância à lactose, atividade anticarcinogênica, possível diminuição do colesterol sérico. Além disso estudos buscam através da inativação do vírus HIV a possibilidade de utilização no tratamento auxiliar da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Em todo o mundo os produtos lácteos fermentados representam uma grande parcela da dieta humana (DAVE e SHAH, 1998). A tecnologia de elaboração dos diferentes tipos de leites fermentados é bastante parecida, diferenciando-se em relação ao tipo de cultivo iniciador utilizado, e no conteúdo de sólidos totais presentes no leite. Os cultivos iniciadores mais utilizados pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (VARNAM e SUTHERLAND, 1994).

Iogurtes e leites fermentados funcionais, além de possuírem grande aceitação pelo público em geral e apresentarem excelente valor nutritivo, são veículos em potencial para o emprego de probióticos (ANTUNES et al., 2007).

Os iogurtes fermentados com esses micro-organismos contêm pouca lactose, sendo adequados para pessoas que apresentam intolerância à lactose, além de agirem reduzindo a velocidade de entrada da lactose e glicose no sangue (VARNAM e SUTHERLAND, 1994).

O gênero *Lactobacillus* foi isolado pela primeira vez por Moro em 1900 a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno. Este investigador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais. As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier, sendo, em geral, caracterizadas por serem micro-organismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios (SGORBATI et al., 1995).

As espécies que integram o gênero *Bifidobacterium* conseguem proliferar num meio semi-sintético contendo apenas lactose, alguns aminoácidos (i.e. cisteína, glicina e triptofano), vitaminas, nucleotídeos e alguns minerais (HASSINEN et al., 1951). No que diz respeito ao *L. acidophilus*, os requisitos em nutrientes necessários para a exibição de taxas razoáveis de crescimento são semelhantes aos anteriormente referidos para *Bifidobacterium*: hidratos de carbono como fonte de energia, proteínas e respectivos produtos de degradação, vitaminas do complexo B, derivados dos ácidos nucleicos e minerais (p.ex. magnésio, manganês e ferro) (MITAL e GARG, 1992 apud GOMES e MALCATA, 2000).

2.2.2 Agentes Antioxidantes

Além dos probióticos, os antioxidantes também atuam como substâncias bio-ativas nos alimentos. Segundo SHAMI e MOREIRA (2004) uma substância antioxidante pode ser definida como um composto ou substância química que inibe a oxidação ou, qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo.

Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos. De acordo com BIRCH (2001) citado por DEGÁSPARI (2004), ambos antioxidantes naturais e artificiais apresentam similaridade quanto as suas funções, algumas dúvidas surgem quanto à salubridade de alguns antioxidantes comerciais sintéticos já que alguns estudos demonstraram o favorecimento de efeitos mutagênicos por parte desta categoria de antioxidantes.

A formação de espécies reativas de oxigênio e subsequente oxidação de moléculas biológicas constitui um mecanismo de dano tecidual presente em vários processos patológicos como inflamação, derrame, infarto do miocárdio, arteroesclerose, doença de Alzheimer e Parkinson e em alguns tipos de câncer (RICE-EVANS e DIPLOCK, 1992; OZBEN, 1998). Há bastante tempo sabe-se que a ação dos radicais livres pode ser controlada ou até mesmo evitada pela utilização de várias substâncias antioxidantes (YOUNGSON, 1995), sendo esta substância comumente utilizada para aumentar a estabilidade dos lipídeos (DECKER, 1998).

A partir do início dos anos 1980, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (MELO e GUERRA, 2002; SIMÃO, 1985; YILDRIM, MAVI e KARA, 2001; ZHENG e WANG, 2001). Compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes, e muitos estudos têm sido realizados na determinação da sua ação antioxidante (MANCINI-FILHO e VAN-VOIJ, 1998). Atualmente a planta erva-mate vem despertando interesse por pesquisadores em função de seus benefícios a saúde humana aliada à característica antioxidante.

2.2.3 Erva-Mate

No ano de 1836 iniciaram as investigações químicas da composição da erva-mate, encontrando-se a presença de inúmeras substâncias resinosas, entre elas, matéria corante amarela e ácido tânico. Em 1944, os compostos, água, celulose, dextrina, glicose, legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido cafêico, ácido virídico, clorofila e colessterina foram identificados (VALDUGA, 1995). Na análise de identificação dos compostos fitoquímicos realizado por ANDRADE (2004), o autor encontrou em amostras de erva-mate resultados satisfatórios de compostos como cafeína, tanino, teobromina, teofilina, rutina, quercetina, isoquercetrina, ácidos mono-cafeoil-quínicos (mono-CQA) e di-cafeoilquínicos (di-CQA).

Muitos benefícios à saúde humana podem ser gerados através do conhecimento da composição quantitativa e qualitativa dos compostos bioativos constituintes de bebidas à base de erva-mate (BASTOS e TORRES, 2003). Ainda não existe padrão de qualidade de sabor e aroma para a erva-mate, para seus produtos como erva-mate verde e chá-mate, não foram identificados à variação do perfil de compostos voláteis, nem mesmo se sabe da contribuição odorífera dos compostos voláteis presentes nas bebidas com os seus descritores. Em chá-mate, MACHADO et al. (2007) encontraram compostos majoritários como isômero do 2,4heptadienal (13%), 5-metilfurfural (9 %), 2,4heptadienal (8 %), z-óxido de linalool (5 %), t-óxido de linalool (5 %), enquanto que o chimarrão apresentou linalool (57 %), a-terpineol (12 %) e acetato de dihidrocaveol (7 %).

Segundo GNOATTO et al. (2007), a literatura de modo geral menciona que erva-mate possui teores elevados de cafeína, mas, além disso, a planta também apresenta elevados teores de teobromina. Os autores encontraram alto teor de teobromina, demonstrando que a metodologia de extração influencia diretamente o teor de metilxantinas em erva-mate. Os resultados de REGINATO et al. (1999) indicam que a acumulação de cafeína e teobromina é, até o momento, uma característica única de *I. paraguariensis*.

O uso da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) como bebida tônica e estimulante já era conhecido pelos aborígenes da América do Sul, sendo suas propriedades estimulantes largamente conhecidas (VALDUGA et al., 2003).

ASSOLINI et. al. (2006) verificaram que extratos aquosos da macela, alecrim, erva-mate e malva apresentaram maior atividade antioxidante (acima de 97%) entre os chás analisados (arruda, camomila, alcachofra, tanchagem, sálvia, capim-limão).

O processamento industrial reduz significativamente o teor de cafeína da erva-mate, comprovando que o emprego de altas temperaturas levam a alterações físico-químicas da erva-mate (ESMELINDRO et al. 2002).

Baseados na composição da erva-mate e no grande consumo do produto principalmente na região Sul do Brasil, muitas pesquisas envolvendo essa planta estão sendo realizadas. RODRIGUES (2009) constatou que o uso contínuo de chá-mate durante 60 dias, promoveu uma redução significativa dos níveis de estresse oxidativo ao DNA, indicando uma possível proteção em voluntários humanos após a ingestão de chá-mate. Enquanto que MORAIS et al. (2009) verificaram que a ingestão de infusão de erva-mate em indivíduos dislipidêmicos (aumento anormal da taxa de lipídios no sangue) melhorou os parâmetros de metabolismo energético e lipídico, enquanto que indivíduos hipercolesterolêmicos (nível elevado de colesterol no sangue) em tratamento com estatinas (lipoproteínas), apresentaram uma redução adicional do LDL colesterol,

CANTERLE et al. (2005) verificou que a erva-mate na forma de chimarrão possui uma importante quantidade de compostos 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 em diferentes extratos de erva-mate (verde e tostada) e de chá verde, elevada atividade antioxidante, indicando o potencial uso dessas ervas como antioxidantes alimentícios.

Estudos também apontam alguns riscos que a ingestão de erva-mate na forma de chimarrão ou chá podem trazer à saúde. Segundo PINTO et al. (1994) independente de fatores de risco como consumo de álcool e fumo, cerca de 20% dos casos de câncer de esôfago ocorridos na região sul e sudeste da América do Sul correspondem ao consumo de chimarrão. JOTZ et al. (2006) verificaram que a ingestão da erva-mate preparada com água quente no modelo padrão do chimarrão tradicional e ingerida na temperatura ambiente por ratos, provocou perda de peso dos animais, além de ter afetado o trato aerodigestivo superior dos mesmos. Segundo VICTORA et al. (1987) citada por JOTZ et al. (2006), a associação de altas temperaturas e os componentes carcinogênicos presentes nos extrato potencializa a ação de outros carcinógenos ingeridos.

De acordo com PASQUALI et al. (2008) os resultados histológicos de ratos permitem sugerir lesão hepática e renal do extrato bruto de *Ilex paraguariensis* na dose de 250mg/Kg, enquanto que na dose de 500mg/Kg de extrato bruto, a erva-mate inibe o recrutamento celular da medula óssea para o sangue circulante na peritonite aguda em ratos.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção do Extrato de Erva mate

As folhas de erva mate 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 (VALDUGA, 2002).

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 de acordo com VALDUGA et al. (2003). 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 (peroxidase 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%.

As folhas de erva-mate foram submetidas ao processo de trituração, através de um triturador de metal, por 5 minutos. A erva-mate seca e triturada é então denominada cancheada. A extração de solúveis da erva-mate foi realizada pelo método de extração por percolação de água, que através do fornecimento de calor, a água percola a erva-mate moída extraindo os solúveis, sendo descartada 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, 24g de folhas de erva-mate trituradas a temperatura do extrato de 96°C.

Por fim o extrato solúvel da erva-mate foi submetido à secagem efetuada através do secador por atomização (“spray-drying”) Lab Plant SD-05 a 190°C. Processo em que o extrato é bombeado através de uma bomba peristáltica até um atomizador, o ar aquecido é então admitido no interior da câmara de secagem onde ocorre a evaporação instantânea da umidade contida nas gotículas de solução de erva-mate, obtendo-se partículas sólidas de erva-mate.

O extrato atomizado foi acondicionado em recipientes de vidro âmbar hermeticamente fechado até o momento da adição no iogurte. O mesmo foi submetido à análise de atividade antioxidante *in vitro*.

3.2 Atividade antioxidante *in vitro* pela captura de radicais livres com o teste do DPPH

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. 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.

A metodologia foi fundamentada na medida da extinção da absorção do radical Difenilpicrilhidrazina (DPPH) em 515 nm (MIRANDA e FRAGA, 2006). A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico. A técnica consistiu na incubação por 10 minutos, de 500 µL de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM com 500 µL de soluções contendo concentrações crescentes de extrato de erva-mate em etanol. Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada “controle”, porém substituindo 500 µL da amostra por 500 µL de solvente etanol. Para a solução denominada “branco” foi utilizado como solvente o etanol. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a equação abaixo:

$$AA\% = 100 - \{[(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100] \div \text{Abs. controle}\}.$$

A determinação foi feita em espectrofotômetro UV-Visível marca 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 515 nm, com o objetivo de avaliar a absorbância das diferentes concentrações das amostras. Após, determinou-se a faixa de concentração na qual não ocorreria inferência 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 (IC₅₀) por análise de regressão (CARBONARI, 2005).

