

Utilização de plantas como ingredientes bioativos e aditivos naturais em queijo de ovelha

Plants as bioactive ingredients and natural additives in ewe cheese

Marcio Carochio^{1,2}, Albino Bento¹, Patricia Morales² e Isabel C.F.R. Ferreira^{1,*}

¹ Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

² Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

(* E-mail: iferreira@ipb.pt)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16213>

Recebido/received: 2016.12.22

Recebido em versão revista/received in revised form: 2017.03.01

Aceite/accepted: 2017.03.09

RESUMO

A inovação em alimentos tradicionais Portugueses pode ser um fator de diferenciação e dinamizador da indústria alimentar. Em linha com a tendência de mercado de impulsionar o consumo de alimentos mais saudáveis, foram incorporadas plantas (material seco e extratos aquosos obtidos por decocção) em lotes de queijo de ovelha. As plantas usadas foram flores de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.), cidreira (*Melissa officinalis* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.). As incorporações no queijo foram efetuadas durante o seu fabrico, maturando durante um mês na empresa Queijos Casa Matias. Ao fim desse tempo foram sujeitos a vários ensaios após chegada ao laboratório e após seis meses de modo a verificar as alterações durante a maturação. Foi analisada a atividade antioxidante, bem como a composição nutricional, ácidos gordos individuais e minerais. Ficou patente que as plantas e os seus extratos funcionalizaram os queijos, conferindo-lhe bioatividade. A nível nutricional, os nutrientes mais abundantes foram as proteínas e a gordura. Em relação aos ácidos gordos individuais, o mais abundante foi o ácido palmítico (C16:0) seguido do ácido oleico (C18:1). Os ácidos gordos saturados prevaleceram, seguidos dos monoinsaturados. Quanto aos minerais, os mais abundantes foram o cálcio e o sódio. Ao nível da conservação, a incorporação das plantas nos queijos resultou numa diminuição de humidade mais rápida, reduzindo o risco de contaminação por microrganismos, ao mesmo tempo que permitiu a conservação de alguns ácidos gordos insaturados. Por outro lado, a funcionalização dos queijos permitiu conferir algumas propriedades benéficas à saúde.

Palavras-chave: Queijo de ovelha, castanha, cidreira, manjerição, bioatividade, aditivos naturais.

ABSTRACT

The innovation in traditional Portuguese foods can be a differentiating and dynamic factor in the food industry. In line with the market tendencies to promote the consumption of healthier foods, plants (dried material and aqueous decoctions) were incorporated in sheep cheese. The used plants were chestnut flowers (*Castanea sativa* Mill.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and basil (*Ocimum basilicum* L.). The incorporations were carried during cheese production, being left at the dairy Queijos Casa Matias, for one month for ripening. After that time, one lot was subject to various assays, while another lot was left for six months to mature, after which, they were also subject to the same assays. The analysed parameters were the antioxidant activity, nutritional composition, fatty acids and minerals. The plants and their extracts functionalized the cheeses. Nutritionally, proteins and fat were the most abundant nutrients. In terms of individual fatty acids, palmitic (C16:0) and oleic (C18:1) acids were the most abundant. The saturated fatty acids were the most prevalent followed by the monounsaturated. Finally, in terms of minerals, calcium and sodium were the most abundant elements. Conservation wise, the incorporation allowed a faster loss of moisture along the storage time, which reduced the risk of contamination by microorganisms, while also preserving some unsaturated fatty acids. Furthermore, the functionalization of the cheeses allowed conferring beneficial properties to the consumer's health.

Keywords: Sheep cheese, chestnut, lemon balm, basil, bioactivity, natural additives.

