



**QUANTIFICAÇÃO DE COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS EM QUEIJOS  
MUÇARELA, PRATO E MINAS FRESCAL**

**ELLEN ABREU DA CRUZ**

ELLEN ABREU DA CRUZ

**QUANTIFICAÇÃO DE COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS EM QUEIJOS  
MUÇARELA, PRATO E MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: DSc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Coorientadora: DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

ITAPETINGA

BAHIA - BRASIL

2014

637.35

C961q Cruz, Ellen Abreu da

Quantificação de colesterol e seus óxidos em queijos muçarela, prato e minas frescal. / Ellen Abreu da Cruz. - Itapetinga: UESB, 2014.

49p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes e co-orientação da Profa. D.Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão.

1. Produtos lácteos – Processamento - Análises Físico-Químicas. 2. Queijo muçarela, prato e minas frescal - Colesterol. 3. Queijo - Oxidos de colesterol. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. III. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. IV. Título.

CDD(21): 637.35

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Produtos lácteos – Processamento - Análises Físico-Químicas
2. Queijo muçarela, prato e minas frescal - Colesterol
3. Queijo - Oxidos de colesterol



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** "Quantificação de Colesterol e seus Óxidos em Queijos Muçarela, Prato e Minas Frescal."

**Autor (a):** Ellen Abreu da Cruz

**Orientadora:** Prof.º Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc.

**Co-orientador:** Prof.º Marco Antônio Sundfeld da Gama, DSc

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.º Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc., UESB

Prof.º Marco Antônio Sundfeld da Gama, DSc., EMBRAPA

Prof.ª Cristiane Patrícia de Oliveira, DSc., UESB

Data da Realização: 24 de fevereiro de 2014.

*À minha família, pelo carinho e prontidão.*

*À minha avó Elvira (Mainha), Deus tem escutado suas orações.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para suportar todas as vezes que pensei ser impossível.

Agradeço minha família por estar sempre presente principalmente na minha ausência.

Ao meu orientador Sérgio Fernandes e co-orientadora Sibelli Ferrão pela oportunidade.

À professora Simone Gualberto por ter me escutado e me entendido no momento que mais precisei. Meu muito mais que obrigada!

Aos queridos Rebeca Rosas, Vinícius Rotondano e Gabriel Chaves por disponibilizarem mais que suas horas para me ajudar e por acreditarem que isso iria dar certo.

Aos professores Rafael Fontan, Andrea Gomes, Paulo Bonomo, José Luiz Rech, Carmem Rech e todos outros que disponibilizaram um pouco dos seus tempos para me atender.

Aos membros da banca de defesa, Cristiane Patrícia Oliveira e Marco Antônio Sundfeld Gama, pela grande contribuição para o engrandecimento do trabalho.

À Mateus Brito, por me entender em todos os momentos e me fazer sorrir sempre.

À Laíse Teles e Lílian Carvalho pela amizade de sempre.

À Débora e Luciana por estarem presentes sempre que precisei, tirando todas minhas várias dúvidas.

À Samires e Julie, por terem me ajudado sempre que precisei.

À Samuel, Daniel e Pedro, pela disponibilidade e torcida.

Aos meus amigos que sempre acreditaram em mim.

À Cooleite e à Veneza por disponibilizar o material necessário para o desenvolvimento do meu trabalho e pelo incentivo ao meu crescimento.

Aos funcionários da Cooleite e Veneza por produzir e embalar os queijos, disponibilizando do seu tempo, em especial a Patrícia Rocha, por entender e me ajudar no que podia.

A todos que torceram e me ajudaram para que esse projeto pudesse ser realizado.

Obrigada!

## RESUMO

ABREU DA CRUZ, E. **Quantificação de colesterol e seus óxidos em queijos Muçarela, Prato e Minas Frescal**. Itapetinga-BA: UESB, 2014. 49p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Alimentos).\*

A condução do presente trabalho objetivou quantificar colesterol em amostras de leite e queijos e óxido de colesterol nas amostras de queijos. Os experimentos foram conduzidos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira. As amostras foram obtidas de um laticínio na cidade de Itapetinga-BA e de um na cidade de Nova Venécia-ES. Para os leites cru e pasteurizado foram feitas as análises físico-químicas acidez titulável, densidade, gordura, EST, ESD e análise de colesterol. Para os queijos foram realizadas as análises físico-químicas umidade, cinzas, gordura, nitrogênio total, GES, EST, determinação do colesterol e do óxido 7-cetocolesterol. Os dados obtidos para os leites foram analisados por meio do teste t. Para os queijos, foi utilizado o teste de média (Teste Tukey) a 5% de probabilidade. Observou-se redução no teor de gordura e EST, provavelmente em função da padronização (3%) que o leite sofre antes da pasteurização, para os leites para fabricação dos queijos Prato. Observou-se aumento no teor de colesterol do leite cru para o leite pasteurizado utilizado somente para a produção do queijo Muçarela. No entanto, entre os tratamentos (leite cru e leite pasteurizado) não foi verificada diferença significativa. Não houve diferença significativa para os parâmetros proteína e GES entre os três queijos analisados. O queijo Prato apresentou maior teor de colesterol, seguido do Muçarela e do Minas Frescal, com 111,50, 98,52 e 78,75 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. A relação colesterol/gordura não foi significativa entre os três queijos. Não foi detectada a presença do óxido 7-cetocolesterol nas amostras de queijo analisadas, indicando que o processamento não resultou na oxidação do colesterol.

Palavras-chave: produtos lácteos, colesterol, processamento, óxidos de colesterol.

---

\*Orientador: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadora: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, *D.Sc.*, UESB.

## ABSTRACT

ABREU DA CRUZ, E. **Cholesterol and its oxides quantification in Mozzarella, Prato and Minas Frescal**. Itapetinga-BA: UESB, 2014 49p. (Dissertation - Master in Food Engineering)\*.

The aim of this work was to evaluate the processing effect on the cholesterol content and 7-ketocholesterol oxide in of Mozzarella, Prato and Minas Frescal cheese samples. The experiment was carried out at the Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira. The milk and cheese samples, in triplicate, were from commercial dairys in Itapetinga-BA and NovaVenecia-ES. Were determined in raw and pasteurized milk: titratable acidity, density, fat, EST, ESD and the cholesterol content. In cheese were determined to moisture, ash, fat, total nitrogen, GES, EST, as well as the cholesterol content and 7-cetocolesterol. The results of the milk were analyzed by means of t-test and for the cheese was used the Tukey's Test at 5% of probability. The pasteurization decreased the fat and the EST content, probably due of milk's standardization at 3%. The pasteurization increased the milk cholesterol. The cheese's protein and GES content were not affected by treatments. The Prato cheese presented the higher cholesterol content, followed by the Muçarela and Minas Frescal, with 111.50, 98.52 and 78.75 mg. 100 g<sup>-1</sup>, respectively. The cholesterol/fat relation was not significant between the three cheeses. The 7-ketocholesterol was not found in the cheeses samples, indicating that the processing has not resulted in the cholesterol oxidation. The consumption of Mozzarella, Prato and Minas Frescal cheese, did not induced the ingestion of the oxides of the cholesterol.

Keywords : dairy products, cholesterol, processing, cholesterol oxides.

---

\* Advisor: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc., UESB and Co-advisor: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Bovinocultura Leiteira.....	12
2.2	Composição e Características Físico-Químicas do Leite de Vaca .....	13
2.3	Queijos.....	14
2.3.1	<i>Queijo Minas Frescal</i> .....	15
2.3.2	<i>Queijo Muçarela</i> .....	16
2.3.3	<i>Queijo Prato</i> .....	17
2.4	Colesterol .....	18
2.5	Oxidação do Colesterol .....	19
2.6	Óxidos de Colesterol .....	20
2.7	Óxidos de Colesterol em Leites e Derivados Lácteos.....	22
2.8	Métodos de Determinação de Colesterol e seus Óxidos.....	23
3	METODOLOGIA .....	25
3.1	Obtenção das Amostras .....	25
3.2	Processamento dos Queijos .....	26
3.3	Análises Físico-Químicas do Leite .....	26
3.3.1	<i>Acidez Titulável</i> .....	26
3.3.2	<i>Densidade</i> .....	27
3.3.3	<i>Depressão do Ponto de Congelamento</i> .....	27
3.3.4	<i>Teor de Gordura</i> .....	27
3.3.5	<i>Extrato seco total e desengordurado</i> .....	28
3.4	Análises Físico-Químicas dos Queijos .....	28
3.4.1	<i>Umidade</i> .....	28
3.4.2	<i>Cinzas</i> .....	28
3.4.3	<i>Teor de Gordura</i> .....	29
3.4.4	<i>Nitrogênio Total</i> .....	29
3.5	Determinação de Colesterol .....	30
3.5.1	<i>Extração do Colesterol</i> .....	30
3.5.2	<i>Análise Cromatográfica</i> .....	30
3.5.3	<i>Identificação dos Óxidos de Colesterol</i> .....	31
3.6	Análises Estatísticas .....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1	Análises do Leite.....	32
4.1.1	<i>Análises Físico-Químicas</i> .....	32
4.1.2	<i>Colesterol</i> .....	33
4.2	Análises dos Queijos.....	34
4.2.1	<i>Análises Físico-Químicas</i> .....	34
4.2.2	<i>Colesterol</i> .....	35
4.2.3	<i>Óxidos de Colesterol</i> .....	37
5	CONCLUSÕES .....	42
	REFERÊNCIAS .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é uma das mais importantes atividades econômicas do país. Todos os estados brasileiros participam da prática da cadeia produtiva do leite. A região Sudeste é a maior produtora de leite do Brasil, apresentando em 2012 um volume de aproximadamente 12 bilhões de litros de leite e o Nordeste ocupa a 4ª posição com um volume de aproximadamente 3,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2012).

O leite possui na sua composição uma infinidade de moléculas diferentes. Cada uma dessas moléculas desempenha uma função específica, fornecendo nutrientes ou proteção imunológica para o mamífero. O leite desempenha ainda função importante na dieta dos humanos, devido ao alto valor biológico de seus nutrientes (proteínas, lipídios, glicídios, minerais e vitaminas). Sendo o leite, matéria prima para uma grande variedade de produtos para a alimentação humana, suas diversas formas de processamento industrial permitem a fabricação de queijos.

O queijo é um concentrado lácteo composto de nutrientes essenciais como proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, muitos provenientes do leite. A sua fabricação está diretamente relacionada à produção de leite. O queijo permite uma validade mais longa do que o próprio leite como também facilidade de transporte e armazenamento. Variações na origem do leite, nas técnicas de fabricação e tempo de maturação, permitem a produção de uma imensa variedade de queijos, embora o seu processo básico de fabricação seja comum à maioria (PERRY, 2004).

Dentre a imensa variedade de queijos no mundo, os queijos Muçarela, Minas Frescal e Prato apresentam grande aceitação no Brasil. Estes diferenciam entre si de acordo com o processamento da massa, teores finais de gordura e umidade e período ideal de consumo. O queijo Muçarela é um queijo de massa semi-cozida e filada, de média, alta ou muito alta umidade, e extragordo, gordo a semigordo (BRASIL, 1997c). O queijo Minas Frescal é um queijo de massa fresca, semigordo, de alta umidade e por esse motivo, deve ser consumido num pequeno intervalo de tempo entre a produção e a comercialização (BRASIL, 1996). O queijo Prato é um queijo de massa semicozida, apresenta curta maturação, em torno de 45 a 60 dias e é classificado como um queijo gordo, de média umidade (GUTIERREZ et. al., 2004).