3.3 Elaboração do iogurte (açúcar de 6 a 8%, sorbato 0,05 a 0,1%, estabilizante 0,02 a 0,2%, leite em pó de 1 a 3%).

Dez litros de leite com 2,5% de gordura, 200g de leite em pó desnatado e 20g de gelatina (pré-misturada antes com leite em pó) foram colocados em um tanque inox, e posteriormente aquecidos até 90°C, durante 5 minutos. Após, se iniciou o resfriamento até atingir a temperatura 65°C, quando então foram adicionados e misturados 30 g de fibras (WF 600), e 600 g de açúcar. Após esta etapa, o mesmo foi submetido a resfriamento até 42°C, sendo adicionado 0,4 gramas da cultura pura normal e probiótica de acordo com a formulação, mantendo-se a essa temperatura durante 4 horas. Transcorrido o tempo, a massa foi submetida ao resfriamento até 20°C, com adição de 10g de sorbato de potássio. As diferentes concentrações de extrato (0,1 e 0,25%), conforme cada formulação, foram adicionadas e homogeneizadas logo após, e os iogurtes foram armazenados a 15°C durante 1 hora. Posteriormente, procedeu-se o envasamento em potes plásticos, com capacidade de 250 mL e armazenou-se a 5°C durante 60 dias.

As culturas foram reativadas em separado a 25°C durante 30 minutos em leite com 2,5% de gordura, previamente à adição no produto.

Na elaboração dos iogurtes, foi utilizado leite tipo C pasteurizado (73°C por 15 segundos, padronizado com 2,5% de gordura) e homogeneizado, envasado em sacolas plásticas. As amostras de leite foram transportadas até a Universidade e ao chegarem à usina foram imediatamente vertidas para o tanque de aço inox, dando início ao processamento do iogurte.

A cultura láctica utilizada para o processamento dos iogurtes tradicionais continha cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. A cultura láctica liofilizada da marca Germinal apresenta denominação comercial 70075-Cultura Driset Yogurt 438 – 1000LU, de coloração castanha, na forma de pó, parâmetros de incubação de 32 – 44°C por 4 – 12 horas, recomendada para uso em iogurtes e bebidas lácteas.

Para o processamento dos iogurtes com probiótico, utilizou-se a cultura láctica que continha cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium spp.* A cultura láctica liofilizada da marca Germinal apresenta denominação comercial 70780 – Dairy Start BioFlora ABY 438 – 500LU, de coloração castanha, na forma de pó, alta viscosidade, parâmetros de incubação de 35 – 44°C por 4 – 8 horas, recomendada para uso em iogurtes e bebidas lácteas probióticas.

Utilizou-se uma fibra alimentar de trigo da marca VITACEL de denominação comercial WF 600, composta de celulose, hemicelulose e lignina, amplamente utilizada na indústria.

A gelatina especial da marca GELITA para lácteos, GEL-LAC, foi adicionada ao iogurte a fim de prevenir a sinérese (liberação do soro), ajudando na consistência e a cremosidade exigida pelo consumidor. Um outro aspecto importante de GEL-LAC: ela também estabiliza e dá corpo a produtos 0% gordura ou com maior conteúdo de soro.

No decorrer do presente trabalho foram elaborados 6 tipos de iogurtes:

- A) Iogurte com cultura tradicional (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*), sem extrato de erva-mate;
- B) Iogurte com cultura tradicional (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*), com 0,1% de extrato de erva-mate;
- C) Iogurte com cultura tradicional (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*), com 0,25% de extrato de erva-mate;
- D) Iogurte com cultura tradicional (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) e cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifodobacterium ssp.*), sem extrato de erva-mate;
- E) Iogurte com cultura tradicional (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) e cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifodobacterium ssp.*), com 0,1 % de extrato de erva-mate;
- F) Iogurte com cultura tradicional (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) e cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifodobacterium ssp.*), com 0,25 % de extrato de erva-mate.

3.4 Análises físico-químicas e microbiológicas

As análises físico-químicas e microbiológicas nos iogurtes foram realizadas 24 horas depois de elaborados e no 15°, 30°, 45° e 60° dia de armazenamento a 8°C.

3.4.1 Oxidação dos lipídeos

O nível de oxidação dos lipídios foi medido através do teste com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) de acordo com RAHARJO et al. (1992) onde o malonaldeído foi obtido da amostra pelo processo de extração.

Em béquer de 50 mL foi adicionado 5g de amostra, posteriormente 0,5mL de hidroxitolueno butilado (BHT) 0,15%, 2mL de sulfanilamida 1,5% e 18mL de ácido Tricloro

acético (TCA) 5%, homogeneizado e deixado reagir por 10 minutos. O conteúdo do béquer foi filtrado em papel filtro completando o balão com TCA 5%. Após, foi retirado 2mL do conteúdo do balão e colocado em tubo de ensaio com tampa juntamente com 2mL de TBARS. Os tubos foram colocados em banho-maria a 40 °C por 80 minutos, com posterior centrifugação a 3000rpm por 5 minutos, resfriamento até temperatura ambiente e leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 531nm.

3.4.2 Oxidação das proteínas

Para determinação da oxidação das proteínas foi utilizado o método descrito por LEVINE et al. (1990).

Em béquer de 50mL foi adicionado 10g de iogurte e 10mL de KCl 0,15 M, homogeneizando-se em Mixer por 30 segundos. Após, a mistura foi transferida para tubo de centrífuga, deixando reagir por 15 minutos, ajustada a amostra para pH 5,2 e centrifugação por 20 minutos a 5000 rpm. Após a centrifugação para determinação da quantidade de Carbonil, retirou-se 1mL do sobrenadante na porção mais transparente sendo adicionado 2mL de DNPH em HCl 2M. Para determinação da quantidade de proteína (branco), retirou-se 1mL do sobrenadante e adicionou-se 2mL de HCl 2M. Ambos os tubos foram mantidos sob agitação em aparelho Vortex e colocados para reagir no escuro por 60 minutos. A cada 15 minutos os tubos foram novamente agitados. Transcorrido o tempo, adicionou-se 2,5mL de TCA 20%, com agitação a cada 40 segundos e posterior centrifugação por 20 minutos a 5000 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e ambos os pellets, contendo DNPH e HCl, foram lavados com etanol:acetato de etila 1:1 (v:v) e deixados secar. Após, adicionou-se 2 mL de guanidini 6M e a realizou-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm para amostras contendo HCl, e em comprimento de onda de 370 nm para amostras contendo DNPH e HCl.

3.4.3 Reação de Maillard

Os valores de HMF (5-Hidroximetilfurfural) livre e HMF total foram obtidos de acordo com SILVA et al., (1997).

- **HMF LIVRE**

Em béquer de 100mL foi adicionado 10 mL de leite, em seguida 5mL de ácido oxálico 0,3 mol/L.S.R e 5mL de ácido tricloroacético (TCA) 40% (m/v) S.R, posteriormente realizou-se uma filtração em papel filtro para um erlenmeyer de 125 mL. Pipetou-se 4 mL do filtrado e 1mL de ácido tiobarbitúrico (0,5mol/L) em tubo de ensaio com tampa e estes foram colocados

em banho-maria a 40°C por 30 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, realizou-se leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 443nm.

- **HMF TOTAL**

Em béquer de 100mL foi adicionado 10 mL de leite, em seguida 5mL de ácido oxálico (0,3 mol/L.S.R) e submetido ao banho-maria por 60 minutos em temperatura de 90° C. Após resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se 5mL de ácido tricloroacético (TCA) 40% (m/v) S.R. e posterior filtração em papel filtro para um erlenmeyer de 125 mL. Após, foi pipetado 4 mL do filtrado e 1mL de ácido tiobarbitúrico (0,5mol/L) em tubo de ensaio com tampa e estes colocados em banho-maria a 40°C por 30 minutos. Esfriou-se até temperatura ambiente e realizou-se leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 443nm.

3.4.4 Determinação do pH

As medidas dos valores de pH foram realizadas em potenciômetro digital conforme INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.4.5 Determinação da cor

A cor foi determinada através do colorímetro portátil (Minolta CR400), com fonte de luz D65, na escala de L*, -a*, +b* do sistema CIELab, a 25°C. A calibração do aparelho foi realizada seguindo as instruções do fabricante. As coordenadas de cromaticidade a* e b* indicam as direções das cores, desta forma, a* > 0 é a direção do vermelho, a* < 0 é a direção do verde; b* > 0 é a direção do amarelo e b* < 0 é a direção do azul (MINOLTA, 1994). As amostras foram dispostas em placa de Petry com 9,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura, onde foram adicionadas 10mL do iogurte. A determinação ocorreu em 3 pontos diferentes da amostra e posteriormente se calculou a média.

3.4.6 Determinação do ácido láctico

O método de titulação com solução Dornic foi utilizado para determinar o índice de ácido láctico, onde cada 1mL gasto da solução corresponde a 10mg de ácido láctico de acordo com AOAC (2000).

Para realização da determinação da acidez do iogurte pipetou-se para um erlenmeyer de 125mL, 5 mL de amostra, 20mL de água destilada em temperatura de 40 a 50°C, adicionou-se de 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1% (m/v) alcoólica neutralizada. A titulação foi realizada por uma solução de hidróxido de sódio 0,111mol/L até o ponto final detectável pelo aparecimento de discreta coloração rósea, permanente por 30 segundos, anotando o volume

gasto (v). Foi feito também o monitoramento do pH (8,3). A acidez, expressa em °Dornic, é calculada por meio da equação abaixo:

$$^{\circ}\text{D} = v \times 2$$

Sendo: °D: acidez Dornic, v: volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra, 2: fator referente ao volume de amostra utilizado na análise. Para expressar a acidez em porcentagem de ácido láctico, dividir a acidez Dornic por 100.

Cada 0,1mL correspondente a 1°D correspondente a 0,01% de acidez expressa como ácido láctico.

3.4.7 Bactérias Lácticas

Foi utilizada a metodologia descrita por (BRASIL, 1992) e as amostras foram semeadas em profundidade em Caldo MRS (Man, Rogosa and Sharpe) para crescimento e incubadas a 30° durante 72 horas.

3.5 Análise Sensorial

Para a avaliação de aceitação sensorial para os atributos cor e sabor utilizou-se escala hedônica de 9 pontos (9= gostei muitíssimo a 1= desgostei muitíssimo), para as seis amostras de iogurte avaliados no 7º dia, 30º e 45º dia de armazenamento, envolvendo 30 provadores não treinados consumidores de iogurte entre alunos e funcionários da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, de ambos os sexos com idade entre 18 e 50 anos.

Os testes foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial da URI-Campus de Erechim em cabines individuais iluminadas com luz branca. As amostras foram entregues através de portinholas que permitem a comunicação entre o preparador e o provador. As amostras foram codificadas com números aleatórios de três dígitos e servidas em copos descartáveis de cor branca de 50mL, em temperatura de armazenamento do iogurte de ±5°C, juntamente com um copo de 200mL de água mineral para ajudar na remoção de sabor residual.

3.6 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente através de cálculos de média, desvio padrão, análise de variância (ANOVA) e a 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

4.1 Obtenção do extrato

As amostras da planta erva-mate (*ilex paraguariensis* St. Hil) foram coletadas no mês de agosto. De acordo com CARTERLE et al. (2005) as amostras colhidas no mês de agosto apresentam maior efeito antioxidante, segundo o autor este resultado pode ser atribuído ao maior aporte de energia luminosa, que dentro do metabolismo vegetal é transformada em química gerando espécies reativas, que estimulariam a síntese de agentes de defesa.