INTRODUÇÃO

O mercado alimentar constitui um dos maiores fluxos monetários do planeta, incentivando investimentos em novos alimentos e processamentos. Nas últimas décadas, os consumidores têm-se tornado cada vez mais exigentes nos alimentos que consomem, preferindo alimentos minimamente processados aos industrialmente transformados (Rasooli, 2007). Do mesmo modo, os aditivos naturais são preferidos face aos sintéticos. Assim, muito dinheiro se tem investido na procura de novos aditivos naturais provenientes de plantas. Desde a antiguidade que se reconhecem efeitos bioativos em plantas e em componentes destas, daí que nos últimos anos elas tenham sido incorporadas nos alimentos. Flores de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) são reconhecidas pelas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Carocho *et al.*, 2014a,b), ainda que sejam apenas consumidas em decocções. A cidreira (*Melissa officinalis* L.) é outra planta bastante conhecida pelas suas propriedades antibacterianas, antioxidantes, mas também como expectorante, aliviadora de enxaquecas entre outras, sendo o seu consumo sobretudo em infusões e decocções (Carocho *et al.*, 2015a). Finalmente, o manjerição (*Ocimum basilicum* L.), uma erva aromática bastante usada na cozinha mediterrânica, também conhecida pelas propriedades como redutor de inflamações e tosse, regulação do trânsito intestinal e renal, além de ter propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Boskabady *et al.*, 2005; Benzie e Wachtel-Galor, 2011). Em Portugal e em todo o mundo, a indústria dos laticínios é das mais antigas, sendo que as inovações nos produtos lácteos têm sido bastante investigadas, nomeadamente a adição de produtos de origem vegetal (Junqueira-Gonçalves, 2011; Hassanien *et al.*, 2013). O queijo da Serra da Estrela é um dos maiores embaixadores gastronómicos de Portugal e dos queijos mais antigos, sendo que a sua produção se manteve inalterada desde os primeiros registos, utilizando apenas leite da ovelha “churra mondegueira” ou “bordaleira”, sal e cardo (*Cynara cardunculus* L.) para a coagulação do leite. Ainda que haja alguma investigação relativa a este queijo, esta é a primeira vez que se documenta a incorporação de plantas e suas decocções em queijo de ovelha com o fim de produzir novos produtos (não DOP), conferir bioatividades e usar as suas propriedades como aditivos naturais (Carocho *et al.*, 2015b, c).

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes e materiais utilizados foram adquiridos a revendedores científicos (Fisher, Merck, Sigma, Alfa Aesar, entre outras).

Caracterização das plantas

As flores de castanheiro foram colhidas do chão em soutos da região de Trás-os-Montes, as plantas desidratadas de cidreira e manjerição foram fornecidas por empresas especializadas, e os extratos obtidos foram usados em todos os ensaios. De modo a caracterizar as plantas, o seu potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico foi avaliado, bem como o perfil em compostos fenólicos, ácidos orgânicos e açúcares (Carocho *et al.*, 2014a,b, 2015a, 2016). A atividade antioxidante foi analisada por quatro métodos: captação de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor (PR), inibição da descoloração do β -caroteno (β -C) e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo as metodologias descritas por Carocho *et al.* (2014a). Para a avaliação da atividade antimicrobiana das plantas, determinaram-se as concentrações mínimas inibitórias (MIC) e as concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (MBC e MFC). Em relação à atividade antitumoral, os extratos foram testados em células tumorais humanas. Finalmente, foi também testada a citotoxicidade em células de fígado de porco (Carocho *et al.*, 2014b, 2015a). O Quadro 1 indica os principais compostos detetados em cada planta, bem como os melhores resultados obtidos para cada ensaio de bioatividades.

Incorporação nos queijos

Após a caracterização das plantas, e depois de avaliar o seu potencial para incorporação (Carocho *et al.*, 2014a,b, 2015a) estas foram incorporadas no queijo. A incorporação ocorreu sob duas formas: uma incorporação com a planta desidratada diretamente no queijo, e outra incorporação com o extrato obtido por decocção. Para o cálculo da quantidade e concentração a incorporar, o valor de EC_{50} da atividade antioxidante de cada planta foi usado; já para a incorporação da planta

Quadro 1 - Principais compostos e melhores bioatividades encontrados em cada planta

| Tipo de molécula | Flor de Castanheiro | Cidreira | Manjerição |
|--------------------------|--|---|--|
| Compostos Fenólicos | Tri-galoil-HHDP-glucósido Pentagaloil glucósido | Ácido rosmarínico Ácido litospérmico A | Ácido rosmarínico Ácido chicórico |
| Açúcares Solúveis | Frutose Glucose | Frutose | Frutose |
| Ácidos Orgânicos | Ácido quinico Ácido oxálico | Ácido quinico | Ácido quinico |
| Tocoferóis | γ -tocoferol | Não analisado | Não analisado |
| Atividade Antioxidante | TBARS | TBARS | PR TBARS |
| Atividade Antibacteriana | <i>S. aureus</i> <i>M. flavus</i> | <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhimurium</i> | <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>E. cloacae</i> |
| Atividade Antifúngica | <i>T. viride</i> <i>A. ochraceus</i> | <i>P. funiculosum</i> | <i>T. viride</i> <i>P. ochrochloron</i> |
| Atividade Antitumoral | Linha de fígado e cólon | Linha de mama e fígado | Linha de fígado e cervical |
| Toxicidade Hepática | Não detetada | Não detetada | Não detetada |