O queijo também traz na sua composição o colesterol. Presente em produtos de origem animal, como produtos lácteos, funciona como elemento estrutural de todas as membranas das

células e como um precursor dos ácidos biliares, hormônios esteróides e de vitamina D. Sua presença representa grande importância no organismo humano, pois este desempenha funções essenciais para a manutenção da vida humana (VARGAS, 2009). No entanto, o colesterol pode sofrer oxidação dependendo da severidade do processamento ou estocagem a que os alimentos são submetidos. Com isso, há a formação de óxidos de colesterol, os quais estão sendo relacionados com o desenvolvimento de aterosclerose, doenças coronárias e atividade mutagênica (ALINA et al., 2012).

Dessa forma, devido à importância que se tem dado à saúde do consumidor, principalmente quando relacionada com melhorias na alimentação, objetivou-se quantificar colesterol em amostras de leite e queijos e óxido de colesterol nas amostras de queijos.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Bovinocultura Leiteira**

A bovinocultura leiteira desempenha importante papel na cadeia agroindustrial nacional. Além de contribuir para a obtenção de diferentes tipos de alimento, também gera empregos e renda. Presente desde o processo de colonização do Brasil, a bovinocultura leiteira pode ser encontrada em todo o território brasileiro, sendo reconhecida como uma das mais importantes áreas do agronegócio (PEREIRA, 2009).

Em 2011, o rebanho bovino brasileiro alcançou aproximadamente 211 milhões de cabeças, com a região Nordeste apresentando quase 30 milhões de cabeças e o Estado da Bahia representando um terço do efetivo da região (IBGE, 2012). Atualmente, o Brasil ocupa a 4ª posição na produção mundial de leite, ultrapassando a marca de 32 bilhões de litros, ficando atrás somente dos Estados Unidos, Índia e China, ultrapassando a Rússia (EMBRAPA, 2013a). A Bahia apresentou um volume de produção de aproximadamente 1,1 bilhões de litros em 2012 com um efetivo de 2 milhões de vacas ordenhadas no mesmo ano (IBGE, 2012).

Em 2012 o consumo de lácteos cresceu 2,6%. Dentre os lácteos, o leite fluido (cru, pasteurizado ou UHT) e em pó, representam 68% do consumo. Com isso, o Brasil se destaca no consumo de leite fluido, ocupando a 4ª colocação, atrás apenas de Índia, Estados Unidos e Paquistão (EMBRAPA, 2013b).

Em 2013, o Brasil industrializou cerca de 24 bilhões de litros de leite cru (resfriado ou não), segundo a Pesquisa Trimestral do Leite. Ainda segundo a pesquisa, a Bahia industrializou aproximadamente 295 milhões de litros de leite no mesmo ano (IBGE, 2013).

Apesar de o Brasil apresentar grande rebanho leiteiro, sua produtividade ainda é baixa (1,382 t/cabeça/ano), comparada com países como Alemanha (7,236 t/cabeça/ano) e Estados Unidos (9,678 t/cabeça/ano). A Alemanha apresenta um rebanho 6 vezes menor que o brasileiro, mas, ainda assim, apresenta grande volume de produção, devido a sua alta produtividade. O mesmo ocorre com os Estados Unidos, que mesmo apresentando rebanho pequeno em relação ao brasileiro, é o líder mundial na produção de leite. No entanto, estudos indicam que apesar da produtividade do rebanho leiteiro brasileiro ainda ser baixa quando comparada com outros países, tem evoluído ao longo dos anos e contribuído para os incrementos crescentes na produção do país (EMBRAPA, 2013c).

## 2.2 Composição e Características Físico-Químicas do Leite

O leite é um produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias bem-alimentadas e descansadas, sendo descrito como produto da secreção das glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos. Entende-se como leite cru refrigerado, o leite mantido em temperaturas de 7 a 10°C, transportado da propriedade rural ao estabelecimento industrial adequado para ser processado, em caminhão tanque. Na Tabela 1 podemos encontrar os requisitos mínimos de qualidade que o leite deve apresentar, incluindo teor mínimo de 3,0 g.100 g<sup>-1</sup> de matéria gorda e mínimo de 2,9 g.100 g<sup>-1</sup> de proteínas (BRASIL, 2011).

**Tabela 1 Requisitos físicos e químicos do leite cru refrigerado.**

Requisitos	Limites
Matéria Gorda, g/100 g	Teor original. Com o mínimo de 3,0
Densidade relativa a 15/15°C g/mL	1,028 a 1,034
Acidez titulável, g ácido láctico/100 mL	0,14 a 0,18
Extrato seco desengordurado, g/100 g	Mín. 8,4
Índice Crioscópico	-0,530°H a -0,550°H (equivalentes a -0,512°C e a -0,531°C)
Proteínas, g/100 g	Mín. 2,9

**Fonte: Brasil (2011)**

O leite é composto por água, glicídios (basicamente lactose), gordura, proteína (principalmente caseína e albumina), minerais e vitaminas, sendo produzido na glândula mamária. É considerado como uma emulsão de glóbulos de gordura e uma suspensão, em fase aquosa, de micelas de caseína (caseína, cálcio, fósforo), com moléculas de lactose em solução, proteínas do soro do leite e alguns minerais (GONZÁLEZ, 2001).

Após a fase colostrar, o leite apresenta características físico-químicas quase constantes. No entanto, fatores como alimentação, estágio de lactação, raça, doenças, medicação, idade e, individualidade do animal, provocam alterações em seus constituintes (JENSEN, 1995).

O leite é composto por aproximadamente 87% de água e 13% de elementos sólidos, (lipídios 4,0%, proteínas 3,3%, lactose 4,6% e minerais 0,7%) (WALSTRA et al., 2006), contudo esta composição varia (Tabela 2).

Como se observa na Tabela 2, as características do leite no Brasil (SANTOS et al., 2001; OLIVEIRA, 2010; AQUINO et al., 2007), quando comparadas com a literatura

internacional (CEBALLOS et al., 2009; HARDING, 1995; AMIOT, 1991) são similares. Assim, no Brasil o teor de gordura varia entre 3,1% e 3,9%, a proteína entre 3,4% e 3,5%, a lactose entre 4,6% e 5% e a água entre 87% e 88%. Por sua vez, no exterior a gordura varia entre 3,4% e 3,7%, a proteína entre 2,8% e 3,4%, a lactose entre 4,5% e 4,8% e a água entre 87% e 89%.

**Tabela 2 Principais componentes do leite de vaca**

Fonte	Componentes (%)			
	Água	Gordura	Proteína	Lactose
<b>Brasil</b>				
Santos e outros (2001)	87	3,9	3,4	4,8
Oliveira (2010)	87	3,8	3,5	5,0
Aquino e outros (2007)	88	3,1	3,4	4,6
<b>Exterior</b>				
Amiot (1991)	-	3,7	3,4	4,8
Ceballos e outros (2009)	89	3,4	2,8	4,5
Harding (1995)	87	3,9	3,2	4,6

### 2.3 Queijos

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996):

“Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.”

Ainda, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996), estes são classificados quanto ao conteúdo de matéria gorda e umidade (Tabela 3).

**Tabela 3 Classificação dos queijos quanto à matéria gorda e umidade.**

Classificação em	Porcentagem
<b>Matéria gorda</b>	
Extra gordo ou duplo creme	>60
Gordos	45-59,9
Semigordo	25-44,9
Magros	10-24,9
Desnatados	<10
<b>Umidade</b>	<b>Porcentagem</b>
Baixa umidade	<35,9
Média umidade	36-45,9
Alta umidade	46-54,9
Muito alta umidade	>55

Fonte: Brasil (1996)

Assim, de acordo com a matéria gorda, os queijos podem ser classificados como extra gordo ou duplo creme quando apresentam teor de gordura igual ou superior a 60%; os queijos gordos devem apresentar teor de gordura entre 45% e 59,9%; semigordos, gordura entre 25% e 44,9%; magros, gordura entre 10% e 24,9% e os desnatados com gordura inferior a 10%.

Por sua vez, a umidade também participa da classificação. Dessa forma, quando a umidade é menor que 35,9% estes são classificados como de baixa umidade; média umidade quando a umidade está entre 36% e 45,9%; alta umidade, quando a umidade está entre 46% e 54,9% e muito alta umidade, quando a umidade é maior que 55%.

### **2.3.1 Queijo Minas Frescal**

Dentre os produtos de laticínios fabricados no Brasil o queijo Minas Frescal é um dos mais difundidos, e, devido a facilidade na sua fabricação, pode ser encontrado em todo o país. (FURTADO et al., 1980).

O queijo Minas Frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. Classifica-se como queijo semigordo de alta umidade a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5 Kg, a ser consumido fresco (BRASIL, 1997a). Em 2004, por meio da Instrução Normativa nº 44, o Ministério da Agricultura, (BRASIL, 2004), corrigiu a classificação da umidade, considerando como queijo semigordo (25 a 44% de gordura no extrato seco) de muito alta umidade (não inferior a 55%).

Elaborado a partir do leite, sua principal característica é o sabor pouco ácido. Queijos frescos, brancos e leves que são submetidos a um processamento mínimo antes de serem embalados são altamente perecíveis e por isso, apresentam vida útil curta, em torno de 9 dias, mesmo sob refrigeração (HOFFMAN et al., 2002, SILVA et al., 2003; PERRY, 2004).

Para manter sua alta concentração de umidade, durante a sua elaboração a coalhada é cortada em cubos muito grandes, portanto com pouca separação do soro (FURTADO, 2005). Durante a comercialização, é comum a observação de depósito de soro exsudado na embalagem do queijo Minas Frescal, isso devido a sua alta umidade e por não ser prensado (PINTO et al., 2011). Desta forma, a refrigeração durante sua comercialização é um fator importante.

Com a evolução das técnicas industriais, a tecnologia de fabricação do Minas Frescal sofreu modificações, visando tanto a melhoria da qualidade do produto, quanto o aumento no rendimento. Dentre estas modificações estão a fabricação com leite pasteurizado, o uso de cloreto de cálcio e emprego de culturas lácticas (FURTADO et al., 1980).

### **2.3.2 Queijo Muçarela**

Entende-se por Queijo Muçarela, o queijo obtido por meio da coagulação do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes, formando uma massa acidificada, que pode ser complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1996).

Em função do teor de umidade (máximo de 60%) e matéria gorda em extrato seco (mínimo de 35%) é classificado em média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo a semigordo, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997c).

Devido a grandes variações nos métodos de fabricação, a Muçarela do Brasil possui uma composição físico-química bastante irregular. Isso se deve a falta de padrões legais. A sua composição varia, em média, de cerca de 43% a 46% de umidade e entre 40% a 45% de gordura no extrato seco (GES) (FURTADO, 1997).

A fabricação do queijo Muçarela teve início em meados do século XVI, na Itália. Era fabricado exclusivamente com leite de búfala, porém devido à escassez dessa matéria prima, a Muçarela começou a ser fabricada misturando ao leite de búfala, o leite de vaca. Aos poucos a fabricação do queijo, começou a ser feita exclusivamente com o leite de vaca. É um queijo

macio, não maturado, levemente salgado, branco ou levemente amarelado, podendo ser encontrado em diversos formatos e tamanhos (CANSIAN, 2005).

Segundo Perry (2004), o queijo Muçarela é produzido com leite pasteurizado, com teor de gordura normalizado. Passa pela operação de filagem, onde a massa, após a dessoragem, é fatiada, aquecida e misturada até formação de um bloco liso e homogêneo de consistência firme. Apresenta variação quanto ao peso e formato, devendo ser mantido sob refrigeração, em temperaturas de até 10 °C.

Estes produtos lácteos, além de serem preparados de leites de diferentes ruminantes, podem ser fabricados de acordo com procedimentos tradicionais (culturas naturais ou adição de fermento) ou usando leite pasteurizado e fermentos comerciais de bactérias lácteas. Além disso, o queijo Muçarela é também conhecido por ser produzido por acidificação direta com ácido láctico, ácido cítrico ou glucano-d-lactona (PARENTE et al., 1997).