4.2 Atividade Antioxidante *in vitro*

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato de erva-mate em diferentes concentrações encontram-se na Tabela 1. Pode-se observar que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração de extrato adicionado atingindo 99,5% de atividade antioxidante para a concentração 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 1. Porcentagem da neutralização do DPPH pelo extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(AA%)
1	11,50
5	18,58
10	22,94
50	23,21
100	42,66
250	55,40
500	84,31
750	99,52

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

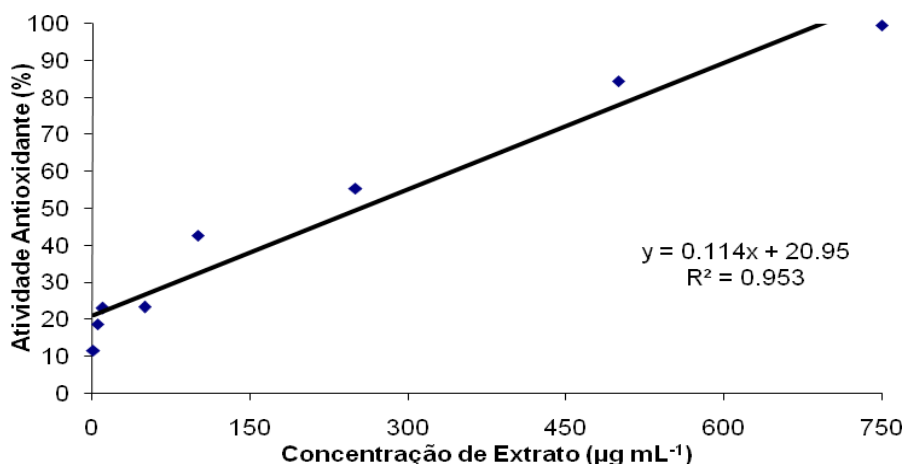


Figura 1. Curva de calibração da atividade antioxidante do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado forneceu um IC_{50} de $254,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, que é a concentração de extrato necessária para apresentar 50 % de atividade antioxidante. Esta atividade antioxidante pode ser considerada boa, apresentando a mesma ordem de grandeza de atividade de extratos de diversas outras espécies. Segundo MENSOR et al. (2001) a planta *Ginkgo biloba* é uma das plantas consideradas com alta atividade antioxidante, pois possui um IC_{50} de $38,91 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As folhas de erva mate apresentam elevado conteúdo de flavonóides e cafeoil derivados, responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes. A presença de rutina, quercitina e camferol, ambos livres ou como glicosídeos, em várias espécies de *Ilex*, incluindo a *I. paraguariensis*, podem também ser responsáveis em parte pela atividade antioxidante observada na erva mate (PADILHA, 2007).

Entretanto, diversos autores têm relatado a necessidade de um aumento significativo de concentração para uso em produtos alimentícios, em relação à concentração mínima obtida *in vitro* (até 100 vezes mais) (KOUTSOUMANIS et al., 1998) sendo geralmente a mesma limitada pela aceitação sensorial (HOLLEY e PATEL, 2005). Neste sentido, optou-se pela formulação dos iogurtes com 0, 5 e 10 vezes o valor de IC_{50} obtido no teste *in vitro*.

4.3 Oxidação dos Lipídeos

A Tabela 2 apresenta os valores médios de mg de Malonaldeído/kg de amostra obtidos através da análise de oxidação de lipídeos, onde as seis formulações de iogurtes foram avaliadas nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento refrigerado.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de mg de MA/Kg de amostra para as seis formulações de iogurtes durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos Iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	0,020 ^{bA}	0,015 ^{cC}	0,021 ^{abB}	0,019 ^{bB}	0,024 ^{aB}
	± 0,001	± 0,001	± 0,001	± 0,001	± 0,001
Iogurte Probiótico sem extrato	0,018 ^{bAB}	0,019 ^{bBC}	0,030 ^{aA}	0,030 ^{aA}	0,035 ^{aA}
	± 0,003	± 0,001	± 0,001	± 0,004	± 0,003
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	0,015 ^{bB}	0,025 ^{aA}	0,013 ^{bCD}	0,008 ^{bD}	0,013 ^{bD}
	± 0,002	± 0,002	± 0,005	± 0,003	± 0,001
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	0,018 ^{aAB}	0,019 ^{aBC}	0,008 ^{cD}	0,012 ^{bCD}	0,012 ^{bD}
	± 0,001	± 0,001	± 0,002	± 0,001	± 0,001
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	0,008 ^{cC}	0,020 ^{aB}	0,021 ^{aBC}	0,016 ^{bBC}	0,016 ^{bD}
	± 0,001	± 0,001	± 0,002	± 0,001	± 0,001
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	0,010 ^{cC}	0,027 ^{aA}	0,019 ^{bBC}	0,020 ^{bB}	0,019 ^{bC}
	± 0,001	± 0,002	± 0,004	± 0,001	± 0,003

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

No tempo zero, estabelecido para as análises realizadas após 24 horas de armazenamento, as duas formulações de iogurte tradicional e probiótico com 0,25% de extrato de erva mate, apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação as demais formulações, apresentando os menores valores de mg de MA/kg de amostra (0,008 e 0,010, respectivamente). O iogurte probiótico sem extrato de erva mate no 30º, 45º e 60º dia de armazenamento apresentou diferença estatística em relação às demais formulações obtendo os maiores de valores de mg de MA/kg de amostra.

No 60º dia de armazenamento refrigerado os iogurtes tradicional e probiótico com 0,1% de extrato e com 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 MA/kg de amostra, comprovando a ação antioxidante da presença do extrato da erva mate no produto.

Trabalhos envolvendo a análise de TBARS são normalmente encontrados na determinação da oxidação lipídica em produtos carneos. Não foram encontrados trabalhos envolvendo esta análise e o tempo de armazenamento de iogurtes. TORRES e OKANI (2000) encontraram valores de 0,07 mgMA/Kg de amostra para leite tipo A, 0,07 mgMA/Kg de amostra para leite do tipo B e 0,03 mgMA/Kg de amostra para leite do tipo C.

Grande parte dos resultados encontrados para os iogurtes durante os 60 dias de armazenamento encontraram-se entre 0,010 mgMA/Kg de amostra e 0,023 mgMA/Kg de amostra, resultados estes segundo KING (1962) não apresentaram “flavor” oxidado. O autor ao relacionar os resultados da análise de TBARS e avaliação organoléptica do leite verificou que valores de TBARS, entre 0,010 e 0,023, não apresentaram “flavor” oxidado; entre 0,024 e 0,029 apresentaram “flavor” oxidado questionável; entre 0,030 e 0,040 apresentaram “flavor” oxidado leve; entre 0,041 e 0,055, “flavor” oxidado forte, e, TBARS>0,056, apresentaram “flavor” oxidado muito forte.

O valor máximo de mg MA/Kg de amostra encontrado para as seis formulações de iogurte durante todo tempo de armazenamento, foi de 0,035 mg de MA/Kg correspondente ao iogurte com probiótico e sem extrato de erva-mate no 60º dia de armazenamento. De acordo com TORRES e OKANI (2000) valores de TBARS acima de 1,59mg de aldeído malônico/kg de amostra podem causar danos a saúde do consumidor.

4.4 Oxidação das Proteínas

Os valores médios de mmol de carbonil por mg de proteína, obtidos através da análise de oxidação de proteínas, num período de 60 dias para seis formulações de iogurtes, estão apresentados na Tabela 3, onde verifica-se que a presença de extrato de erva mate não influenciou significativamente na oxidação de proteínas ($p < 0,05$). Apesar da grande importância da determinação da oxidação de proteínas em alimentos, estudos envolvendo esta análise são bastante escassos. Não foram encontrados trabalhos envolvendo esta análise em produtos lácteos. Segundo SCHAICH (2002) análises químicas da proteína carbonil são potencialmente importantes na determinação da oxidação protéica responsável por alterações na textura, formação de sabores e odores anormais em carnes.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de mmol de carbonil por mg de proteína para as seis formulações de iogurtes durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	12,25 ^{ba}	12,93 ^{bb}	22,90 ^{abc}	13,23 ^{baB}	9,80 ^{bb}
	± 0,52	± 1,77	± 1,79	± 1,73	± 1,36
Iogurte Probiótico sem extrato	6,13 ^{bb}	6,64 ^{bc}	17,15 ^{acd}	16,46 ^{aA}	15,15 ^{aA}
	± 0,64	± 0,59	± 2,23	± 1,04	± 0,67
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	5,18 ^{db}	20,37 ^{ba}	30,01 ^{aA}	10,84 ^{cb}	7,38 ^{dc}
	± 0,68	± 1,11	± 1,88	± 1,54	± 0,04
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	9,50 ^{bcA}	13,06 ^{bb}	25,56 ^{aAB}	6,59 ^{cdC}	4,91 ^{dd}
	± 1,89	± 1,02	± 2,53	± 1,65	± 0,60
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	11,10 ^{acA}	10,23 ^{bcBC}	11,70 ^{abDE}	14,96 ^{aAB}	2,73 ^{de}
	± 1,07	± 2,04	± 2,99	± 0,68	± 0,30
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	10,98 ^{ba}	9,96 ^{bcBC}	10,83 ^{be}	15,22 ^{aA}	7,38 ^{bc}
	± 1,42	± 1,00	± 1,30	± 2,12	± 0,41

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

4.5 Reação de Maillard

A Figura 2 apresenta médias da formação do composto Hidroximetilfurfural-livre (HMF-livre), produzido através da reação de Maillard, durante os 60 dias de armazenamento refrigerado das seis formulações de iogurte. As médias e desvio padrão dos valores de HMF-livre, das seis formulações de iogurte avaliados nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento encontram-se na Tabela 4.

Observa-se que embora tenham ocorrido diferenças significativas nos valores de HMF-livre em relação aos seis tratamentos, não se pode afirmar que a presença de extrato de erva mate tenha exercido influência sobre o produto. Quanto ao tempo de armazenamento, em geral os valores de HMF-livre tendem a aumentar, com o aumento do tempo de armazenamento.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão de HMF-livre $\mu\text{mol/L}$ para as seis formulações de iogurtes durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	56,56 ^{ba}	45,62 ^{cb}	37,29 ^{cb}	75,83 ^{aA}	76,35 ^{aA}
	± 0,001	± 0,003	± 0,001	± 0,003	± 0,001

Iogurte Probiótico sem extrato	27,39 ^{bc}	25,31 ^{bc}	22,71 ^{bc}	50,31 ^{aB}	57,08 ^{aB}
	± 0,004	± 0,001	± 0,002	± 0,001	± 0,002
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	47,19 ^{cB}	32,08 ^{dC}	40,94 ^{cdB}	80,00 ^{aA}	58,64 ^{bB}
	± 0,001	± 0,001	± 0,004	± 0,001	± 0,002
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	27,92 ^{cC}	58,64 ^{bA}	56,56 ^{bA}	78,44 ^{aA}	61,77 ^{bB}
	± 0,003	± 0,003	± 0,003	± 0,004	± 0,002
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	19,58 ^{bcC}	11,77 ^{cdD}	28,96 ^{bBC}	28,96 ^{bc}	43,54 ^{aC}
	± 0,002	± 0,001	± 0,003	± 0,002	± 0,003
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	46,67 ^{cAB}	40,94 ^{cB}	60,21 ^{bA}	60,73 ^{bB}	85,73 ^{aA}
	± 0,003	± 0,002	± 0,004	± 0,003	± 0,002

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.