desidratada, o rendimento de extração foi o valor de referência, conforme descrito por Carochio *et al.* (2015b, c). A incorporação foi manual e ocorreu durante a preparação do queijo, imediatamente após a sua prensagem. As plantas (trituradas) e os extratos foram misturados na pasta até haver uma distribuição homogênea. Após uma segunda prensagem para ganharem forma, os queijos sofreram uma maturação de um mês (considerados T0 nos gráficos). Após a maturação, cada lote de queijo foi dividido em dois sub-lotes (cada sub-lote continha três queijos). Um destes sub-lotes foi analisado imediatamente, enquanto o outro foi analisado após seis meses de refrigeração a 5°C (considerados T6 nos gráficos). Deste modo, a influência do tempo de armazenamento pôde ser analisada. Assim, no total existiam sete amostras por cada tempo de análise: amostra controlo (sem qualquer incorporação), amostra com flor de castanheiro liofilizado, amostra com decocção de flor de castanheiro, amostra com cidreira liofilizada, amostra com decocção de cidreira, amostra com manjerição liofilizado e amostra com decocção de manjerição.

Atividade antioxidante dos queijos

A atividade antioxidante dos queijos foi analisada pelos mesmos métodos descritos anteriormente

para as plantas, à exceção do ensaio de captação de radicais DPPH. Os resultados estão expressos em mg/mL de extrato de queijo.

Valor nutricional dos queijos

O valor nutricional dos queijos foi calculado recorrendo a métodos oficiais de análise de alimentos conforme descrito por Carochio *et al.* (2015c). Foi analisada a humidade, gordura total, proteínas, cinza e energia, sendo representados em g/100g de peso fresco. A energia foi calculada recorrendo à fórmula oficial da União Europeia: Energia (kcal) = $4 \times (\text{g proteína} + \text{g hidratos de carbono disponíveis totais}) + 2 \times (\text{g fibra}) + 9 \times (\text{g gordura})$.

Ácidos gordos dos queijos

Os ácidos gordos foram detetados por cromatografia gasosa (GC) acoplada a um detetor de ionização de chama (FID), conforme descrito por Carochio *et al.* (2015b, c), e representados em percentagem relativa.

Minerais dos queijos

Os minerais foram detetados por espectrometria de absorção atômica (EAA), sendo que os elementos pesquisados foram Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu. O protocolo seguido foi de Fernández-Ruiz *et al.* (2011).

Tratamento estatístico

Todas as análises foram realizadas em triplicado, sendo os resultados expressos em média \pm desvio padrão. As médias foram comparadas usando o teste “Tukey’s honest Significant Difference” ou de “Games-Howell” consoante as amostras eram homoscedásticas ou não, confirmado pelo teste de “Levene”. Todos os ensaios foram realizados com uma significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como explicado anteriormente, foram preparados três lotes de queijos incorporados com as plantas desidratadas e outros três com os extratos dessas plantas (obtidos por decocção). Um outro lote não foi incorporado e serviu de controlo. Todos os lotes foram subdivididos em dois quando chegaram ao laboratório, sendo que metade foi imediatamente analisada (T0, sem armazenamento), enquanto a outra metade foi colocada a 5°C e armazenada durante 6 meses (T6). Em relação à atividade antioxidante dos queijos (apenas em T0) patente na Figura 1, é notória a bioatividade conferida pelas plantas, pois todos os queijos incorporados apresentaram valores mais baixos de EC_{50} . O queijo com manjerição desidratado foi o que apresentou maior poder redutor, enquanto o queijo com o seu extrato revelou maior capacidade de inibição da descoloração do β -caroteno. A amostra com cidreira desidratada apresentou a maior capacidade de inibição