### **2.3.3 Queijo Prato**

O queijo Prato é um queijo maturado muito consumido no Brasil, principalmente como ingrediente em lanches. É um queijo gordo, de média umidade, que apresenta massa semicozida e lavada, o que lhe confere consistência semidura e elástica. Geralmente é um queijo fechado, porém, pode apresentar olhaduras (buracos no queijo). Pode ser apresentado com outras denominações de acordo com o seu formato: retangular (Lanche), cilíndrico (Cobocó), redondo (Prato Bola), quadrado com 5 a 6 quilos (Estepe) (BRASIL, 1997b).

Foi introduzido na região sul de Minas Gerais, por imigrantes dinamarqueses, sendo originado dos queijos de massa lavada Dambo dinamarquês e Gouda holandês. No Brasil, foram feitas algumas adaptações em relação aos queijos que lhe deram origem, o que lhe confere algumas diferenças de sabor e textura (GARCIA et al., 2009). A tecnologia empregada para a elaboração do queijo Prato, com algumas adaptações, utiliza leite pasteurizado, adição de ingredientes (coalho e fermento), coagulação, corte da coalhada, aquecimento da massa até 41°C, dessoragem, prensagem, corte da massa e enformagem (FURTADO; WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

Segundo Dender e outros (1986), um aspecto muito importante na fabricação do queijo Prato é o processo de maturação, pois é nessa etapa que o produto adquire as suas características sensoriais peculiares. Realizada em condições de temperatura e umidade controladas, ocorrem nesta fase reações bioquímicas que conferem alterações de sabor, odor,

textura e consistência dos queijos novos, transformando-os em um produto macio e de odor e sabor característicos.

## 2.4 Colesterol

O colesterol é um esteroide obtido por meio da ingestão de alimentos de origem animal ou por síntese endógena (responsável por fornecer aproximadamente 70% do colesterol do organismo humano). É um constituinte estrutural de todas as membranas celulares, precursor dos ácidos biliares, hormônios e de vitamina D. Os principais órgãos responsáveis pela sua produção são o fígado e o intestino (BRAGAGNOLO, 2001; VARGAS, 2009).

No leite, o colesterol situa-se na membrana que envolve o glóbulo de gordura, constituindo o principal esteroide do leite. O colesterol é introduzido no leite durante a pinocitose das gotículas lipídicas e através da membrana plasmática dentro do lúmen do alvéolo. Devido a sua presença na membrana do glóbulo de gordura, sua concentração no alimento lácteo está relacionada com o conteúdo de gordura (FENNEMA, 2000).

Segundo Saldanha, Mazzalli e Bragagnolo (2004), a média dos teores de colesterol obtidos pelos métodos enzimático e cromatográfico é de 9,7 mg.100 g<sup>-1</sup> para amostras de leite. Bauer et. al. (2014) encontrou valores de colesterol entre 4,28 a 8,87 mg.100 mL<sup>-1</sup> de colesterol no leite cru. Amaral e outros (2008) relatam valores variando entre de 11,2 mg.100 mL<sup>-1</sup> e 9,6 mg.100 mL<sup>-1</sup>, em bovinos europeus.

O corpo humano necessita de pequenas quantidades de colesterol, pois este participa de importantes funções biológicas como a síntese de hormônios. No entanto, altas concentrações no sangue aumentam o risco de doenças cardíacas (PUOCI et. al., 2008). Por esse motivo, a presença do colesterol na dieta humana tem chamado à atenção. O colesterol tem sido relacionado como sendo um dos fatores que levam a formação da arterosclerose em humanos (LARSEN, 2012).

Segundo a tabela “Dietary Reference Intakes: Macronutrients” da USDA (USDA, 2014), não existe uma quantidade diária estabelecida para o colesterol, porém, a ingestão deve ser minimizada por meio de uma dieta nutricionalmente adequada. Já a FDA (FDA, 2014), por meio do CFR (Code of Federal Regulations Title 21), preconiza que o valor diário para a ingestão de colesterol em uma dieta de 2000 calorias deve ser de até 300 mg. Um copo de leite integral contém aproximadamente 30 mg de colesterol, enquanto em leites com 2% de

gordura e em leites desnatados o conteúdo é de 15 e 7 mg/copo, respectivamente. Sendo assim, produtos derivados do leite são uma fonte moderada de colesterol (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2005).

Embora o colesterol seja sintetizado na sua maior parte no interior do corpo, as fontes alimentares podem contribuir para o valor total na célula. Então, o conhecimento do valor de colesterol presente nos alimentos para uma melhor seleção pode ser uma alternativa para reduzir a concentração de colesterol total no corpo. Dessa forma, o alto consumo de produtos lácteos no mundo ocidental representa uma fração considerável do colesterol dietético (LARSEN, 2012).

## **2.5 Oxidação do colesterol**

O colesterol, por ser um álcool insaturado, está suscetível a oxidação, sendo este processo influenciado por vários fatores, como a presença de luz, oxigênio e temperatura. A formação de óxidos de colesterol (OsC) está relacionada com diversas atividades biológicas como distúrbio do metabolismo do colesterol, processos citotóxicos, angiotoxícos, aterogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2002; OSADA et. al., 1993; RAZZAZI-FAZELIA; KLEINEISENB; LUFB, 2000).

Alguns óxidos de colesterol são produzidos de forma endógena nos tecidos humanos durante a conversão em ácidos biliares e hormônios esteroides. Possuem estrutura semelhante à do colesterol, no entanto, apresentam um grupo funcional adicional que pode ser uma hidroxila, cetona ou um grupo epóxido, no núcleo esteroidal ou na cadeia lateral da molécula (SAVAGE; DUTTA; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002). Os óxidos de colesterol também podem ser encontrados nos alimentos, principalmente naqueles com alto teor de colesterol, produzidos por mecanismos não-enzimáticos, conhecidos como auto-oxidação, peroxidação lipídica e oxidação fotoquímica, sendo a auto-oxidação o mais significativo.

A auto-oxidação do colesterol inicia-se pela formação de um radical livre no carbono alílico na posição 7, devido à radiação ou outros radicais. Este radical reage com o oxigênio molecular triplete formando peróxidos. A auto-oxidação do colesterol se assemelha à oxidação lipídica, devido à formação de peróxidos e outros produtos de degradação, através de reações com radicais livres (MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2002; GUARDIOLA et al., 1995).

A peroxidação lipídica forma os mesmos óxidos de colesterol que a auto-oxidação no anel B do colesterol (7-OH, 7-cetocolesterol, 5,6-epóxido e Triol). O início da peroxidação está vinculado a processos oxidativos formando hidroperóxidos ou peróxidos cíclicos dos lipídios capazes de iniciar a oxidação do colesterol, o que a diferencia da auto-oxidação (GUARDIOLA et al., 1995).

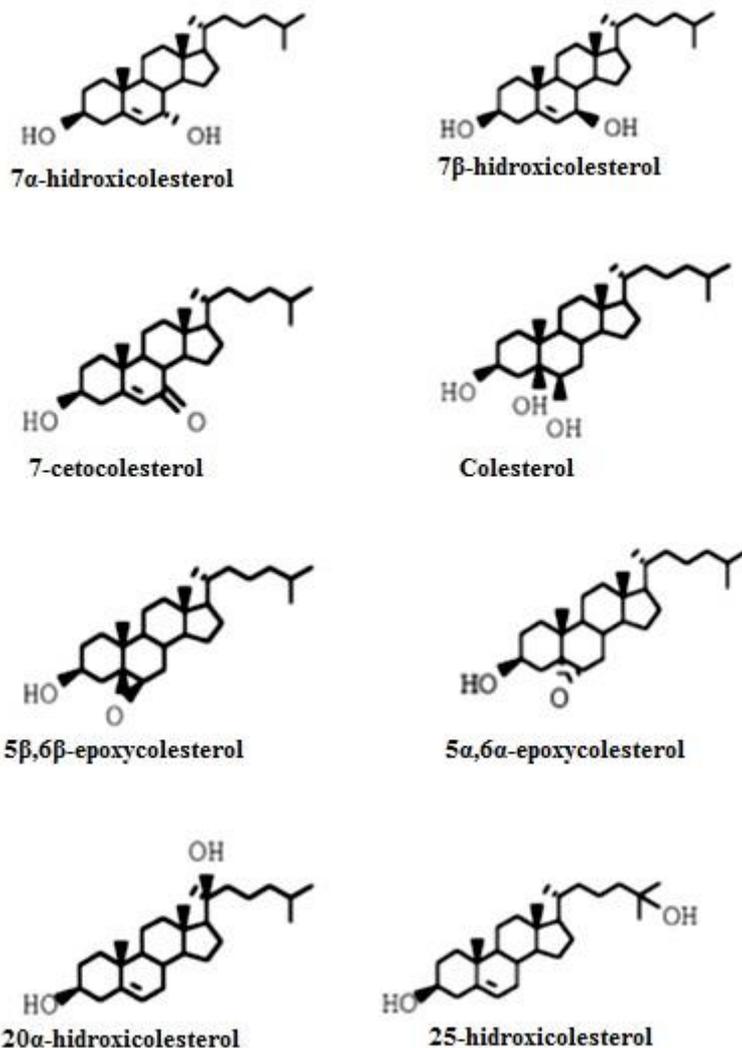
Na oxidação fotoquímica o colesterol é oxidado pelo oxigênio molecular singlete. Os alimentos absorvem energia em forma de radiação, que é transferido para o oxigênio triplete, dando origem a uma forma mais ativa de oxigênio, o oxigênio singlete. Assim, formam-se hidroperóxidos que se decompõem, gerando o 7-cetocolesterol e o 7-OH (MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2002).

Os humanos podem absorver os óxidos de colesterol através da alimentação, sendo encontrados principalmente em produtos de ovos, carnes, lácteos e marinhos, porém foi observado que alimentos frescos apresentam apenas traços ou não apresentam esses compostos (ANGULO et al., 1997; MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2002; RAZZAZI-FAZELIA; KLEINEISENB; LUFB, 2000). Sendo o processo de aquecimento o mais utilizado em processamento de alimentos, torna-se importante o estudo deste efeito sobre a formação dos óxidos de colesterol. Estudos têm demonstrado que esses compostos são mais perigosos para as células arteriais que o colesterol, estando diretamente ligados a aterosclerose, doenças coronárias e atividade mutagênica (ALINA et al., 2012; OSADA et al., 1993; RAZZAZI-FAZELIA; KLEINEISENB; LUFB, 2000; MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2002; NOUROOZ-ZADEH; APPELQVIST, 1988).

## **2.6 Óxidos de Colesterol**

Mais de 80 produtos da oxidação do colesterol foram identificados, sendo o 7-cetocolesterol, o 20-hidroxicolesterol, o 25-hidroxicolesterol, o 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, os 5,6-colesterol-epóxidos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e o colestanoetriol, os mais comumente encontrados nos alimentos (Figura 1) (ALINA et al., 2012; ANGULO et al., 1997; MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2002). De uma forma geral, o 7-cetocolesterol ocorre em concentrações mais altas em muitos alimentos, em função disso, tem sido considerado como possível indicador da oxidação do colesterol (TENUTA-FILHO et al., 2003; MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2002).