Figura 2. Valores médios de HMF-livre para as seis formulações de iogurte, analisados nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

A Figura 3 e Tabela 5 apresentam as médias da formação do composto Hidroximetilfurfural-total (HMF-total), durante os 60 dias de armazenamento refrigerado das seis formulações de iogurte. Nos 30 dias de armazenamento os iogurtes, tradicional e probiótico sem extrato de erva mate apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), em relação às demais formulações que receberam a adição de extrato de erva mate e apresentaram os menores valores de HMF-total, demonstrando que a presença de extrato de erva mate influenciou no controle dos níveis de HMF-total.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão de HMF-total $\mu\text{mol/L}$ para as seis formulações de iogurtes durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	1630 ^{bd}	1617 ^{bb}	2181 ^{aA}	2091 ^{aB}	1130 ^{cB}
	± 33	± 26	± 16	± 73	± 62
Iogurte Probiótico sem extrato	1741 ^{bc}	1501 ^{cC}	2274 ^{aA}	2341 ^{aA}	1333 ^{dA}
	± 63	± 23	± 21	± 4	± 53
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	1741 ^{bc}	1422 ^{cdC}	1555 ^{cCD}	1899 ^{aC}	1292 ^{dA}
	± 46	± 59	± 52	± 37	± 59
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	1469 ^{be}	1721 ^{aAB}	1518 ^{bD}	1456 ^{bD}	1280 ^{cA}
	± 34	± 35	± 62	± 8	± 45
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	2074 ^{aA}	1740 ^{cA}	1898 ^{bB}	1955 ^{bC}	1274 ^{dA}
	± 24	± 24	± 23	± 38	± 49
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	1875 ^{aB}	1623 ^{bb}	1626 ^{bC}	1528 ^{cD}	1312 ^{dA}
	± 24	± 54	± 4	± 6	± 10

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

Em relação ao tempo de armazenamento, os valores de HMF-total tendem a aumentando até o 45º dia de armazenamento, com posterior declínio dos níveis. Este declínio pode estar aliado ao composto HMF formado na terceira etapa da reação de Maillard que ao final da reação reage com os compostos iniciais, polimerizando-se em outros chegando às melanoidinas (BUCKHOLZ, 1988). HIDALGO E POMPEI, 2000 também observaram a diminuição dos níveis de HMF em amostra de pasta de tomate após 98 dias de armazenamento.



Figura 3. Valores médios de HMF-total para as seis formulações de iogurte, analisados nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

O leite é um alimento fornecedor de grupos reativos para reação de Maillard onde reagem às proteínas caseína, lactoalbumina e lactoglobulina e o açúcar lactose (OETTERER, ano). HURTADO et al. (1998) em amostras de leite em pó reconstituído, analisados em três temperaturas 20, 30 e 37°C armazenados durante 9 meses, obtiveram conteúdos de HMF-livre e HMF-total variando de 10,3-23,5 $\mu\text{mol/L}$ e 15,0-34,7 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente e valores de HMF livre e total em leite líquido variando de 0,6-1,6 $\mu\text{mol/L}$ e 9,0-12,2 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. PINTO e WOLSFCHOON-POMBO (1984) citado por FERREIRA et al. (1994) obtiveram para amostras de doce de leite valor de 4.889,0 $\mu\text{mol/L}$ HMF total. O valor máximo de HMF total apresentado pelos iogurtes foi de 2.341,0 $\mu\text{mol/L}$ HMF total e valor mínimo de 1.130,0 $\mu\text{mol/L}$ HMF total.

FERREIRA et al. (1994) encontrou valores de 1,05 $\mu\text{mol/L}$ HMF-livre para leite UHT desnatado, valor de 0,36 $\mu\text{mol/L}$ HMF-livre para o leite UHT semi-desnatado enquanto que os valores de HMF-livre para o leite UHT integral não foram detectáveis. As seis formulações de iogurte atingiram valor máximo de 85,73 $\mu\text{mol/L}$ HMF-livre e valor mínimo de 11,77 $\mu\text{mol/L}$ HMF-livre.

4.6 Determinação do pH

Na Tabela 6 são apresentadas a evolução do pH, nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 6°C.

Logo depois de elaborados, o iogurte com probiótico e sem extrato de erva-mate apresentou o valor de pH 4,67, e o iogurte com probiótico e 0,1% de extrato pH 4,64, sendo os maiores valores que não diferiram significativamente entre si, mas diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos valores apresentados nas demais formulações. O iogurte tradicional sem extrato foi o que apresentou o menor valor de pH (4,50), e diferiu significativamente dos demais valores encontrados nas outras formulações. Nesse dia todos os tratamentos apresentaram os maiores valores de pH apresentando diferença estatística dos demais dias de armazenamento, exceto para o iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate que não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do 45º dia de armazenamento.

No 15º dia de armazenamento o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate e o iogurte tradicional com 0,1% de extrato apresentaram os maiores valores de pH 4,13 e pH 4,15, respectivamente e não diferiram significativamente ($p < 0,05$), enquanto que o iogurte com probiótico e sem extrato, e os iogurtes com probiótico e 0,1% e 0,25% de extrato de erva-mate apresentaram os menores valores de pH 4,03; 4,06 e 4,07 respectivamente e não diferiram significativamente ($p < 0,05$).

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão de pH, nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	4,50 ^{aD}	4,13 ^{bAB}	3,81 ^{dA}	4,16 ^{bD}	3,99 ^{eF}
	± 0,02	± 0,02	± 0,01	± 0,02	± 0,02
Iogurte Probiótico sem extrato	4,67 ^{aA}	4,03 ^{cD}	3,74 ^{dB}	4,23 ^{bC}	4,22 ^{bC}
	± 0,01	± 0,02	± 0,01	± 0,01	± 0,02
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	4,56 ^{aC}	4,15 ^{dA}	3,66 ^{eC}	4,44 ^{bB}	4,37 ^{cA}
	± 0,02	± 0,02	± 0,02	± 0,01	± 0,01
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	4,64 ^{aA}	4,06 ^{cD}	3,59 ^{dD}	4,21 ^{bC}	4,17 ^{bD}
	± 0,01	± 0,02	± 0,02	± 0,01	± 0,02
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	4,55 ^{aC}	4,10 ^{cBC}	3,32 ^{dF}	4,52 ^{aA}	4,31 ^{bB}
	± 0,01	± 0,02	± 0,02	± 0,02	± 0,01
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	4,60 ^{aB}	4,07 ^{dCD}	3,44 ^{eE}	4,51 ^{bA}	4,12 ^{cE}
	± 0,02	± 0,01	± 0,02	± 0,02	± 0,01

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

No 30º dia de armazenamento o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate apresentou o maior valor de pH 3,81 diferindo estatisticamente ($p<0,05$) das demais formulações, o iogurte tradicional com 0,25% de extrato apresentou o menor valor, pH 3,32 diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos demais iogurtes. Nesse dia foram obtidos os menores valores de pH para todos os tratamentos. MARTIN (2002) também observou diminuição de pH em iogurtes durante o período de 30 dias de armazenamento.

No 45º dia de armazenamento o iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate e o iogurte com probiótico e 0,25% de extrato apresentaram os maiores valores de pH 4,21 e pH 4,51, respectivamente apresentando diferença estatística ($p<0,05$) das demais formulações, enquanto que o iogurte tradicional sem extrato apresentou o menor valor pH 4,16 diferindo estatisticamente ($p<0,05$) das demais formulações.

No 60º dia de armazenamento o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate manteve-se com o menor valor pH 3,99, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) das demais formulações.

Durante o período de armazenamento todas as formulações apresentaram os maiores valores de pH no zero dia de análise, diferindo estatisticamente dos demais dias de armazenamento. Os menores valores de pH foram apresentados no 30º dia de análise diferindo estatisticamente dos demais dias de armazenamento, exceto para o iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate que no zero dia de análise não apresentou diferença estatística ($p<0,05$) do 45º dia de armazenamento.

As seis formulações seguiram o mesmo comportamento, com declínio do pH no início do armazenamento atingindo os menores valores no 30º dia de armazenamento e posterior aumento de pH. A diminuição nos valores de pH está relacionada à pós-acidificação do iogurte durante o armazenamento refrigerado. OLIVEIRA e DAMIN (2002), também observaram ligeira diminuição do pH, quando estudaram a viabilidade de bactérias do iogurte e das culturas probióticas em leite fermentado sob refrigeração a 4°C durante o período de estocagem das amostras. O valor do pH é importante, uma vez que o iogurte com baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$) favorece a separação do soro porque o gel não foi suficientemente formado, por outro lado, em $\text{pH} < 4,0$, a contração do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, também causa dessoramento (BRANDÃO, 1995).

Até o 15º dia de armazenamento, observou-se que os valores de pH entre as formulações que apresentaram as mesmas bactérias lácticas não apresentaram diferença estatística ($p<0,05$), independente da presença de extrato de erva-mate nas formulações, enquanto que, no 30º e 45º dia de armazenamento, as duas formulações com 0,25% de extrato apresentaram os menores valores de pH e os maiores valores, respectivamente onde o extrato

possa ter influenciado. No 60^a dia de armazenamento observa-se a mesma tendência apresentada no zero e 15º dia de armazenamento.

No final das 4 horas de fermentação os seis tipos de iogurtes elaborados apresentaram valores de pH (4,67 a 4,50) dentro da faixa de valores recomendados por AQUARONE et al., (1983) cujo faixa varia entre 4,5 à 4,6. VEISSEYRE (1988) menciona que o iogurte pode atingir um pH final entre 3,6 a 4,3, enquanto que MOREIRA et al. (1999) argumentaram que os valores de pH desejados estariam entre 4,2 e 4,5.

O valor de pH tem sua importância relacionada também com o aspecto visual do produto final durante sua conservação em temperaturas baixas. É fundamental que haja um controle rigoroso para que não ocorram possíveis separações de fase, acidificação elevada, influenciada pelo tipo de fermentação, além de alterações nas características sensoriais que poderão tornar o produto indesejável (GOMES, 2005).

4.7 Determinação da Cor

Na Tabela 7 são apresentados os valores médios dos parâmetros de luminosidade (L*) determinados nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Tabela 7. Parâmetro de luminosidade (L*), nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	86,13 ^{aA}	84,56 ^{bA}	84,68 ^{abA}	80,21 ^{cA}	78,97 ^{cA}
	± 0,46	± 0,67	± 0,33	± 0,79	± 0,35
Iogurte Probiótico sem extrato	85,97 ^{aA}	83,71 ^{bA}	83,58 ^{bA}	80,91 ^{cA}	77,33 ^{dBC}
	± 0,16	± 0,29	± 0,40	± 0,63	± 0,15
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	84,36 ^{aB}	84,75 ^{aA}	84,28 ^{aA}	79,61 ^{bAB}	77,51 ^{cBC}
	± 0,50	± 0,28	± 0,79	± 0,71	± 0,29
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	84,01 ^{aB}	84,69 ^{aA}	84,60 ^{aA}	81,01 ^{bA}	77,45 ^{cBC}
	± 0,38	± 0,27	± 0,78	± 0,57	± 0,45
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	83,98 ^{aB}	84,60 ^{aA}	84,61 ^{aA}	78,22 ^{bB}	77,67 ^{bB}
	± 0,44	± 0,21	± 0,35	± 0,37	± 0,31
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	83,93 ^{aB}	84,49 ^{Aa}	84,46 ^{aA}	78,25 ^{bB}	76,66 ^{cC}
	± 0,31	± 0,38	± 0,29	± 0,29	± 0,23

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey (≥0,05) com 95 % de significância.