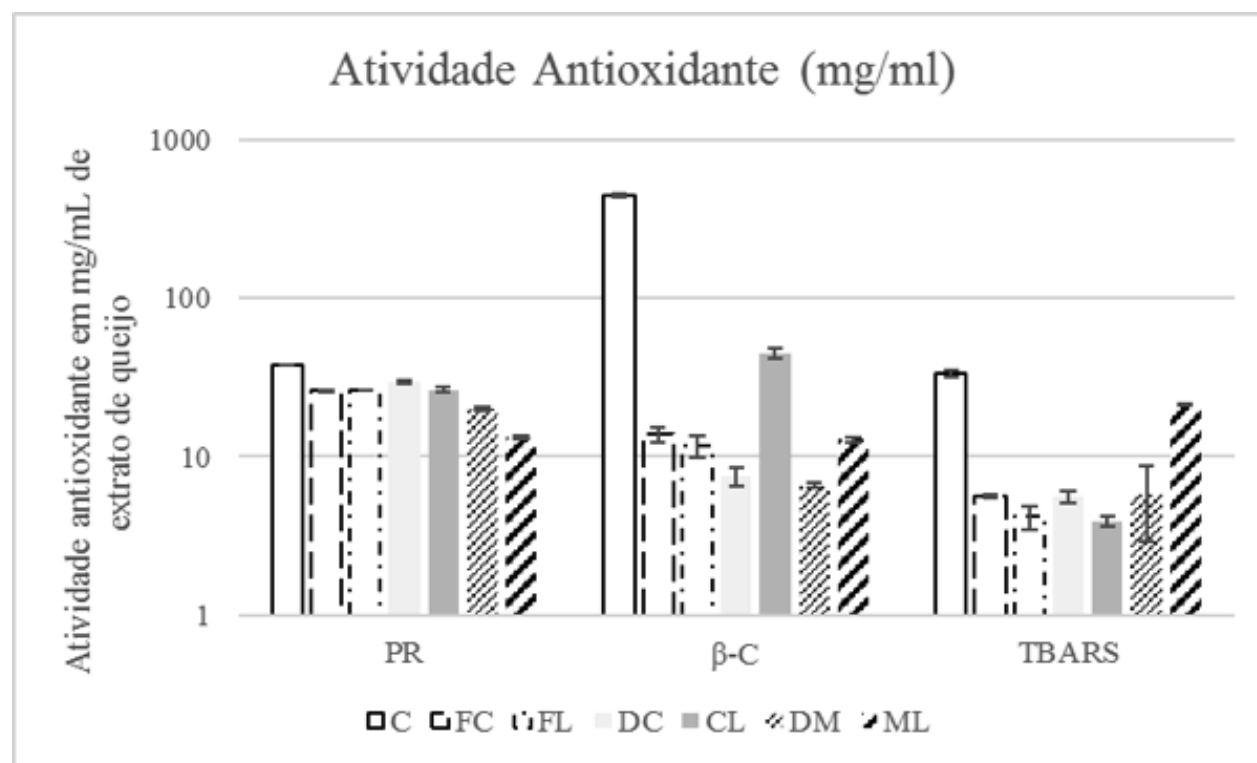


Figura 1 - Valores da atividade antioxidante dos queijos em valores de EC_{50} . As barras de erro são referentes ao desvio padrão. Legenda: C – controlo; FC – decocção de flor de castanheiro; FL – flor de castanheiro liofilizada; DC – decocção de cidreira; CL – cidreira liofilizada; DM – decocção de manjerição; ML – manjerição liofilizado.