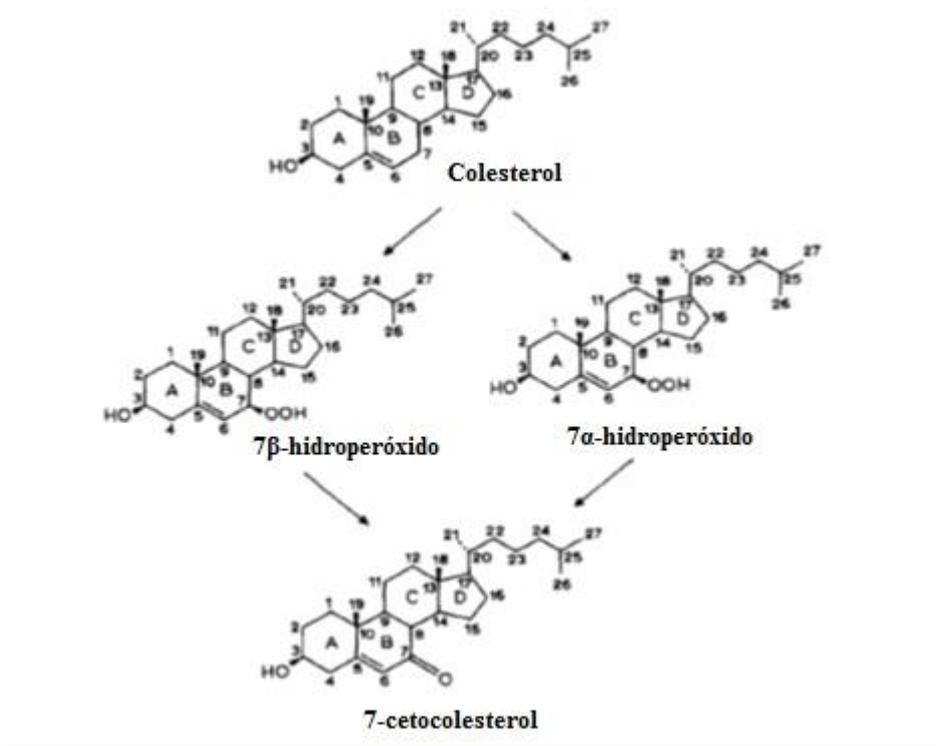
Figura 1. Estrutura dos principais óxidos de colesterol encontrados em alimentos.



Fonte: SAVAGE, DUTTA, RODRIGUEZ-ESTRADA (2002).

O 7-cetocolesterol é formado durante o aquecimento dos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$  do 7-hidroperoxicolesterol (Figura 2), bastante encontrado nos alimentos, o que provoca sua desidratação (TAI; CHEN; CHEN, 1999). Em função disso, tem sido proposto usá-lo como indicador da oxidação do colesterol (MORALES-AIZPÚRUA; TENUTA-FILHO, 2005).

**Figura 2 Formação do 7-cetocolesterol.**



Fonte: BOSINGER; LUF; BRANDL (1993).

## 2.7 Óxidos de Colesterol em Leites e Derivados Lácteos

O leite e seus derivados lácteos participam de um importante grupo na nutrição humana. Além de poderem ser consumidos puros, podem fazer parte como ingredientes de grande variedade de refeições.

Em geral, os produtos lácteos representam uma modesta fonte de óxidos de colesterol na dieta humana. Os óxidos 25-hidroxicolesterol, os epímeros de 7-hidroxicolesterol ( $\alpha$  e  $\beta$ ), o 7-cetocolesterol, os 5,6-colesterol-epóxidos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e o colestanoetriol (Triol) são os detectados em maior quantidade (HUR; PARK; JOO, 2007; NOUROOZ-ZADEH; APPELQVIST, 1988)

O leite fresco e produtos lácteos frescos apresentam baixa probabilidade de formação de óxidos de colesterol, uma vez que o meio é líquido e o teor de oxigênio é baixo (HUR; PARK; JOO, 2007). Os produtos lácteos podem apresentar uma resistência considerável a auto-oxidação do colesterol, mesmo após um prolongado período sobre condições adversas. Isso pode ser possível devido às características de baixa transição do conteúdo de metais, baixo nível de colesterol e gordura saturada (ADDIS; PARK, 1992; ANGULO et al, 1997).

Entretanto, o leite e os produtos lácteos são submetidos a diferentes operações durante o seu processamento, o que pode incluir tratamentos térmicos moderados ou severos, podendo

levar a indesejáveis mudanças nos lipídios ou proteínas. Variações no tratamento térmico podem levar a produção de óxidos de colesterol em produtos lácteos (AL-ROWAILY, 2008). Estudos indicam a formação, mesmo que pequena de óxidos de colesterol em leite aquecido a diferentes binômios de tempo e temperatura, variando de pasteurização a UAT (Ultra Alta Temperatura), assim como em queijos e manteigas submetidos a altas temperaturas durante o processamento apresentaram uma quantidade detectável de óxidos de colesterol (SIEBER, 2005; AL-ROWAILY, 2008; SAVAGE; DUTTA; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002; NOUROOZ-ZADEH; APPELQVIST, 1988). O 7-cetocolesterol foi encontrado em maior concentração em produtos de leite em pó do que em gema de ovo em pó (HUR; PARK; JOO, 2007).

Vários estudos foram feitos em relação à formação de óxidos de colesterol em produtos lácteos submetidos a aquecimento após o seu processamento, como queijos derretidos e manteigas aquecidas a diferentes temperaturas (NOUROOZ-ZADEH; APPELQVIST, 1988; ROSE-SALLIN et al., 1997; HUR; PARK; JOO, 2007; FINOCCHIARO; LEE; RICHARDSON, 1984). No entanto, não foi encontrada nenhuma referência à influência do processamento durante a fabricação dos produtos lácteos. Os três tipos de queijos estudados no presente trabalho apresentam diferentes formas de processamento, sendo estes estudados.

## **2.8 Métodos de Determinação de Colesterol e seus Óxidos**

Vários têm sido os estudos sobre a determinação de colesterol em alimentos. Colorimetria, cromatografia gasosa (CG) com ou sem a combinação com espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são alguns dos métodos mais utilizados (PUOCI, et. al., 2008; LARSEN, 2012).

A análise por cromatografia gasosa foi utilizada por bastante tempo como a melhor metodologia para a determinação de colesterol em alimentos. Essa análise exige a extração dos lipídios, saponificação e derivatização. No entanto, as etapas de extração e saponificação são complexas e os reagentes da derivatização são instáveis. Além disso, o colesterol pode ser destruído termicamente devido às altas temperaturas exigidas durante a separação na CG, podendo, ainda, formar compostos indesejáveis (OH; SHIN; CHANG, 2001; BAUER et. al., 2014).

Dessa forma, a determinação de colesterol por CG foi gradualmente substituída por CLAE. Apesar da fraca absorção do colesterol em baixos comprimentos de onda, diminuindo a detecção e dificultando a quantificação, além de elevados volumes de solventes para análise, a preparação da amostra para utilização na CLAE é mais simples, podendo utilizar basicamente saponificação e escolha de solventes de extração (BAUER et al., 2014; OH; SHIN; CHANG, 2001). Além disso, a CLAE utiliza temperaturas menores e tempos mais curtos de análise (MAZALLI et al., 2006).

A determinação simultânea do colesterol e seus óxidos é complexa, principalmente devido à instabilidade do colesterol e a estrutura dos óxidos de colesterol ser bastante similar à do colesterol. Com isso, os métodos devem ser desenvolvidos criteriosamente para que haja maior detecção dos compostos e redução do aparecimento de compostos indesejáveis. Alguns estudos podem ser encontrados na literatura para a determinação simultânea do colesterol e seus óxidos, através de CLAE com diferentes alternativas de extração (BAUER et al., 2014; AHN et al., 2012; MAZALLI et al., 2006).

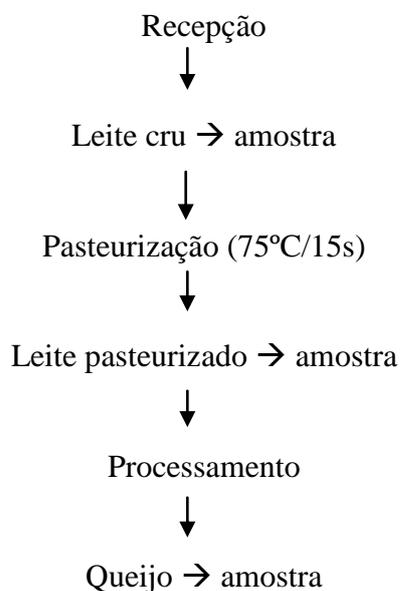
### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção das Amostras

Foram obtidas amostras de leite e queijo de dois laticínios. As amostras do queijo Minas Frescal e seu respectivo leite (cru e pasteurizado) foram obtidos no município Itapetinga-BA, nos meses de setembro e outubro. Os queijos Muçarela e Prato e seus respectivos leites (cru e pasteurizado) foram obtidos em um laticínio na cidade de Nova Venécia-ES, no mês de outubro. Para a obtenção das amostras do leite pasteurizado, a adição dos ingredientes coalho e fermento foram atrasados, sendo adicionados quando os tanques já estavam com um pouco mais de 50% de sua capacidade. Foram coletadas 3 repetições dos leites e queijos e as análises feitas em triplicata.

Após a obtenção das amostras de leite, as mesmas foram armazenadas em recipientes apropriados, previamente higienizados. Destas amostras foram feitas análises físico-químicas e, em seguida, foram congeladas. As amostras de queijo foram coletadas já embaladas, sendo então congeladas até o momento das análises, excluindo, dessa forma, o período de maturação. Os experimentos foram realizados na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* Juvino Oliveira, em Itapetinga-BA, nos laboratórios LAPRON (Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais), CEACROM (Centro de Estudos e Análises Cromatográficas) e Laboratório de Leite.

**Figura 3. Fluxograma de obtenção das amostras.**



### 3.2 Processamento dos Queijos

Na tabela 4 encontram-se as condições de processamento dos queijos Prato, Muçarela e Minas Frescal.

**Tabela 4 Condições de processamento dos queijos Prato, Muçarela e Minas Frescal**

Variáveis	Queijos		
	Prato	Muçarela	Minas Frescal
Temperatura do leite	32°C	33°C	33°C
Temperatura de aquecimento	41°C	41°C	36°C
Tempo de coagulação	40 min.	30 min.	30 min.
Tempo de mexedura	20 min.	15 min.	15 min.
Número de grãos	03	02	02
Tempo de prensagem	17 min.	15 min.	-
Temperatura de filagem	-	87°C	-
Tempo de filagem	-	3 min.	-
Tempo total	1h30min	1h15min	1h

### 3.3 Análises Físico-Químicas do Leite

Todas as análises foram realizadas em triplicata e seguiram as metodologias descritas por BRASIL (2006).

#### 3.3.1 Acidez Titulável

Foram transferidos 10 mL da amostra para o béquer e adicionados 4 - 5 gotas da solução de fenolftaleína a 1 % e titulado com a solução Dornic, até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 1: Acidez (°Dornic)} = V \times f \times 10$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,11 N ou N/9.

10 = transformação de ácido láctico para grau Dornic.

### **3.3.2 Densidade**

Foram transferidos para uma proveta cerca de 500 mL de leite evitando incorporação de ar e formação de espuma, e em seguida introduzido o termolactodensímetro perfeitamente limpo e seco na amostra, deixando flutuar por 1 a 2 minutos. Foi feita a leitura da densidade na cúspide do menisco.

### **3.3.3 Depressão do Ponto de Congelamento**

A determinação do índice crioscópico foi realizada em crioscópio eletrônico digital (Marca LAKTRON). Foi realizada a calibração com os padrões na mesma temperatura das amostras. Para a realização de cada teste, foram colocados 2,5 mL de leite em um tubo de ensaio específico do aparelho de crioscopia. Após um período de leitura, o crioscópio indica o índice medido na escala Hortvet.