Logo após elaborados, o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate e o iogurte com probiótico e sem extrato apresentaram os maiores valores de luminosidade (L^*) de 86,13 e 85,97, respectivamente apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) dos demais iogurtes.

Os valores de luminosidade (L^*) no 15º dia de armazenamento e no 30º dia de armazenamento nas seis formulações não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si.

No 45º dia de armazenamento o iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate e o iogurte com probiótico e 0,25% de extrato, apresentaram os menores valores de luminosidade (L^*) de 78,22 e 78,25, respectivamente, não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do iogurte tradicional com 0,1% de extrato.

No 60º dia de armazenamento o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate apresentou o maior valor de luminosidade (L^*) de 78,97 diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais iogurtes.

Tabela 8. Coordenada de cromaticidade (a^*), nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 6°C.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	-3,82 ^{aBC}	-3,00 ^{cB}	-2,26 ^{dC}	-3,04 ^{cB}	-3,45 ^{bBC}
	± 0,03	± 0,12	± 0,07	± 0,15	± 0,08
Iogurte Probiótico sem extrato	-3,75 ^{aC}	-3,09 ^{bcB}	-2,25 ^{dC}	-2,83 ^{cB}	-3,31 ^{bC}
	± 0,06	± 0,13	± 0,18	± 0,04	± 0,09
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	-3,99 ^{aAB}	-3,45 ^{bA}	-2,51 ^{dBC}	-3,43 ^{bA}	-3,61 ^{bAB}
	± 0,08	± 0,13	± 0,11	± 0,08	± 0,08
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	-4,09 ^{aA}	-3,49 ^{bA}	-2,56 ^{dB}	-3,48 ^{bA}	-3,58 ^{bAB}
	± 0,07	± 0,03	± 0,08	± 0,02	± 0,12
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	-4,10 ^{aA}	-3,51 ^{bA}	-2,98 ^{dA}	-3,64 ^{bA}	-3,76 ^{bA}
	± 0,10	± 0,11	± 0,09	± 0,19	± 0,11
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	-4,12 ^{aA}	-3,54 ^{bA}	-2,91 ^{dA}	-3,64 ^{bA}	-3,70 ^{bA}
	± 0,10	± 0,13	± 0,08	± 0,16	± 0,05

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

Como os seis tipos de iogurtes elaborados partiram da mesma formulação básica, o extrato de erva-mate pode ter influenciando na redução dos valores de luminosidade (L^*), e a escala desses valores varia entre zero (0) e cem (100), sendo denominado preto e branco, respectivamente. No zero dia de análise e no 45º de armazenamento os valores de

luminosidade (L^*) apresentados para as duas formulações com 0,25% de extrato foram os menores diferindo estatisticamente das formulações com ausência de extrato.

Durante o período de armazenamento as seis formulações de iogurtes seguiram a mesma tendência com diminuição dos valores de luminosidade (L^*) de maneira a apresentarem os menores valores no 60º dia de armazenamento onde apenas o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate e o iogurte tradicional com 0,25% de extrato não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) do 45º dia de armazenamento.

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios de cromaticidade (a^*) utilizados na determinação da cor, nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Os valores de a^* foram negativos ($-a^*$), em direção ao verde e os valores de b^* foram positivos ($+b^*$), em direção ao amarelo, devido à presença de clorofila no extrato de erva-mate adicionado em diferentes percentuais 0,1% e 0,25%. Pela degradação da clorofila, a cor passa de verde-brilhante para verde-oliva em alimentos processados e uma ampla variedade de cores em tecidos senescentes, no caso de vegetais consumidos *in natura* (HEATON e MARANGONI, 1996).

Logo depois de elaborados, o iogurte com probiótico e 0,25% de extrato de erva-mate e o iogurte tradicional com 0,25% de extrato apresentaram os valores de cromaticidade (a^*) mais afastados de zero (-4,12) e (-4,10), respectivamente apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) do iogurte tradicional sem extrato e do iogurte com probiótico e sem extrato, os quais, apresentaram os valores de cromaticidade (a^*) mais próximos de zero (-3,82) e (-3,75), respectivamente não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, o iogurte tradicional sem extrato não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) do iogurte tradicional e 0,1% de extrato, enquanto que o iogurte com probiótico e sem extrato diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das demais formulações.

O mesmo comportamento foi apresentado até o 60º dia de armazenamento, onde as duas formulações que receberam a adição de 0,25% de extrato de erva-mate apresentaram os valores de cromaticidade (a^*) mais afastados de zero diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das duas formulações com ausência de extrato as quais apresentaram os valores de cromaticidade (a^*) mais próximos de zero. Apenas no 30º dia de armazenamento as duas formulações com 0,25% apresentaram diferença estatística das duas formulações com 0,1% de extrato.

Durante todo período de armazenamento os iogurtes que receberam maior percentual de adição de extrato de erva-mate de 0,25% apresentaram os valores de cromaticidade (a^*) mais afastados de zero (mais verdes), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos iogurtes que não

receberam a adição de extrato e que apresentaram os valores de cromaticidade (a^*) mais próximos de zero (menos verdes).

Para valores negativos do parâmetro a^* , a aproximação do zero no espaço de cores corresponde à perda de cor verde (LAWLESS e HEYMANN, 1999), ocorrendo nos seis tipos de iogurtes até o 30º dia de armazenamento onde os valores encontraram-se mais próximos de zero apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) dos demais dias de armazenamento em todos os tratamentos.

Segundo TIJSKENS et al (2001), quanto mais ácido (menor) o pH do meio, mais rápida é a descoloração de vegetais clorofilados, por tanto a perda da coloração verde pode estar relacionada ao decréscimo contínuo do pH (Tabela 6) ocorrido em todos os tipos de iogurte apresentando os valores de pH mais baixos no 30º dia de armazenamento diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais dias. 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 (LAJOLO et al, 1971; SCHWARTZ e LORENZO, 1990; BOHN e WALCZYK, 2004).

OLIVEIRA e DAMIN (2002) também observaram ligeira diminuição do pH, quando estudaram a viabilidade de bactérias do iogurte e das culturas probióticas em leite fermentado sob refrigeração a 4°C durante o período de estocagem das amostras.

Na Tabela 9, são apresentados os valores médios de cromaticidade (b^*) utilizados na determinação da cor, nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Logo depois de elaborados os iogurtes (zero dia) o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate e iogurte com probiótico sem extrato apresentaram os menores valores de b^* de 4,40 e 4,77, respectivamente, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) dos demais tipos de iogurtes, enquanto que o iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate e iogurte com probiótico e 0,25% de extrato apresentaram os maiores valores de 12,38 e 12,61, respectivamente, os quais diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tipos de iogurte, os valores intermediários foram obtidos para o iogurte tradicional com 0,1% de extrato de 8,71 e iogurte com probiótico e com 0,1% de extrato de 8,75, respectivamente, os quais apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) dos demais iogurtes.

O mesmo comportamento foi observado até o 60º dia de armazenamento onde os iogurtes com maior percentual de adição de extrato de 0,25%, apresentaram os maiores valores de b^* (mais amarelos), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tipos de iogurte, os iogurtes que receberam a adição de 0,1% de extrato, apresentaram os valores

intermediários de b*, enquanto que, os iogurtes que não receberam a adição de extrato, apresentaram os menores valores de b* diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais formulações.

Tabela 9. Coordenada de cromaticidade (*b), nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 6°C.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	4,40 ^{aC}	2,70 ^{cC}	2,77 ^{cC}	2,23 ^{dC}	3,12 ^{bcC}
	± 0,02	± 0,15	± 0,19	± 0,13	± 0,05
Iogurte Probiótico sem extrato	4,77 ^{aC}	2,82 ^{bc}	2,34 ^{cC}	1,88 ^{dC}	2,76 ^{bcC}
	± 0,15	± 0,12	± 0,16	± 0,04	± 0,25
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	8,71 ^{aB}	8,28 ^{aB}	6,52 ^{cB}	7,75 ^{bB}	6,38 ^{cB}
	± 0,16	± 0,18	± 0,18	± 0,18	± 0,12
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	8,75 ^{aB}	7,96 ^{bB}	6,42 ^{cB}	7,72 ^{bB}	6,72 ^{cB}
	± 0,17	± 0,18	± 0,17	± 0,13	± 0,09
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	12,38 ^{aA}	11,32 ^{bA}	11,16 ^{bA}	9,65 ^{dA}	10,26 ^{cA}
	± 0,20	± 0,18	± 0,09	± 0,10	± 0,12
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	12,61 ^{aA}	11,28 ^{bA}	11,08 ^{Ba}	9,82 ^{cA}	9,94 ^{cA}
	± 0,16	± 0,19	± 0,19	± 0,18	± 0,13

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

Durante o período de armazenamento todas as formulações exceto o iogurte tradicional com 0,1% de extrato de erva-mate (não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do 15º dia de armazenamento) apresentaram os maiores valores de b* no zero dia de análise diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais dias de armazenamento.

Os maiores valores de *b em todas as formulações foram obtidos no zero dia de análise de maneira a apresentarem redução nos valores no decorrer do tempo de armazenamento.

O iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate e o iogurte com probiótico e 0,25% , quando comparados com as duas formulações que não receberam a adição de extrato, em todos os dias de armazenamento apresentaram os valores de a* mais afastados de zero (+ verdes), os maiores valores b* (+ amarelos), enquanto que os valores de L* foram os menores (menos esbranquiçados) no zero e 45º dia de armazenamento.

4.8 Determinação do Ácido Lático

Na Tabela 10 são apresentados os resultados de acidez expressa em graus Dornic (°D), nos seis tipos de iogurtes elaborados, durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Tabela 10. Acidez expressa em graus Dornic (°D), nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 6°C.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	83 ^{dA}	90 ^{cC}	113 ^{aA}	106 ^{bA}	111 ^{abAB}
	± 1	± 2	± 2	± 2	± 2
Iogurte Probiótico sem extrato	80 ^{dAB}	99 ^{bcA}	105 ^{aB}	95 ^{cB}	104 ^{abCD}
	± 2	± 2	± 2	± 2	± 2
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	74 ^{bC}	77 ^{bD}	99 ^{aCD}	97 ^{aB}	97 ^{aE}
	± 2	± 1	± 1	± 1	± 2
Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	82 ^{cAB}	97 ^{bAB}	100 ^{bBCD}	96 ^{bB}	114 ^{aA}
	± 2	± 3	± 2	± 2	± 2
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	78 ^{cBC}	79 ^{cD}	95 ^{aD}	87 ^{bC}	99 ^{aDE}
	± 2	± 1	± 3	± 3	± 3
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	82 ^{cAB}	93 ^{bBC}	103 ^{aBC}	103 ^{aA}	106 ^{aBC}
	± 2	± 1	± 2	± 1	± 2

NOTA: ^{ABCD} letras maiúsculas vertical, ^{abcd} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

Logo depois de elaborados os iogurtes (zero dia), o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate apresentou o maior valor de acidez de 83°D, diferindo estatisticamente do iogurte tradicional com 0,1% de extrato e do iogurte tradicional com 0,25% de extrato, os quais apresentaram os menores valores de acidez.

No 15° dia de armazenamento o iogurte com probiótico e sem extrato de erva-mate e o iogurte com probiótico e com 0,1% de extrato apresentaram os maiores valores de acidez de 99°D e 97°D, o iogurte com probiótico e 0,1% de extrato que não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do iogurte com probiótico e 0,25% de extrato, enquanto que o iogurte com probiótico em sem extrato apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) das demais formulações.