Equivalência entre as escalas Hortvet (°H) e Celsius(°C)

$$T(^{\circ}\text{C}) = 0,9656 \times T(^{\circ}\text{H})$$

$$T(^{\circ}\text{H}) = 1,0356 \times T(^{\circ}\text{C})$$

### **3.3.4 Teor de Gordura**

Foram adicionados ao butirômetro 10 mL da solução de ácido sulfúrico e 11 mL de amostra homogeneizada, lentamente e pela parede deste, para evitar sua mistura com o ácido. Foi acrescentado 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi agitado de modo a promover a mistura completa dos líquidos no interior do aparelho, tomando precauções para evitar acidentes e mantendo o polegar sobre a tampa. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos de 1000 a 1200 rpm e transferida para banho-maria a 65 °C por 5 minutos. A leitura da porcentagem de gordura foi feita diretamente na escala do aparelho e na base do menisco formado pela camada de gordura, imediatamente após retirar o aparelho do banho-maria.

### **3.3.5 Extrato Seco Total e Desengordurado**

O extrato seco total foi determinado através da utilização do disco de Ackermann por meio dos valores de densidade e do teor de gordura. Obteve-se a porcentagem de extrato seco desengordurado, subtraindo da porcentagem de extrato seco total a porcentagem de gordura da amostra.

## **3.4 Análises Físico-Químicas dos Queijos**

Todas as análises foram realizadas em triplicata e seguiram as metodologias descritas por BRASIL (2006).

### **3.4.1 Umidade**

Cadinhos foram secos em estufa a  $102 \pm 2$  °C durante 1 hora. Foram esfriados em dessecador e pesados. Foram pesados 5 gramas da amostra e levada para a estufa a  $102 \pm 2$  °C por 3 horas, quando se efetuou a primeira pesagem. Após esse tempo, as pesagens passaram a ser realizadas de hora em hora até massa constante. Posteriormente, os cadinhos com as amostras foram resfriados em dessecador e logo após pesados. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 2:

Equação 2: % umidade e voláteis =  $100 \times \frac{m}{m'}$  sólidos totais =  $100 - \% \text{ umidade e voláteis}$   
Onde: m = perda de massa em gramas; m' = massa da amostra em gramas.

### **3.4.2 Cinzas**

Foram utilizados os cadinhos com as amostras da análise de umidade. Os cadinhos com as amostras previamente pesadas foram incinerados por 3 horas ou até obtenção de cinzas totalmente brancas. Os cadinhos foram esfriados em dessecador e pesados. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 3:

Equação 3: % cinzas =  $(m_2 - m_1) \times 100 / m_0$

Onde:

$m_2$  = massa do cadinho com amostra após incineração, em gramas;

$m_1$  = massa do cadinho vazio, em gramas;

$m_o$  = massa da amostra, em gramas.

### 3.4.3 Teor de Gordura

Foram pesados exatamente 3 g da amostra homogeneizada diretamente no copo do butirômetro e acoplado à parte inferior de forma a ficar bem vedado. Em seguida foram adicionados cerca de 5 mL de água, 10 mL da solução de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi transferido para banho-maria a 65 °C para auxiliar na dissolução da amostra. O butirômetro foi tampado e agitado até total dissolução da amostra e adicionou-se água até a última marcação deste. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm e lida a porcentagem de gordura diretamente na escala do butirômetro.

### 3.4.4 Nitrogênio Total

Foi utilizado o procedimento de Micro-Kjeldahl. Para a digestão ou mineralização, foi pesado em balança analítica 0,25 g da amostra e transferida para tubo de Kjeldahl. Utilizou-se 2,5 g de mistura catalítica e 7 mL de ácido sulfúrico p.a.. A mistura foi aquecida em bloco digestor, aumentando gradativamente a temperatura gradativamente até atingir 400°C. Quando o líquido se tornou azul-esverdeado, esperou-se esfriar e foi acrescentado 10 mL de água. A mistura foi então destilada, acrescentando-se NaOH 50%, e misturado em um erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4% com 4 a 5 gotas de de solução de indicador misto até volume de 100 mL. A solução foi titulada com solução de ácido clorídrico 0,1 N até a viragem do indicador. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 4 e Equação 5:

Equação 4: % nitrogênio total =  $V \times N \times f \times 0,014 \times 100 m$

Equação 5: % protídios = % nitrogênio total x F

Onde:

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,1 N, ou solução de ácido clorídrico 0,1 N, gasto na titulação

após a correção do branco, em mL;

N = normalidade teórica da solução de ácido sulfúrico 0,1 N ou solução de ácido clorídrico 0,1 N;

f = fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1 N ou solução de ácido clorídrico 0,1 N;

m = massa da amostra, em gramas;

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína, F = 6,38.

### **3.5 Determinação de Colesterol**

#### **3.5.1 Extração do Colesterol**

A obtenção da matéria insaponificável foi realizada através da saponificação da gordura do leite e queijo e posterior extração com hexano, segundo Saldanha e outros (2006), com modificações baseadas em Saldanha, Mazalli e Bragagnolo (2004), sendo que todos os reagentes utilizados nestas etapas foram de grau analítico.

Foram pesados aproximadamente 0,5 g das amostras de queijo e 10 mL das amostras de leite. Nas amostras de queijo foram adicionados 4 mL de solução aquosa de KOH a 50% e 6 mL de álcool etílico; nas amostras de leite foram adicionados 8 mL de solução aquosa de KOH a 50% e 12 mL de álcool etílico. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto e deixadas em repouso durante 22 horas no escuro à temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de hexano, nas amostras de leite, seguindo o mesmo procedimento para as amostras de queijo, agitando em vórtex por 5 minutos. Houve a separação de fases e foi coletada a fase hexânica, que foi seca em evaporador rotatório a temperatura ambiente. Restando somente o extrato, este foi dissolvido em 2 mL de fase móvel (grau de pureza CLAE) e filtrado com filtro de seringa (0,45 µm), sendo armazenados em ependorfs identificados até o momento da análise.

#### **3.5.2 Análise Cromatográfica**

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, com sistema quaternário de solventes, válvula de injeção com alça de amostragem de 20µL, forno de coluna e detector de arranjo de diodos. O colesterol foi separado em coluna analítica C<sub>18</sub> (15 cm x 6 mm di x 5µm). Foi utilizada solução de acetonitrila e isopropanol (85:15 v/v) como eluente, na vazão

de 2 mL.min<sup>-1</sup>, sendo a temperatura do forno ajustada para 40 °C e o tempo de análise de 12 min.

Os solventes utilizados foram grau cromatográfico, filtrados e degaseificados antes do uso. Os cromatogramas foram processados a 202 nm. O colesterol foi tentativamente identificado através da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o do padrão colesterol (Cholesterol, cód. C8667 - Sigma-Aldrich®) e também pelo comprimento de onda característico de cada substância. As injeções foram realizadas em triplicata e as áreas dos picos do colesterol foram determinadas através do software LCSolution®.

A quantificação foi feita integrando-se as áreas dos picos obtidos e calculada sua concentração através de uma equação de reta obtida através da curva padrão do padrão de colesterol, construída entre 2 e 2000 ppm.

A validação do método para a quantificação do colesterol e óxidos foi efetuada anteriormente por Bauer (2013).

### **3.5.3 Identificação dos Óxidos de Colesterol**

Foi realizada a identificação do colesterol e dos óxidos tentativamente por meio da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o tempo de retenção dos picos dos padrões e também pelo comprimento de onda característico de cada substância. Os cromatogramas foram processados a 227 nm para o 7-cetocolesterol. Utilizou-se o padrão 7-cetocolesterol (5-Cholesten-3β-ol-7-one, cód. C2394), da Sigma-Aldrich®.

### **3.6 Análises Estatísticas**

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos para os leites foram analisados por meio do teste t pareado através do pacote estatístico do Excel. Para os queijos, foi utilizado o teste de média (Teste Tukey) a 5% de probabilidade através do programa estatístico SAS (1996).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises do Leite

#### 4.1.1 Análises Físico-Químicas

Na Tabela 5 estão apresentadas as médias dos resultados das análises físico-químicas dos leites cru e pasteurizado para fabricação do queijo Prato, Muçarela e Minas Frescal. Observou-se redução no teor de gordura ( $p < 0,05$ ), provavelmente em função da padronização (3%) que o leite sofre antes da pasteurização, para os leites para fabricação dos queijos Prato. Ocorreu redução ( $p < 0,05$ ) nos valores do EST para o mesmo leite.

**Tabela 5 Concentração média das variáveis físico-químicas dos leites cru e pasteurizado para fabricação do queijo Prato, Muçarela e Minas Frescal.**

Variáveis	Leite para fabricação do queijo Prato		P
	Cru (n=9)	Pasteurizado (n=9)	
Acidez (°D)	14,56 ± 0,50	14,33 ± 0,47	0,6349
Densidade (15/15°C g/L)	1031,62 ± 0,38	1031,27 ± 0,25	0,4226
Gordura (%)	3,49 ± 0,02	3,08 ± 0,08	0,0141
EST (%)	12,35 ± 0,10	11,77 ± 0,15	0,0383
ESD (%)	8,85 ± 0,10	8,68 ± 0,07	0,2028
Variáveis	Leite para produção do queijo Muçarela		P
	Cru (n=9)	Pasteurizado (n=9)	
Acidez (°D)	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	-
Densidade (15/15°C g/L)	1031,71 ± 0,41	1031,18 ± 0,70	0,4631
Gordura (%)	3,37 ± 0,14	3,11 ± 0,17	0,2196
EST (%)	12,22 ± 0,26	11,78 ± 0,36	0,2969
ESD (%)	8,85 ± 0,13	8,67 ± 0,20	0,4019
Variáveis	Leite para produção do queijo Minas Frescal		P
	Cru (n=9)	Pasteurizado (n=9)	
Acidez (°D)	15,00 ± 0,94	14,67 ± 0,94	0,4226
Densidade (15/15°C g/L)	1030,42 ± 0,59	1029,36 ± 1,12	0,1898
Gordura (%)	3,07 ± 0,18	2,96 ± 0,05	0,4975
EST (%)	11,54 ± 0,34	11,14 ± 0,26	0,0809
ESD (%)	8,47 ± 0,18	8,18 ± 0,28	0,1370

EST: Extrato Seco Total; ESD: Extrato Seco Desengordurado.

A legislação brasileira estabelece padrões físico-químicos para o leite cru refrigerado e para o leite pasteurizado, sendo, no mínimo, 3% de gordura, acidez entre 14 e 18 °D, densidade entre 1028 e 1034 g.L<sup>-1</sup>, no mínimo 11,5% de EST e no mínimo 8,4% de ESD (BRASIL, 2011). Nota-se que todas as amostras, tanto de leite cru quanto de leite pasteurizado, estão dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente, com exceção do teor de gordura do leite utilizado para fabricar o queijo Minas Frescal.

#### 4.1.2 Colesterol

Observou-se aumento no teor de colesterol ( $p < 0,05$ ) do leite cru para o leite pasteurizado utilizado somente para a produção do queijo Muçarela (Tabela 6). Entre os tratamentos (leite cru e leite pasteurizado) não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

A principal fonte de colesterol no leite são os glóbulos de membrana da gordura do leite. Ao ser secretado pelas células alveolares do úbere, o leite contém gotas de gordura rodeadas por um complexo de membranas resultantes da parede epitelial (LARSEN et. al., 2012).

Os leites utilizados para a fabricação dos queijos foram pasteurizados a uma temperatura de 73°C/15s. Em estudo realizado por Osada e outros (1993), sobre a estabilidade do colesterol durante o aquecimento foi demonstrado que o colesterol se mantém estável quando submetido a aquecimento a temperaturas de até 100°C. Acima de 120°C o colesterol foi totalmente degradado. Esses resultados indicam que o colesterol é raramente degradado em temperaturas utilizadas convencionalmente para o cozimento.