No 30° dia de armazenamento o iogurte tradicional sem extrato de erva-mate apresentou o maior valor de acidez de 113°D diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais iogurtes, enquanto que o iogurte tradicional com 0,25% de extrato apresentou o menor valor de acidez de 95°D, não apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) do iogurte tradicional com

0,1% de extrato e do iogurte com probiótico e 0,1% de extrato. Comportamento semelhante foi apresentado no 45º e 60º dia de armazenamento dia de armazenamento.

Os valores de acidez durante o tempo de armazenamento atenderam ao estabelecido pela legislação brasileira em vigor, que é de 60ºD a 150ºD (BRASIL, 1997). No decorrer do tempo de armazenamento na medida em que ocorre o abaixamento do pH a acidez aumenta para todos os tratamentos. Não se observou interferência do extrato de erva-mate nos valores de acidez.

Durante o período de armazenamento até o 30º dia, observou-se o declínio do pH e o aumento da acidez expressa em graus Dornic (ºD) nos seis tipos de iogurtes, devido a contínua produção de ácidos pelas bactérias lácticas. Segundo BEAL et al., (1999) os iogurtes estão sujeitos ao decréscimo de pH e ao aumento da acidez durante a estocagem refrigerada, isso devido à persistente atividade das bactérias durante a estocagem do produto. A vida de prateleira do iogurte deve ser em torno de 30 dias, período no qual o produto deve manter suas características próprias, desde que adequadamente refrigerado (VEDAMUTHU, 1991).

Estudos realizados por SALJI e ISMAIL (1983) mostraram que em iogurtes armazenados sob refrigeração, a acidez pode apresentar alterações em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial da mesma, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenagem e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas. DAVE e SHAH (1997) observaram um aumento na acidez depois de 35 dias de estocagem de um iogurte elaborado com culturas tradicionais e probióticas.

4.9 Análise de Bactérias Lácticas

Na Tabela 11, são apresentados os números de colônias das bactérias lácticas ($\log_{10}$ UFC/mL), nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Tabela 11: Número de colônias de bactérias lácticas ($\log_{10}$ UFC/mL), nos seis tipos de iogurtes elaborados durante 60 dias de armazenamento a 5°C.

Tipos de Iogurte	Dias analisados dos iogurtes				
	0	15	30	45	60
Iogurte Tradicional sem extrato	9,21 ^{aA}	9,05 ^{aA}	9,15 ^{aA}	8,72 ^{bB}	8,79 ^{bAB}
	± 0,07	± 0,06	± 0,07	± 0,12	± 0,20
Iogurte Probiótico sem extrato	9,12 ^{aA}	9,13 ^{aA}	9,16 ^{aA}	8,85 ^{bAB}	8,82 ^{bA}
	± 0,10	± 0,04	± 0,03	± 0,22	± 0,09
Iogurte Tradicional com extrato 0,1%	9,14 ^{aA}	9,09 ^{aA}	9,21 ^{aA}	9,44 ^{aA}	8,48 ^{bB}
	± 0,13	± 0,07	± 0,08	± 0,39	± 0,23

Iogurte Probiótico com extrato 0,1%	9,14 ^{aA}	9,08 ^{aA}	9,07 ^{aA}	9,16 ^{aA}	8,20 ^{bB}
	± 0,13	± 0,08	± 0,08	± 0,17	± 0,64
Iogurte Tradicional com extrato 0,25%	9,12 ^{aA}	9,15 ^{aA}	7,09 ^{bB}	8,14 ^{bC}	9,01 ^{aA}
	± 0,04	± 0,04	± 0,06	± 0,02	± 0,08
Iogurte Probiótico com extrato 0,25%	9,17 ^{aA}	9,13 ^{aA}	7,09 ^{bB}	8,19 ^{bC}	9,08 ^{aA}
	± 0,03	± 0,04	± 0,11	± 0,08	± 0,20

NOTA: ^{abcd} letras maiúsculas vertical, ^{ABCD} letras minúsculas horizontal. Teste de Tukey ($\geq 0,05$) com 95 % de significância.

Logo depois de elaborados os iogurtes (zero dia) o número de colônias de bactérias lácticas variou de $\log_{10}$ 9,21 UFC/mL (iogurte tradicional sem extrato) a $\log_{10}$ 9,12 UFC/mL (iogurte com probiótico e sem extrato e no iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate), não ocorrendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores. No 15° dia de não se observou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os iogurtes.

No 30° dia de armazenamento o iogurte tradicional sem extrato, o iogurte tradicional com 0,1% de extrato e o iogurte com probiótico sem extrato de erva-mate apresentaram como número de colônias de bactérias lácticas $\log_{10}$ 9,15; $\log_{10}$ 9,21 e $\log_{10}$ 9,16 UFC/mL respectivamente, e não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). Os números de colônias de bactérias lácticas no iogurte tradicional com 0,25% de extrato e no iogurte probiótico com 0,25% foram menores ($\log_{10}$ 7,09 UFC/mL), mas ocorreram problemas quando de sua realização.

Não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) na contagem das bactérias lácticas, de maneira que o extrato de erva mate não afetou o desenvolvimento microbiológico.

No 45° dia de armazenamento o iogurte tradicional com 0,1% de extrato de erva-mate apresentou o maior número de colônias de bactérias lácticas ($\log_{10}$ 9,44 UFC/mL), o qual diferenciou-se significativamente do número de colônias encontrado no iogurte tradicional sem extrato, e também dos iogurtes tradicional com 0,25% de extrato e do probiótico com 0,25% de extrato de erva-mate. Ocorreu também diferença significativa ($p < 0,05$) entre o iogurte tradicional sem extrato ($\log_{10}$ 8,72 UFC/mL), e os iogurtes tradicional ($\log_{10}$ 8,14 UFC/mL) e probiótico ($\log_{10}$ 8,19 UFC/mL) ambos com 0,25% de extrato de erva-mate.

No 60° dia de armazenamento os iogurtes tradicional ($\log_{10}$ 8,48 UFC/mL) e probiótico ($\log_{10}$ 8,20 Ufc/mL) apresentaram o menor número de colônias de bactérias lácticas, as quais diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos iogurtes tradicional ($\log_{10}$ 9,01 UFC/mL) e probiótico ($\log_{10}$ 9,08 UFC/mL) ambos com 0,25% de extrato de erva-mate, nos quais ocorreu o maior número de colônias de bactérias lácticas.

O iogurte tradicional sem extrato e o iogurte com probiótico sem extrato apresentaram os menores números de colônias de bactérias lácticas no 45º e 60º dia de análise, durante o armazenamento.

O iogurte tradicional com 0,1% de extrato de erva-mate e o iogurte com probiótico e 0,1% de extrato apresentaram no 60º dia de armazenamento os menores números de colônias de bactérias lácticas, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) dos demais dias de análise.

O iogurte tradicional com 0,25% de extrato de erva-mate e o iogurte com probiótico e 0,25% de extrato apresentaram os menores números de colônias de bactérias lácticas no 30º (problemas durante a realização da análise) e 45º dia de armazenamento, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais dias de armazenamento, exceto o iogurte tradicional com 0,25% de extrato que não apresentou diferença estatística do 60º dia de armazenamento.

Os resultados obtidos em todos os dias analisados, nos quatro tipos de iogurtes (tradicional e probiótico) que continham extrato de erva-mate (0,1% e 0,25%), demonstraram que não ocorreu ação do efeito antimicrobiano da erva-mate frente a cultura pura e probiótica empregadas, uma vez que a erva-mate apresenta esse efeito (GONÇALVES et al., 2005; HECK e MEJHA, 2007; EFING, 2008), demonstrando que essas concentrações podem ser empregadas sem causar prejuízos ao produto elaborado.

VALDUGA et al. (2008) observaram em iogurte tradicional contendo 0,1% de extrato de erva-mate maior número de colônias de bactérias lácticas, do que no iogurte tradicional sem extrato, sendo significativa a diferença durante os 45 dias de armazenamento. Nesse trabalho o iogurte tradicional com 0,1% de extrato de erva-mate apresentou maior número de colônias de bactérias lácticas em relação ao iogurte tradicional sem extrato no 15º, 30º e 45º dia, mas ocorreu diferença significativa somente no 45º dia de armazenamento. Enquanto que para o iogurte tradicional contendo 0,25% de extrato de erva-mate, foi observado maior número de colônias de bactérias lácticas somente no 15º e 60º dia de armazenamento, em relação ao iogurte tradicional sem extrato, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no 60º dia.

O número de colônias de bactérias lácticas em iogurte tradicional contendo 0,1% de extrato de erva-mate diminuiu durante os 45 dias de armazenamento a 5°C, pois variou de $\log_{10}$ 5,46 UFC/mL a $\log_{10}$ 4,58 UFC/mL (VALDUGA et al., 2008). Nos iogurtes tradicional e probiótico que continham 0,1% de extrato de erva-mate foi observado diminuição no número de colônias de bactérias lácticas no 60º dia de armazenamento, enquanto que os iogurtes que continham 0,25% de extrato de erva-mate isso ocorreu a partir do 45º dia.

4.10 Análise sensorial

A Tabela 12 apresenta as médias das pontuações da avaliação de aceitação sensorial obtidas através da escala hedônica de nove pontos nas seis formulações de iogurtes, nos tempos de 7, 30 e 45 dias de armazenamento refrigerado.

As menores médias (6= gostei levemente) dos atributos sabor e cor apresentadas na análise sensorial corresponderam as duas formulações que receberam adição de 0,25% de extrato em sua formulação. Esse resultado pode estar correlacionado com o maior percentual de compostos presentes nesses iogurtes, pois de acordo com VALDUGA et al., (1995) a erva-mate em geral pode apresentar 20% a 30% de polifenóis, flavonóides em sua composição, conferindo gosto adstringente ao iogurte.

Tabela 12. Análise sensorial realizada nas diferentes formulações de iogurte durante o período de armazenamento.

Características sensoriais**		Amostras*					
		A	B	C	D	E	F
Sabor	7 Dias	7,43aA	7,13abA	6,43bA	7,47aA	7,13abA	6,47bA
		± 0,50	± 0,82	± 1,30	± 0,97	± 0,78	± 1,17
	30 Dias	7,73aA	7,27abA	6,63 bA	7,77aA	7,30abA	6,60bA
		± 0,83	± 0,94	± 1,10	± 1,01	± 0,88	± 1,28
	45 Dias	7,53aA	7,20abA	6,93bA	7,50aA	7,03abA	6,87bA
		± 0,82	± 0,89	± 0,83	± 0,82	± 1,00	± 1,07
Cor	7 Dias	7,93aA	7,53aA	6,67bA	7,97aA	7,57aA	6,73bA
		± 0,70	± 0,51	± 0,84	± 0,72	± 0,50	± 1,11
	30 Dias	7,83aA	7,50abA	6,87bA	7,90aA	7,53abA	6,90bA
		± 0,65	± 0,94	± 1,17	± 0,71	± 0,73	± 0,99
	45 Dias	7,93aA	7,40abA	6,83bA	7,90aA	7,40abA	6,90bA
		± 0,69	± 0,63	± 0,75	± 0,80	± 0,72	± 0,96

** médias ± desvio padrão das pontuações dos provadores seguidas de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas linhas/colunas não diferem estatisticamente a nível de 5% (teste Tukey).