**Tabela 6 Teor de colesterol (mg.100mL<sup>-1</sup>) nos leites cru e pasteurizado.**

Destino	Leite		Valor de P
	Cru (n=9)	Pasteurizado (n=9)	
Prato	7,98 <sup>a</sup> ±0,40	8,09 <sup>a</sup> ±0,23	0,7374
Muçarela	7,46 <sup>a</sup> ±0,42	8,31 <sup>a</sup> ±0,59	0,0112
Minas Frescal	7,44 <sup>a</sup> ±0,62	8,31 <sup>a</sup> ±0,66	0,0600
Valor de P	0,4895	0,1726	

**Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.**

Segundo Herzallah (2005) a pasteurização aplicada ao leite não interferiu no conteúdo de colesterol do mesmo. Ainda segundo este estudo, a insignificante redução no teor de colesterol observado se deve provavelmente à oxidação do colesterol ou formação de óxidos de colesterol. Resultado semelhante foi encontrado por Al-Rowaily (2008).

Esperava-se que o teor de colesterol dos leites pasteurizados utilizados para a fabricação dos queijos não sofresse modificação, em função do que foi observado na literatura (HERZALLAH, 2005; AL-ROWAILY, 2008), ou seja, a temperatura utilizada para a pasteurização foi inferior à temperatura em que foi observada total degradação do colesterol, ou que houvesse uma pequena redução, já que o leite para a fabricação dos queijos antes de ser pasteurizado passa por um processo de desnatado, diminuindo o teor de gordura. No entanto, o conteúdo de colesterol do leite pasteurizado para a produção do queijo Muçarela aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ). Não sendo encontrado justificativa para este resultado, indicando assim a necessidade de novos estudos que busquem respostas para tal situação.

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) desenvolvida pela Universidade de Campinas, a quantidade de colesterol para o leite de vaca é de  $10 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  de leite, resultado superior ao encontrado neste trabalho em que o valor encontrado para o leite cru foi em média de  $7,63 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  e para o leite pasteurizado foi de  $8,24 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ .

## **4.2 Análises dos Queijos**

### **4.2.1 Análises Físico-Químicas**

Os tratamentos exerceram efeitos sobre as variáveis estudadas, como esperado, visto que a tecnologia de fabricação dos referidos queijos apresenta diferenças. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros proteína e gordura no extrato seco (GES) entre os três queijos analisados (Tabela 7).

Os queijos apresentaram porcentagem de GES variando de 46,95% a 48,67%. Segundo a legislação, o queijo Muçarela é classificado em relação ao teor de matéria gorda como queijo extragordo, gordo a semigordo, com percentuais de gordura variando do mínimo de 25 a mais de 60% de gordura; o queijo Prato é classificado como queijo gordo, com percentual de gordura variando de 45% a 59,9% e o Minas Frescal como um queijo semigordo com percentual de gordura variando de 25% a 44,9%, sendo o único queijo no

presente trabalho fora dos padrões estabelecidos (BRASIL, 1997a; BRASIL, 1997b; BRASIL, 1997c).

**Tabela 7 Concentração média das variáveis físico-químicas dos queijos Muçarela, Prato e Minas Frescal.**

Análise	Queijo			P
	Muçarela (n=9)	Prato (n=9)	Minas Frescal (n=9)	
Proteína (%)	24,43 <sup>a</sup> ± 1,59	22,67 <sup>a</sup> ± 0,76	24,18 <sup>a</sup> ± 0,78	0,0510
GES (%)	46,95 <sup>a</sup> ± 1,58	48,44 <sup>a</sup> ± 1,20	48,67 <sup>a</sup> ± 0,92	0,0983
Gordura (%)	27,08 <sup>a</sup> ± 0,53	28,58 <sup>b</sup> ± 0,34	22,17 <sup>c</sup> ± 0,47	<0,0001
Umidade (%)	42,29 <sup>a</sup> ± 0,97	40,97 <sup>a</sup> ± 0,84	54,45 <sup>b</sup> ± 0,95	<0,0001
Cinzas (%)	4,06 <sup>a</sup> ± 0,34	3,36 <sup>b</sup> ± 0,33	3,07 <sup>b</sup> ± 0,38	0,0014
EST (%)	57,71 <sup>a</sup> ± 0,97	59,03 <sup>a</sup> ± 0,84	45,56 <sup>b</sup> ± 0,95	<0,0001

**EST: Extrato Seco Total; ESD: Extrato Seco Desengordurado; GES: Gordura no Extrato Seco. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.**

Os queijos estudados apresentam classificações distintas em relação ao teor de umidade, segundo a legislação. O queijo Minas Frescal foi o único que não se adequou ao estabelecido, apesar de apresentar um valor bem próximo ao padrão que é de valores maiores que 55% para a classificação muito alta umidade. Os queijos Muçarela e Prato apresentaram teores de umidade de 42,29% e 40,97%, respectivamente, sendo classificados como queijos de média umidade (BRASIL, 1996).

O EST foi determinado por meio da subtração da parte inteira (cem por cento) pelo percentual de umidade encontrado nas amostras. O queijo Minas Frescal apresentou o menor EST, diferindo dos demais ( $p < 0,05$ ). Este resultado era esperado, já que também houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para o parâmetro umidade entre os mesmos queijos, além de que este é um queijo de muito alta umidade.

#### 4.2.2 Colesterol

O queijo Prato apresentou o maior teor de colesterol, quando comparado aos demais, contudo, a relação colesterol/gordura não apresentou diferença entre os queijos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8 Teores de colesterol (mg.100 g<sup>-1</sup>) e relação colesterol/gordura (mg.g<sup>-1</sup>) para os queijos Muçarela, Prato e Minas Frescal.**

Variáveis	Queijo			P
	Muçarela	Prato	Minas Frescal	
Colesterol (mg.100 g <sup>-1</sup> )	98,52 <sup>b</sup> ± 6,46	111,50 <sup>a</sup> ± 7,04	78,75 <sup>c</sup> ± 5,39	<0,0001
Colesterol/Gordura (mg.g <sup>-1</sup> )	3,15 <sup>a</sup> ± 0,25	3,38 <sup>a</sup> ± 0,26	3,07 <sup>a</sup> ± 0,21	0,082

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Segundo a TACO (2011) o conteúdo de colesterol para o queijo Minas Frescal encontrado foi de 62 mg.100 g<sup>-1</sup>, valor inferior ao encontrado no presente trabalho. Bauer (2013) encontrou valores ainda menores no seu trabalho, da ordem de 45 mg.100g<sup>-1</sup>. Os valores altos para as concentrações do colesterol no queijo Minas Frescal pode estar atrelado ao fato do queijo do presente estudo apresentar teor de gordura maior que nos outros estudos. Ainda segundo a TACO (2011) o teor de gordura para o queijo Minas Frescal encontrado foi de 20,2%, valor inferior ao encontrado para a média da gordura do queijo Minas Frescal no presente trabalho. Segundo o INMETRO (2013), o queijo Minas Frescal apresentou teor de gordura de 11,70% e concentração de colesterol de 41,43 mg.100 g<sup>-1</sup>.

Valores diferentes são encontrados para a concentração de colesterol do queijo Muçarela entre as tabelas da TACO (2011) e do INMETRO (2013), correspondente a 80 e 99,87 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. Ali e Abdel-Razig (2011), estudaram o efeito de diferentes níveis de gordura no leite para a fabricação de Muçarela e o efeito do armazenamento sobre o teor de colesterol do queijo e observaram aumento no conteúdo de colesterol durante 30 dias de 46,25 para 61,72 mg.100 g<sup>-1</sup>. Nesse mesmo trabalho os teores de gordura encontrados foram baixos, com média de 18,4%, o que reforça a ideia de que o aumento no colesterol está relacionado ao aumento do teor de gordura, assim como ao processamento e tratamento aplicados na produção. Resultados semelhantes foram encontrados por Castiella e outros (2004) e Salem e Abeid (1997), que estudaram a redução no conteúdo de colesterol de queijos de cabra e vaca em função de diferentes concentrações de gordura dos leites.

Trabalhos sobre o teor de colesterol em queijo Prato na literatura são escassos. Dentre os três queijos, o queijo Prato apresentou maior teor de colesterol, 111,50 mg.100 g<sup>-1</sup>, o que era esperado, já que o conteúdo de gordura foi superior aos outros queijos estudados. Guilherme (2010) estudando a qualidade nutricional dos queijos nacionais, encontrou para o

queijo Prato, teor de colesterol de 88,99 mg.100 g<sup>-1</sup>, sendo este a maior concentração entre os queijos estudados.

Neste mesmo estudo, Guilherme (2010) relata que o queijo Ricota apresentou maior relação colesterol/gordura (4,94 mg.g<sup>-1</sup>) que os queijos Muçarela e Prato, com valores de 2,36 e 2,94 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente, apesar de apresentar menor teor de gordura total.

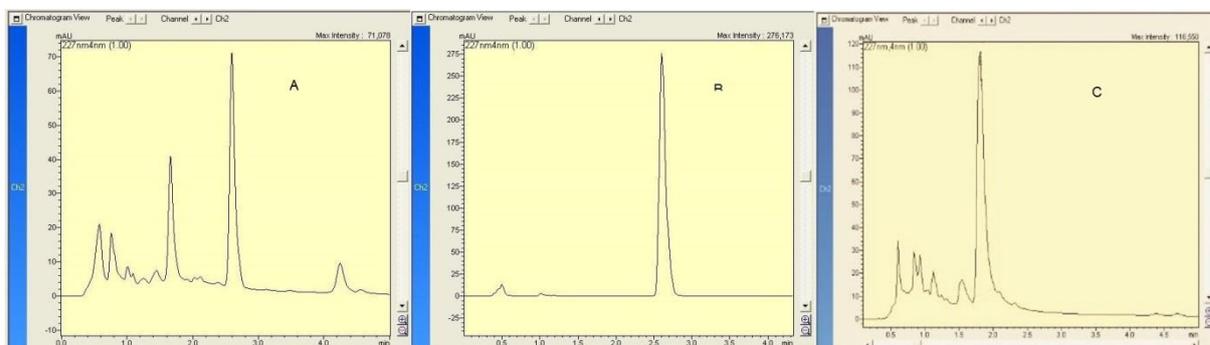
A relação colesterol/gordura dos queijos estudados no presente trabalho foi de 3,15, 3,38 e 3,07 mg.g<sup>-1</sup> para os queijos Muçarela, Prato e Minas Frescal, respectivamente. Pode-se observar que o queijo Minas Frescal apresentou menor teor de gordura que os queijos Prato e Muçarela, no entanto, não houve diferença significativa (p>0,05) entre eles.

#### 4.2.3 Óxidos de colesterol

Não foi detectada a presença do óxido 7-cetocolesterol nas amostras de queijo Prato analisadas (Figura 4). Os picos dos cromatogramas do padrão puro (Figura 4B) diferem do pico observado nas amostras do queijo Prato (Figura 4C).

A temperatura de processamento da massa utilizada para a fabricação do queijo Prato foi de 41 °C com um tempo de cozimento de 60 minutos (Tabela 4). Esta temperatura é considerada baixa para determinar a oxidação do colesterol. O tempo de aquecimento pode influenciar no aparecimento de óxidos de colesterol, no entanto, este está relacionado com as temperaturas de aquecimento, podendo ser reduzido o tempo de aparecimento com a utilização de temperaturas mais altas (OSADA et. al., 1993).

**Figura 4 Cromatogramas da amostra de queijo Prato com o padrão 7-cetocolesterol (A), padrão do 7-cetocolesterol (B) e amostra de queijo Prato pura (C).**

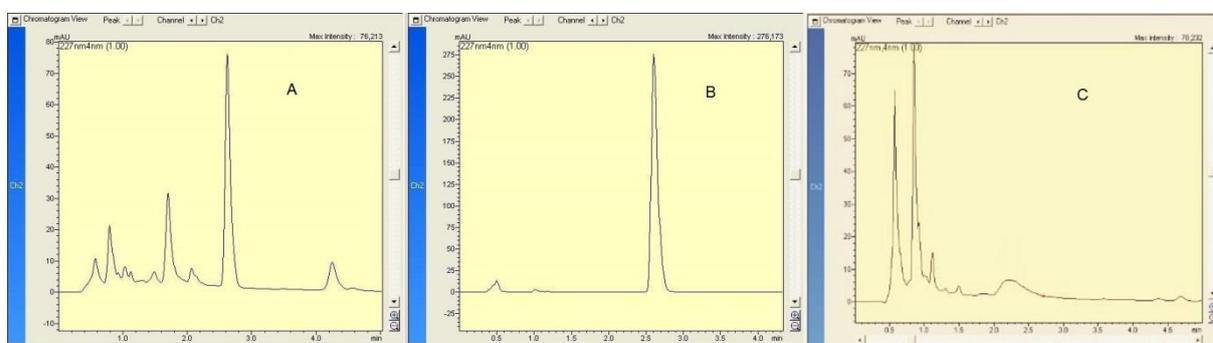


O comportamento do queijo Muçarela foi o mesmo que o observado no queijo Prato, não sendo detectada a presença de óxidos de colesterol no mesmo (Figura 5). Dentre os

queijos avaliados, esperava-se que este apresentasse óxidos em função da filagem da massa, necessária para que a mesma adquira a consistência ideal. Esta filagem se dá em água a 87° C, por um tempo de aproximadamente 3 minutos.

Os efeitos sobre os óxidos de colesterol em derivados lácteos surgem com temperaturas acima de 120° C (OSADA et al., 1993), contudo, o tempo de exposição a temperatura pode elevar os óxidos de colesterol (HERZALLAH, 2005). A massa da muçarela fica exposta a temperatura de 87° C, o que poderia exercer algum efeito sobre o teor de colesterol. No entanto, nas condições deste estudo isto não foi demonstrado.

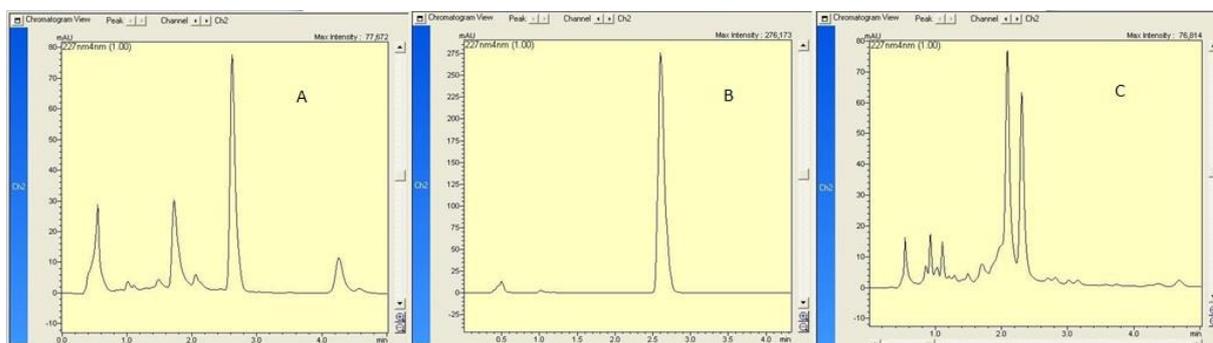
**Figura 5 Cromatogramas da amostra de queijo Muçarela com o padrão 7-cetocolesterol (A), padrão do 7-cetocolesterol (B) e amostra de queijo Muçarela pura (C).**



Dentre os queijos estudados, o Minas Frescal é o único queijo fresco e não se esperava que o mesmo apresentasse óxidos de colesterol (Figura 6), visto que produtos lácteos frescos apresentam baixa probabilidade de formação de óxidos de colesterol (SAVAGE; DUTTA; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002, HUR; PARK; JOO, 2007). Assim, o mesmo comportamento dos demais queijos avaliados foi observado neste, não sendo detectada presença de óxidos de colesterol.

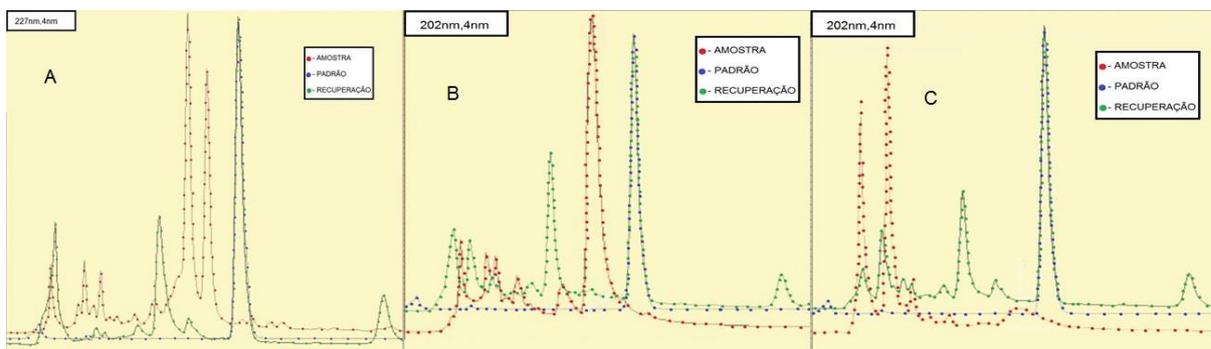
A temperatura de processamento do Minas Frescal foi de 36°C, temperatura baixa, quando comparada à temperatura em que se observa efeito sobre o colesterol, acima de 100 °C (OSADA et. al., 1993). De fato, este queijo foi tido como o controle, em função de sua peculiaridade de processamento.

**Figura 6** Cromatogramas da amostra de queijo Minas Frescal com o padrão 7-cetocolesterol (A), padrão do 7-cetocolesterol (B) e amostra de queijo Minas Frescal pura (C).



A recuperação indica a efetividade dos resultados (Figura 7). Observa-se que a curva de recuperação se sobrepõe à curva do padrão, confirmando que não houve interferência da amostra de queijo no tempo de retenção do pico do 7-cetocolesterol em todos os queijos, enquanto que cada amostra apresentou picos em momentos distintos do padrão.

**Figura 7** Comparação entre os cromatogramas da amostra de queijo Minas Frescal (A), Prato (B) e Muçarela (C), do padrão 7-cetocolesterol e da recuperação.



De forma geral, alimentos que contenham colesterol quando expostos ao calor, ao ar, ou à luz durante seu processamento e armazenamento, podem apresentar óxidos de colesterol, como resposta da auto-oxidação (VAN DE BOVENKAMP; KOSMEIJER-SCHUIL; KATAN, 1988; HERZALLAH, 2005; AL-ROWAILY, 2008; AL-ISMAIL; HUMIED, 2003), contudo, em produtos lácteos a auto-oxidação do colesterol ocorre moderadamente, mesmo em condições adversas. Fatores como o modesto teor de colesterol e o alto teor de gordura saturada podem explicar este comportamento (ADDIS; PARK, 1992, SAVAGE; DUTTA; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2002).

É importante destacar que o colesterol pode não ser o causador primário da aterosclerose, devido à sua baixa reatividade (POLI et al., 2013). As lesões nas paredes dos vasos sanguíneos podem ser causadas pelos produtos de sua oxidação, formados durante o

processamento, preparação e estocagem dos produtos alimentares. Quando essas lesões já estão formadas, o colesterol é depositado nas paredes dos vasos sanguíneos, causando a aterosclerose (BOSINGER; LUF; BRANDL, 1993).

A ausência do 7-cetocolesterol pode ser tomada, então, como um resultado positivo. Apesar de ser considerado o óxido de colesterol menos tóxico, a sua presença nos alimentos é tida como referência para a avaliação da oxidação do colesterol (LERCKER; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2000; ANGULO et. al., 1997) e estes óxidos provocam reações indesejáveis em humanos, como citotoxicidade, apoptose e efeitos pró-inflamatórios, além de serem associados à doenças crônicas, incluindo aterosclerose e processos neurodegenerativos (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2010).

Os queijos utilizados nesse trabalho passaram por temperatura de processamento abaixo de 80°C, não sendo observada a presença do 7-cetocolesterol, corroborando os relatos de Finocchiaro, Lee e Richardson (1984) e Bauer (2013). Segundo Sieber (2005) pequenas quantidades de 7-cetocolesterol foram encontradas em queijos submetidos a tratamentos intensos de aquecimento a temperaturas superiores a 130°C.

Comparados com o colesterol não oxidado, os óxidos de colesterol demonstraram maior efeito patogênico e tóxico, em função de sua habilidade em ultrapassar a membrana lipofílica (SMONDYREV, BERKOWITZ, 2001; MEANEY et al., 2002; SOTERRO et al., 2009) . Os óxidos de colesterol causam desequilíbrio na relação das reações bioquímicas oxidativas e de redução, atuando em todos os níveis do organismo, desde a sinalização para doenças até a regulação de inflamação, apoptose e fibrose (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2010).

O consumo de produtos que possam conter óxidos de colesterol na sua composição deve ser observado com mais cuidado. Como mencionado, os queijos possuem diferentes formas de processamento e diferentes temperaturas de fabricação, o que pode promover a formação destes compostos. Os óxidos de colesterol podem ser absorvidos pela dieta humana, assim como podem também ser formados endogenamente no organismo (SIEBER, 2005). Os óxidos de colesterol desempenham diferentes funções, como: intermediários obrigatórios da síntese do ácido biliar e podem ser considerados como meios de transporte para o colesterol. Entretanto, a ligação dos óxidos de colesterol com a aterosclerose ainda é incerta, tornando importante que se mantenha o nível de óxidos de colesterol em produtos alimentares em valores mínimos (SIEBER, 2005).

Os resultados observados neste estudo indicam que o consumo dos queijos Muçarela, Minas Frescal e Prato não proporcionam a ingestão de óxidos de colesterol, ajudando a esclarecer que os derivados lácteos não devem ser tratados como inimigos da saúde, mas sim, em sua complexidade, com a visão holística, e não de forma segmentada, como tem sido.

## **5 CONCLUSÕES**

A pasteurização do leite elevou o teor de colesterol, no entanto, estudos devem ser desenvolvidos para entender este efeito.

Não foi detectada a presença do óxido 7-cetocolesterol nas amostras de queijo analisadas, indicando que o processamento não resultou na oxidação do colesterol.

O consumo dos queijos Minas Frescal, Prato e Muçarela não induzem à ingestão de óxidos de colesterol.