* (A) Iogurte Tradicional sem extrato; (B) Iogurte Tradicional com extrato 0,1%; (C) Iogurte Tradicional com extrato 0,25%; (D) Iogurte Probiótico sem extrato; (E) Iogurte Probiótico com 0,1% de extrato; (F) Iogurte Probiótico com 0,25% de extrato.

5. CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento deste trabalho, pode-se concluir que:

1. O percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração de extrato adicionado atingindo 99,5% de atividade antioxidante para a concentração $750 \mu\text{g mL}^{-1}$.
2. A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado forneceu um IC_{50} de $254,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, que é a concentração de extrato necessária para apresentar 50 % de atividade antioxidante. Esta atividade antioxidante pode ser considerada boa, apresentando a mesma ordem de grandeza de atividade de extratos de diversas outras espécies.
3. No 60º dia de armazenamento refrigerado os iogurtes tradicional e probiótico com 0,1% de extrato e ambos com 0,25% de extrato de erva mate apresentaram diferença estatística em relação as duas formulações que não receberam a adição de extrato, de forma a apresentarem os menores valores de mg de MA/kg de amostra, comprovando a ação antioxidante da presença do extrato da erva mate no produto.
4. A presença de extrato de erva mate não influenciou significativamente na oxidação de proteínas ($p < 0,05$).
5. As seis formulações seguiram o mesmo comportamento em relação ao pH.
6. No decorrer do tempo de armazenamento na medida em que ocorre o abaixamento do pH a acidez aumenta para todos os tratamentos. Não se observou interferência do extrato de erva-mate nos valores de acidez.
7. Não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) na contagem das bactérias lácticas, de maneira que o extrato de erva mate não afetou o desenvolvimento microbiológico.
8. Em relação à avaliação sensorial das formulações testadas, as menores médias dos atributos sabor e cor apresentadas na análise sensorial corresponderam às duas formulações que receberam adição de 0,25% de extrato em sua formulação.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Seguindo a nova tendência dos consumidores, atualmente é vendido em todo o Brasil o chá mate nos sabores natural, limão, pêssego, maçã, abacaxi e guaraná. Para tanto os possíveis trabalhos poderiam partir desta idéia inicial aplicada ao chá-mate e avaliar sensorialmente a adição de sabores variados adicionados em diferentes percentuais na formulação básica do iogurte apresentada neste trabalho, aliado a pesquisas de mercado na inserção deste novo produto, potencial de produção do extrato de erva-mate pelas indústrias da região e infra-estrutura adicional requerida para implantação dessa nova tecnologia.

Avaliações in vivo não foram realizadas neste trabalho, sendo um estudo de grande importância na avaliação dos efeitos que o consumo do iogurte com probiótico e extrato de erva-mate pode causar.

A novidade da utilização do extrato de erva-mate como antioxidante natural em iogurte tradicional e probiótico bem como os resultados positivos da análise sensorial, poderão servir de embasamento científico para utilização do antioxidante em outros produtos, como em queijo acrescidos ou não de culturas lácteas probióticas, produtos que assim como o iogurte representam um mercado consumidor em ascensão.

Importantes determinações envolvendo reação de Maillard, Oxidação de Lipídeo e Oxidação de Proteína realizadas neste trabalho poderão servir de base para posteriores determinações, já que atualmente pesquisas envolvendo estas análises em alimentos como o iogurte são bastante escassas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAD. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos Dietéticos, para Fins Especiais e Suplementos Alimentares. **O mercado diet & light**. Outubro/2004. Disponível em: <<http://www.abiad.org.br/artigos.htm>>. Acesso em: 2009.

ALARCON, T. **Vendas de produtos *diet* e *ligh* revelam mercado em forte expansão**. SEBRAE/SC - Oportunidade de Negócios. Disponível em: <<http://www.sebrae-sc.com.br>>. Acesso em: 2009.

ALBUQUERQUE, L. C. **O leite em suas mãos**. Juiz de Fora: Concorde Editora Gráfica, v. 3, 150p, 1997.

ANDRADE, F. M. **Avaliação De Biomassa, Clorofila, Cafeína E Tanino Em *Ilex Paraguariensis* Saint-Hilaire, Crescendo Sob Sombreamento E Pleno Sol**. Curso de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 95p, 2004. Dissertação.

ANONYMOUS. **Yoghurt and probiotics**. Choice. v. 11. p. 32-35, 1992.

ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.83-90, 2007.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International**. 17^a ed. Gaithersburg, v. 2, 2000.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e Bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blugher Ltda., 1983. número de p. v.

ABREU, L. E. de. **Tecnologia e aproveitamento do leite**. FAEPE. Lavras. 149p, 1997.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.: **Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic Compounds from Extracts of Plants Used as Tea**. Brazilian Journal of Food Technology. v.9, n.3, p. 209-215, 2006.

BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S.: **Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública**. Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, v. 26, p. 77-89, 2003.

BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. **Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt**. Journal of Dairy Science, v. 82, n. 4, p. 673-681, 1999.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 15ª ed., São Paulo: Nobel. 321 p, 1984.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**. 9ª ed. São Paulo: Nobel, 322p, 1979.

BIRCH, A.E. et al. **Antioxidant properties of evening primrose seed extracts**. Journal of Agricultural Food Chemistry, Chicago: v.49, p. 4502-4507, 2001.

BISCAIA, I. M. F.; STADLER, C. C.; PILATTI, L. A.; **Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas**. XI SIMPEP. Bauru- SP. 9p, 2004.

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

BRANDÃO, S. C. C. **Tecnologia da produção industrial de iogurte**. Leite e Derivados, v. 5, n. 25, p. 24-38, 1995.

BRANDÃO, S. C. C. **Novas gerações de produtos lácteos funcionais**. Indústria de laticínios. São Paulo, v.6, n.37, p. 64-66, 2002.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos**. 2ª revisão, Brasília-DF: 136p, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Brasília, DIPOA, 1997. Acesso em: jan. 2009.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº. 51. **Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**. Diário Oficial da União, Brasília. 2002. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>. Acesso em: 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em: 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 2009.

BUCKHOLZ JR., L. L. **The role of Maillard technology in flavoring food products**. *Cereal Foods World*, v.33, n.7, p.547-551, 1988.

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.

CARTERLE, L. P.: DO CANTO, M. W.: HECKTHEUER, L. H. R.: **Erva-mate e Atividade Antioxidante**. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências Rurais Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM RS), Santa Maria, 2005. 100p, 2005.

CENSO Nielsen - **Consumo volta a crescer no Brasil**. ACNielsen, São Paulo, 2009. Disponível em: http://br.nielsen.com/news/Consumo_volta_a_crescer_no_Br.shtml. Acesso em: 2009.

COLLI, C. **Nutracêutico é uma nova concepção de alimento**. Informativo da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. v. 14, n. 1, p. 1-2, 1998.

COLLINS, J. K., THORNTON, G., E O' SULLIVAN, G. **Selection of probiotic strains for human applications**. International Dairy Journal. v.8, p. 487-490, 1998.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. **Viability of yogurt and probiotic, in yogurt made from commercial starter cultures**. International Dairy Journal, v. 7, n. 1, p. 31-41, 1997.

DAVE, R. I., SHAH, N. P. **Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt**. Dairy Science. v. 81, n.11, p.2804-2816, 1998.

DECKER, E. A. **Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food maximize oxidative stability**. Trends in Food Ascience and Technology, v.9, n. 6, p. 241-248, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos**. Visão Acadêmica. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DOMENICH, M. **Diet e light engordam faturamento**. SEBRAE/SC – Oportunidade de Negócios. Disponível em: <<http://www.sebrae-sc.com.br>>. Acesso em: 2009.

EFING, L. M. A. C. **Compostos Bioativos do material resinoso subproduto do processamento da erva-mate (*Illex paraguayensis* A. St. – Hill)**. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba. 108p, 2008.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.: Caracterização físico-química da erva-mate. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas 22(2): 193-204, 2002.

EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas de consumo. **Agência de Informação Agronegócio do Leite.** Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 2009.

FERREIRA, J.R. SILVA, P. H. F.da; PEREIRA, M. G.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; HANSEN, R. **Determinação do valor de 5-hidroximetilfurfural em leite esterilizado.** Revista de laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 49, 290p, 1994.

GEHLHAR, M.; REGMI, A. New directions in global food markets. **USDA, Agriculture Information Bulletin.** n. 794, Feb. 2005. Disponível em: <<http://www.citrus.co.za/news/documents/New%20Directions%20in%20Global%20Food%20Markets.pdf>>. Acesso em: 2009.

GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. **Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae).** *Química Nova* v.2, p. 304-307, 2007.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. **Probiotics for humans.** in Probiotics. R. Fuller, ed. Chapman & Hall, London.. p. 355-376, 1992.

GOMES, S.T. **Efeitos da Abertura Comercial na Cadeia do Leite Passo a Passo.** n.59, 387p, 1997.

GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; **Agentes probióticos em limentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas.** *Biotecnologia Alimentar.* Boletim de Biotecnologia, p. 12-22, 2000.

GOMES, R.G. **Efeito dos teores de leite, soro e proteína de soja nas características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais de uma bebida láctea probiótica.** Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 140p, 2005.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A.A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOURSAUD, J. La leche de vaca: composición y propiedades fisico-químicas. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos: la leche de la mama a la lechería**. Zaragoza: Acribia, v. 1, parte 1, cap. 1, p. 3-92, 1991

HALSTED, C. H. **Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin?**. American Journal Clinical Nutrition. v.77, n.4, p. 1001S-1007S, 2003.

HASSINEN, J. B., DURBIN, G. T., TOMARELLI, R. M. e BERNHART, F. W. **The minimal nutritional requirements of Lactobacillus bifidus**. Journal of Bacteriology. v. 62, 771-777, 1951.

HEATON, J.W.; MARANGONI, A.G. **Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues**. Trends in Food Science and Technology, v. 7, p. 8-15, 1996.

HECK, C.I., MEJHA, E. G. **Yerba mate tea (*Illex paraguariensis*): a comprehensive on chemistry, health implications, and technological considerations**. Journal of Food Science, v.72, n.9, p138-151, 2007.

HIDALGO, A.; POMPEI, C. **Hydroxymethylfurfural and Furosine Reaction Kinetics in Tomato Products**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Milano, Italy v. 48 (1), p. 78-82, 2000.

HIRAMOTO. K.; NASUHARA A.; MICHIKOSHI K.; KATO T.; KIKUGAWA K.: 1997. **DNA strand-breaking activity and mutagenicity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine**. Elsevier. v. 395, nº1, p. 47-56 (27 ref.), 1997.

HOLLEY, R. A., PATEL, D. **Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials**. Food Microbiology, v. 22, p. 273–292, 2005.

HUGHES, D. B. & HOOVER, D. G. **Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products.** Food Technology. v. 45, n.4, p. 75- 83, 1991.

HURTADO, S. A.; NOGUÉS, M. T. V.; FONT, A. M.; CAROU, M. C. V. **Changes in Furfural Compounds during Storage of Infant Milks.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Barcelona, Spain. V. 46 (8), p. 2998-3003, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** 3º ed. V. 1. São Paulo, 375p., 1985.

JOTZ. G. P.: MENEZES. H. S.: ZETTLER. C.G.: ALVES. R. J. V.: CHACUR. R.: BUZZATTI. C.: OLIVEIRA. M.D.: MONTES. T. H. M.: HÜBNER. M.: ZETTLER. E. W.: **Estudo Experimental da Erva Mate (*Ílex Paraguariensis*) como Agente Etiológico de Neoplasia do Trato Aéreo-digestivo.** Arquivo interno Otorrinolaringologista. São Paulo, v.10, n.4, p. 306-311, 2006.

KIM, H.S. **Characterization of Lactobacilli and Bifidobacteria as Applied to Dietary Adjuncts.** Cultured Dairy Products Journal v. 23, n.3, p.2-6, 1998.

KING, R.L. Oxidation of milk fat globule membrane material. I - Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. **Journal of Dairy Science**, v.45, p.1165-1171, 1962.

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C.C.; TAOUKIS, P.S.; NYCHAS, G. J.E. **Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements.** Journal of Applied Microbiology, v. 84, p. 981-987,1998.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B. & DEETH H. **Evaluation of encapsulated techniques of probiotics for yoghurt.** International. Dairy Journal, v.13 n. 13, p. 3-13, 2003.

KURMANN, J. A.; e J. L. RASIC. **The health potential of products containing bifidobacteria. in Therapeutic Properties of Fermented Milks.** ROBINSON, R. K. Elsevier Applied Science., London, United Kingdom. p. 117-158, 1991.

LAJOLO, F.M.; TANNENBAUM, S.R.; LABUZA, T.P. **Reaction at limited water concentration. 2. Chlorophyll degradation.** Journal of Food Science, v. 36, p.850-853, 1971.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food.** principles and practices. Aspen Publishers, Inc.: Maryland, 827p, 1999.

LEVINE, R. L., GARLAND, D., OLIVER, C. N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A. G., AHN, B. W., SHALTIEL, S., STANDTMAN, E. R. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** Methods Enzymologists. v.186, p.464-477, 1990.

LONGO, G.; RAPACCI, M.; CARRARO, C. N. M.; EFING, L. C.; VEIGA, D. R. **Estudo das alterações provocadas na produção de iogurte com leite com altas contagens de células somáticas.** Projeto de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/PUC-PR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba – PR. 34p, 2001.

MACHADO. C. C. B. M.; BASTOS. D. H. M.; JANZANTTI. N. S.; FACANALI. R.; MARQUES. M. O.; FRANCO. M. R. B.: **Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*).** Química. Nova. v. 30, n. 3, p. 513-518, 2007.

MANCINI-FILHO, J.; VAN-VOIII, A.; MANCINI, D.A.P., COZZOLINO, F.F.; TORRES, R.P. **Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*, Breyne) extracts.** Bollettino Chimico Farmaceutico., v.137, p. 443-447, 1998.

MARTIN, A. F. **Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas.** Escola superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Universidade de São Paulo. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Piracicaba. São Paulo. 62p, 2002. Dissertação.

MATSUBARA, S. **Alimentos Funcionais: Uma tendência que abre perspectivas aos laticínios.** Revista Indústria de Laticínios. São Paulo, v. 6, n. 34, p. 10-18, 2001.

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

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

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MINOLTA. **Precise color communication**: color control from feeling to instrumentation. Manual do do colorimetro MINOLTA Co. Ltd., 59p, 1994.

MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. **Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas**. In: Monge A., Ganellin, C. R. (ed.) *Practical Studies for Medicinal Chemistry IUPAC*, p. 1-14, 2006.

MITAL, B. K. e GARG, S. K. **Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics**. Food Reviews International. v 8, p.347-389, 1992.

MODLER, H. W., MEKELLAR, R. C., YAGUCHI, M. **Bifidobacteria and bifidogenic factors**. **Canadian**. Inst. Food Science. Technology, Journal. v. 23, p. 29-41, 1990.

MORAES, A.; MESQUITA, G. **Alimentos Funcionais: O Futuro do Mercado de Alimentos**. Fundação Instituto de Administração (FIA). Programa de Educação Executiva MBA Marketing. São Paulo. p. 109, 2007

MORAIS. E. C.; STEFANUTO. A.; KLEIN. G. A.; BOAVENTURA. B. C. B.; DE ANDRADE. F.; WAZLAWIK. E.; DI PIETRO. P. F.; MARASCHIN. M.; **Consumption of Yerba Mate (Ilex paraguariensis) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 8316–8324, 2009.

MOREIRA, S. R.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P.; FERREIRA, C. **Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras – MG.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 19, n. 1, p. 147-152, 1999.

NAIDU, A. S., BIDLACK, W. R., CLEMENS, R. A. **Probiotic spectra of lactic and bacteria.** Critical Reviews Food Science Technology, v. 38, n.1, p.13-126, 1999.

OLIVEIRA, M. O.; DAMIN, M. R. **Efeitos do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação e na viabilidade de bactérias do iogurte e das probióticas em leite fermentado.** In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 17, 2002. ANAIS: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Porto Alegre: SBCTA, p. 3015-3018, 2002.

O'SULLIVAN, M.G.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN,G.C.; COLLINS, J.K.**Probiotic bacteria: myth or reality?** Trends in Food Science and Technology v.3, p.309-314, 1992.

OZBEN, T. **Free Radical, Oxidative Stress and Antioxidants. Pathological and Physiological Significance,** Plenum Press, New York, p. 65–78, 1998.

PADILHA, D.G. A. **Antioxidante natural de erva mate na conservação de carne de frango *in vivo*.** Santa Maria. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria. 97 p,2007.

PASQUALI. T. R.; DIAS MACEDO. S. M; ROMAN. S. S.: **Avaliação Da Toxicidade Aguda E Do Recrutamento Celular Em Ratos Tratados Com Extrato Bruto De *Ilex Paraguariensis* St. Hill Obtido Por Extração Com Co₂ Supercrítico.** Trabalho de conclusão de curso, Curso de Farmácia Bioquímica Clínica, Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, p. 24, 2008.

PINTO, A. P. E. F.; WOLFSCHOON-POMBO, A. 5-hidroxiacetilfurfural no doce de leite. Revista do Instituto Cândido Tostes. p. 9-11, 1984.

PINTO. J.: FRANCO. E. L.: OLIVEIRA. B.V.: KOWALSKI. L. P.: CURADO. M. P.: DEWAR. R.: **Mate, coffee and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil.** Epidemiology, v.5, n.6, p.583:90, 1994.

POTTER. N. **Ciencia de los alimentos.** Zaragoza : Acribia. 667p, 1995.

PUPIN, A. M. **Probióticos, prébióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais.** Seminário Novas Alternativas de Mercado- ITAL. Campinas, p. 133-145, 2002.

RAHARJO, S.; SOFOS, N. J.; SCHIMIDT, R. G. **Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C₁₈ method for measuring lipid peroxidation in beef.** Journal Agriculture Food Chemistry, v. 40, p.2182 – 2185, 1992.

REGINATO. F. H.: ATHAYDE. M. L.: GOSMANN. G.: SCHENKEL. E. P.: **Methylxanthines Accumulation in *Ilex* Species - Caffeine and Theobromine in Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) and Other *Ilex* Species.** Journal of the Brazilian Chemical Society. v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T. **Free Radical Biol. Med.** p.15-77, 1992.

RAPACCI, M. **Tecnologia de leite.** Curitiba: PUC-PR, Departamento de Engenharia de Alimentos, 43p, 2000. Apostila digitada.

REZENDE. A. A. Limitações Logísticas para Exportação: O Caso dos Produtos Lácteos Brasileiros. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios (CEPAN), Programa de Pós-Graduação em Agronegócios (PPGA). 94p, 2005.

RODRIGUES. E. R. V.: **Efeito antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em voluntários sadios**. Curso de pós Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde da Universidade de São Francisco (USF). Bragança Paulista, p. 82, 2009.

SÁ. F. V. **O leite e os seus produtos**. 4ªed. Lisboa: TEIXEIRA. A. M. 390p, 1978.

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 de Mestrado, Área de concentração: Nutrição, pós-graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 120, 2005.

SALJI, J. P.; ISMAIL, A. A. **Effect of initial acidity of plain yogurt on acidity changes during refrigerated storage**. Journal Food Science, v. 48, n.1, p. 249-258, 1983.

SCHAICH, K. M. **NO[•] Production during Thermal Processing Of Beef: Evidence for Protein Oxidation**. Free Radicals in Food. Cap. 11, Vol. 807, p. 151-160, 2002.

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

SGARBIERI, C. V.; PACHECO, M.T.B. **Alimentos Funcionais Fisiológicos**. Brazilian Journal of Food Technology. v.2, n.1-2, p. 7–19, 1999.

SGORBATI, B., BIAVATI, B. & PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. Em Wood, B. J. B. e Holzapfel, W. H. (eds), The Lactic Acid Bacteria v. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic, Londres, RU. cap. 8, p. 279-306, 1995

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V; BRITZ, M.; KYLE, W.S.A.; **Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage**. Int. Dairy J. v. 5, p. 515-521, 1995.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, 2004.

SILVA, P.H.F., PEREIRA, D.B.C., OLIVEIRA, L.L., GONÇALVES, L.C. **Físico Química do Leite e Derivados – Métodos Analíticos**. Gráfica: Oficina de Impressão. Gráfiac e Editora Ltda. Juiz de Fora Minas Gerais, Brasil, 190p, 1997.

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, p.94-103, 1999.

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. Food Technology. Chicago: institute of food tecqnologists.Nobel. São Paulo: Nobel, p.254, 1985.

SOROA, J. M. **Indústrias lácteas**, Biblioteca Técnica Litexa. 5 ed. Lisboa, 376p, 1980.

SPREER, E. **Lactología industrial**: leche, preparación y elaboración, máquinas, instalaciones y aparatos, productos lácteos. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 617p, 1991.

TETRA PAK DAIRY INDEX. **Foco nos mercados desenvolvidos**. 2ª ed. 13p, 2009. Disponível em: www.tetrapak.com.br. Acesso em: 2009.

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.; OKANI, E. T. Teste de TBA – Ranço em Alimentos. Trabalho original recebido do próprio autor. Universidade de São Paulo (USP) Faculdade de Saúde Pública Departamento de Nutrição. AV. Dr. Arnaldo, 715 USP/FSP/HNT. 01246-904. São Paulo. etorres@usp.br, 10p, 2000.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. **Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts**. J. Agric. Food Chemistry. Chicago: v. 49, p. 4083-4089, 2001.

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres**. 1ªed. Rio de Janeiro. Ed. Campus, p.168, 1995.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate.** Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba- PR. 97 p, 1995.

VALDUGA, A. T. **Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hill. (Erva Mate).** Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, 216p, 2002.

VALDUGA, A. T., FINZER, J. R. D., MOSELE, S. H. **Processamento de erva-mate.** Edifapes, 1ªed, Erechim –RS, 184p, 2003.

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

VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados.** Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 36p, 2001. Apostila digitada.

VARNAM, A. H., SUTHERLAND, J. P. **Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology.** Chapman e Hall, London. 451p, 1994.

VEDAMUTHU, E. R. **The yogurts story – past, present and future.** Part VI. Dairy, Food Envionmental Sanitarrians, v. 11, n. 9, p. 513-514, 1991.

VICTORA, C.G.; MUNOZ, N.; DAY, N.E.; BARCELOS, L.B.; PECCIN. D.A.; BRAGA, N.M.; **Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study.** Int J Cancer v. 39, p. 710-716, 1987.

VEISSEYRE, R. **Lactologia tecnica: composicion, recogida, tratamiento y transformacion de la leche.** Zaragoza : Acribia, 629 p, 1988.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. **Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001.