## REFERÊNCIAS

- ADDIS, P. B.; PARK, S. W. **Cholesterol oxides content of foods**. In Biological Effects of Cholesterol Oxides; Peng, S. K., Morin, J. M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL; p 71-88. 1992.
- AHN, J. H., et. al. Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2411-2417, 2012.
- ALI, A. M.; ABDEL-RAZIG, K. A. Cholesterol content of mozzarella cheese during storage as affected by level of milk fat. **Pakistan Journal of Nutrition** v. 10, n. 1, p. 65-70, 2011.
- ALINA, A. R., et al. Effect of Different Cooking Methods on Formation of Cholesterol Oxidation Products in Pork and Beef. **World Applied Sciences Journal**. v. 17, p. 17-20, 2012.
- AL-ISMAIL, K. M.; HUMIED, M. A. Effect of processing and storage of brined white (Nabulsi) cheese on fat and cholesterol Oxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 83, p. 39-43, 2003.
- AL-ROWAILY, M. A. Effect of Processing Methods on Cholesterol Contents and Cholesterol Oxides Formation in Some Dairy Products. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 15, n. 1, p. 35-45, 2008.
- AMARAL, J. S. et al. **Determinação do teor em colesterol no leite de raça autóctone portuguesa por HPLC**. COLACRO XII & SIMCRO. 2008.
- AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**. Zaragoza: ACRIBIA S.A., 1991.
- ANGULO, A. J. J. Determination of Cholesterol Oxides in Dairy Products. Effect of Storage Conditions. **Agriculture Food Chemistry**. 45, 4318–4323. 1997.
- AQUINO, A. A.; BOTARO, B. G.; IKEDA, F. DOS S.; ET. AL. Efeito de níveis crescentes de uréia na dieta de vacas em lactação sobre a produção e a composição físico-química do leite. **Revista Brasileira Zootecnia**., v.36, n.4, p.881-887, 2007.
- BAUER, L. C. et. al. Method Validation for Simultaneous Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Milk by RP-HPLC-DAD. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 25, n. 1, p. 161-168, 2014.
- BAUER, L. C. **Efeito da inclusão de níveis crescentes de orégano desidratado sobre o conteúdo de colesterol e seus óxidos em leite bovino in natura, pasteurizado e queijo tipo Minas Frescal**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Itapetinga.
- BOSINGER, S., LUF, W., BRANDL, E. 'Oxysteroids': Their Occurrence and Biological Effects. **International Dairy Journal**, 31-33, 1993.

BRAGAGNOLO, N. **Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol.** 2a Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína— Concórdia, SC, Brasil. 5 de Novembro a 6 de Dezembro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União.** Brasília, 30 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos - Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União.** Brasília, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº44. **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, Seção 1, p. 5. 05 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MERCOSUL/GMC/RES.Nº145/96. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União.** Brasília, 01 de janeiro de 1997a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MERCOSUL/GMC/RES.Nº145/96. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Prato. **Diário Oficial da União.** Brasília, 04 de setembro de 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo mozzarella (muzzarella ou mussarela). **Diário Oficial da União.** Brasília, 01 de novembro de 1997c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial da União.** Brasília, 11 de março de 1996.

CANSIAN, E. A. **Avaliação da padronização do queijo mussarela com uso de ferramentas de qualidade: estudo de caso.** 2005. Dissertação (Mestrado). Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

CASTIELLA, M., et. al. Efecto de la disminución de la grasa de la leche de oveja sobre el contenido de colesterol en el queso. **Grasas y Aceites.** v. 55. n. 2. 2004.

CEBALLOS, L. S. et. al. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis.** v. 22, p. 322–329, 2009.

DENDER, A. G. F. van et al. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 41, n. 247, p. 3-13, 1986.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo**. Panorama do Leite. Ano 6, n. 65 (abr/2012) Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. Disponível em: <[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013\\_02\\_PanoramaLeite.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_PanoramaLeite.pdf)>. Acesso em: 24 jul. 2013a.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **O consumo de leite em números**. Panorama do Leite. Ano 6, n. 65 (abr/2012) Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. Disponível em: <[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013\\_05\\_PanoramaLeite\\_0.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_05_PanoramaLeite_0.pdf)>. Acesso em: 24 jul. 2013b.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Qualidade do leite**. Panorama do Leite. Ano 6, n. 65 (abr/2012) Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. Disponível em: <[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013\\_04\\_PanoramaLeite.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_04_PanoramaLeite.pdf)>. Acesso em: 24 jul. 2013c.

FDA. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21**. Food and drugs. 2014. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=101&showfr=1>> Acesso em: 12 fev. 14.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Editorial Acribia. 2ª Edição 1095 p., 2000.

FINOCCHIARO, E. T. LEE, K, RICHARDSON, T. Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. **Journal of Oil & Fat Industries**, v. 61, n. 5, p. 877-883, 1984.

FURTADO, M. M., SOUZA, H.M. DE, E MUNCK, A.V. A fabricação do queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 35, n. 207, 1980.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento, parte 1, determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto Cândido Tostes**. v. 34, n. 205, p. 3-9, 1979.

FURTADO, M.M. **Manual Prático da Mussarella (Pizza Cheese)**. Campinas: Master Graf, 70 p. 1997.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. 2º. ed. Fonte Comunicações e Editora, 200 p. 2005.

GARCIA, G. A. C. et al. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosáina. **Brazilian Journal Food Technology**. 2009.

GONZÁLEZ, F.H.D. **Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GUARDIOLA, F. et. al. Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos. *Grasas y Aceites*. v. 46, n. 3, p. 202-212, 1995.

GUILHERME, R. C. **Perfil e qualidade nutricional dos lipídios dos queijos ricota, coalho, mussarela e Prato.** 2010. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Nutrição com Área de Concentração em Ciências dos Alimentos. Recife.

GUTIERREZ, E. M. R. et al. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo Prato durante a maturação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 24, n. 4, p. 596-601, 2004.

HARDING, F. **Compositional quality: milk quality.** Glasgow: Blackie Academic Professional, 165p. 1995.

HERZALLAH, S. M. Influence of microwaving and conventional heating of milk on cholesterol contents and cholesterol oxides formation. *Pakistan Journal of Nutrition*. v. 4, n. 2, p. 85-88, 2005.

HOFFMAN, F.L.; SILVA, J.V. da; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica e queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**. v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.

HUR, S. J., PARK, G. B., JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control** v.18, p. 939–947, 2007.

INMETRO – **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Relatório sobre análise de gordura e colesterol em queijos.** Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/gordura-colesterol-queijos.pdf>> Acesso em: 05 agost. 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids.** The National Academies Press. Washington, D. C. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção de origem animal, por tipo de produto.** 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=74&z=t&o=24&i=P>> Acesso em 23 abr. 14.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Quantidade de leite cru, resfriado ou não (mil litros) - Brasil. 2013.** Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=3&z=t&o=24&u1=1&u2=27&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>> Acesso em 24 jul. 13.

JENSEN, R. G. Handbook of Milk Composition. Miscellaneous Factors Affecting Composition and Volume of Human and Bovine Milks. **Food Science and Technology**. p. 919, 1995.

LARSEN, T. Enzymatic–fluorometric quantification of cholesterol in bovine milk. **Food Chemistry**. v. 135, p. 1261-1267, 2012

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Cholesterol Oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in Different Food Products. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 13, p. 625-631, 2000.

MAZALLI, M. R., et. al. HPLC Method for Quantification and Characterization of Cholesterol and Its Oxidation Products in Eggs. **Lipids**, v. 41, n. 6, 2006.

MEANEY, S., et al. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. **Journal of Lipid Research**. v. 43, p. 2130-2135, 2002.

MORALES-AIZPÚRUA, I. C.; TENUTA-FILHO, A. Colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em maionese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n.3, p. 495-499, 2005.

MORALES-AIZPURÚA, I. C.; TENUTA-FILHO, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.38, n.4, p.431-442, 2002.

NOUROOZ-ZADEH, J., APPELQVIST, L. Cholesterol Oxides in Swedish Foods and Food Ingredients: Butter and Cheese. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 65, n. 10, 1988.

OH, H. I., SHIN, T. S., CHANG, E. J. Determination of cholesterol in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography. **Department of Food Science and Technology**. p. 143-747, 2001.

OLIVEIRA, E. N. A. de et al. Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. **Revista Acadêmica Ciência Agrárias e Ambientais**. v. 8, n. 4, p. 409-415, 2010.

OSADA, K. et al. Oxidation of Cholesterol by Heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 41, p. 1198-1202, 1993.

OTAEGUI-ARRAZOLA et al. Oxysterols: A world to explore. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 3289-3303, 2010.

PARENTE, E., MOSCHETTI, G. **Starters for Mozzarella cheese**. In Fifth Cheese Symposium March, Cork, Ireland ed. Cogan, T.M.,7 Fox, P.F. and Ross, R.P. p. 31-41. Teagasc Publ., Dublin, Ireland, 1997.

PEREIRA, P. A. C. **Relação entre Problemas Reprodutivos e Eficiência Reprodutiva comparada por Diferentes Métodos em Rebanhos Bovinos Leiteiros**. 2009. Tese

(Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva Belo Horizonte.

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

PINTO, F.G.S., SOUZA, M., SALING, S., MOURA, A.C. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.2, p.191-198, 2011.

POLI, G; BIASI,F.; LEONARDUZZI, G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. **Redox Biology**. v.1, p. 125–130, 2013.

PUOCI, F., et. al. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. **Food Chemistry**. v. 106, p. 836–842, 2008.

RAZZAZI-FAZELIA, E., KLEINEISENB, S., LUFB, W. Determination of cholesterol oxides in processed food using highperformance liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of Chromatography A**. v. 896, p. 321-334, 2000.

ROSE-SALLIN, C. et al. Effets d'un Stockage ou d'un Traitement Thermique sur la Formation des Oxyst´erols dans les Produits Laitiers. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 30, n. 2, p. 170–177, 1997.

SALDANHA, T.; MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 109-113, 2004.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 4107-4113, 2006.

SALEM, A., ABEID A. M. Low sodium and cholesterol Domiati cheese. Egyptian. **Journal of Dairy Science**. v. 25, p. 123-124, 1997.

SANTOS, F. L. et. al. Produção e Composição do Leite de Vacas Submetidas a Dietas Contendo Diferentes Níveis e Formas de Suplementação de Lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 4, p. 1376-1380, 2001.

SAS - Institute. **SAS Users guide: Statistics**. 5 ed. Cary, 1290 p. 1996.

SAVAGE, G. P., DUTTA, P. C., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Cholesterol oxides: their occurrence and methods to prevent their generation in foods. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. v. 11, n. 1, p. 72–78, 2002.

SIEBER, R. Oxidised cholesterol in milk and dairy products. **International Dairy Journal**, n. 15, p. 191-206, 2005.

- SILVA, I. M. M. et al. Occurrence of *Listeria* ssp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**. v. 81, p. 241-248, 2003.
- SMONDYREV, A.M.; BERKOWITZ, M.L. Effects of oxygenated sterol on phospholipid bilayer properties: a molecular dynamics simulation. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 112, p. 31-39, 2001.
- SOTTERO, B; GAMBA, P.; GARGIULO, S.; LEONARDUZZI, G.; POLI, G. Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 685-705, 2009.
- TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. **Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol**. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2011. n.4, p.54. Disponível em: <[http://www.unicamp.br/nepa/downloads/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/downloads/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf)>. Acesso em: 04 agosto. 2013.
- TAI, C. Y.; CHEN, Y. C., CHEN, B. H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in food: An overview (Part I). **Journal of Food Drug Analytical**. v. 7, n. 4, p. 243-257, 1999.
- TENUTA-FILHO, A.; MORALES-AIZPURÚA, I. C.; MOURA, A. F. P. de; KITAHARA, S. E. Óxidos de colesterol em alimentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 3, p. 319-325, 2003.
- USDA. Dietary Reference Intakes: Macronutrients. **Food and Nutrition Board**. 2014. Disponível em: <<https://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-reference-intakes/dri-tables>> Acesso em: 12 fev. 14.
- VAN DE BOVENKAMP, P.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; KATAN, M. B. Quantification of oxysterols in dutch foods: eggs products and mixed diets. **Lipids**. v. 64, p. 1079-1085. 1988.
- VARGAS, T. D. de. **Análise de colesterol em carnes de diferentes espécies**. Centro Universitário Feevale, 2009.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Boca Raton: CRC Press, 756 p, 2006.