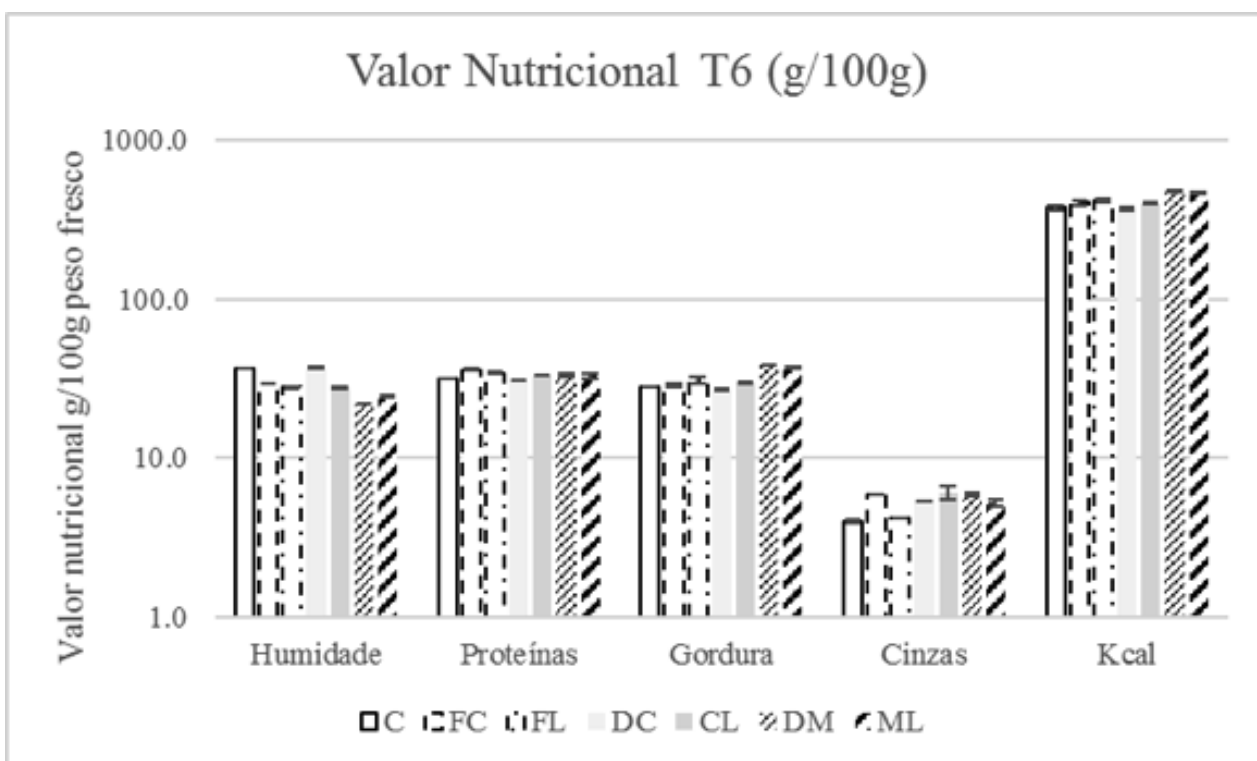
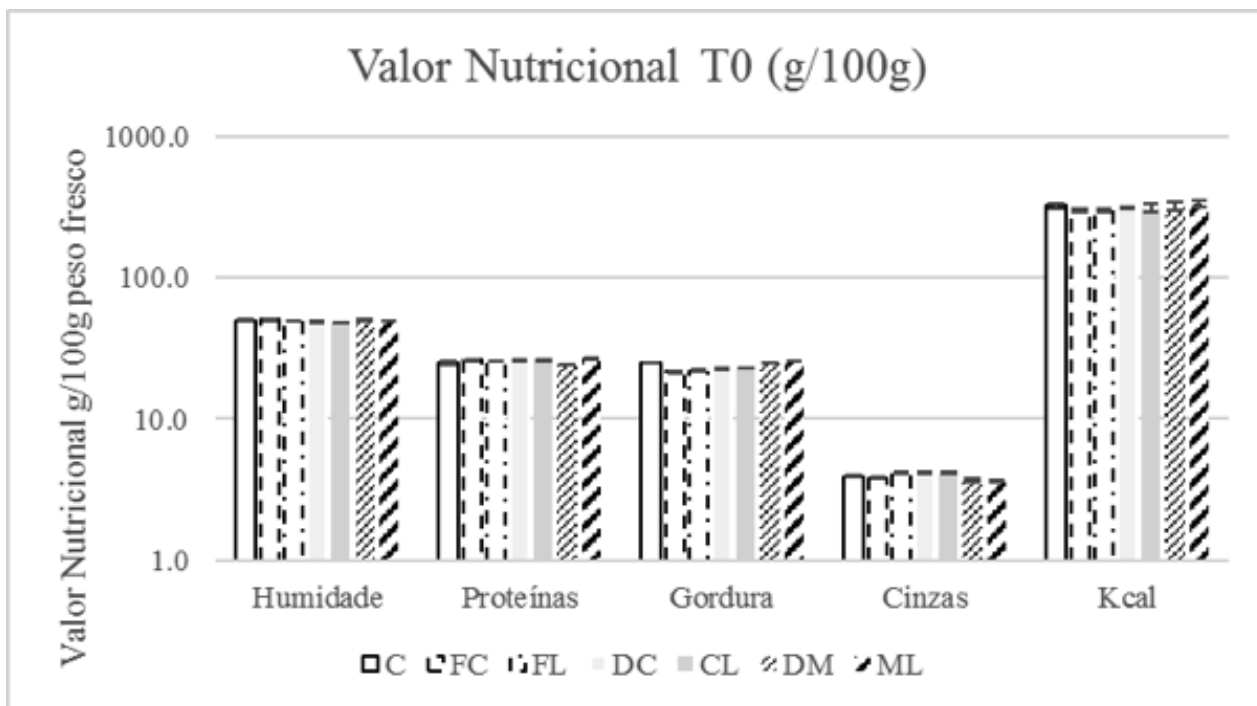


Figura 2 - Valores do perfil nutricional para T0 (2.1) e T6 (2.2). As barras de erro são referentes ao desvio padrão. Legenda: C – controlo; FC – decocção de flor de castanheiro; FL – flor de castanheiro liofilizada; DC – decocção de cidreira; CL – cidreira liofilizada; DM – decocção de manjerição; ML – manjerição liofilizado.

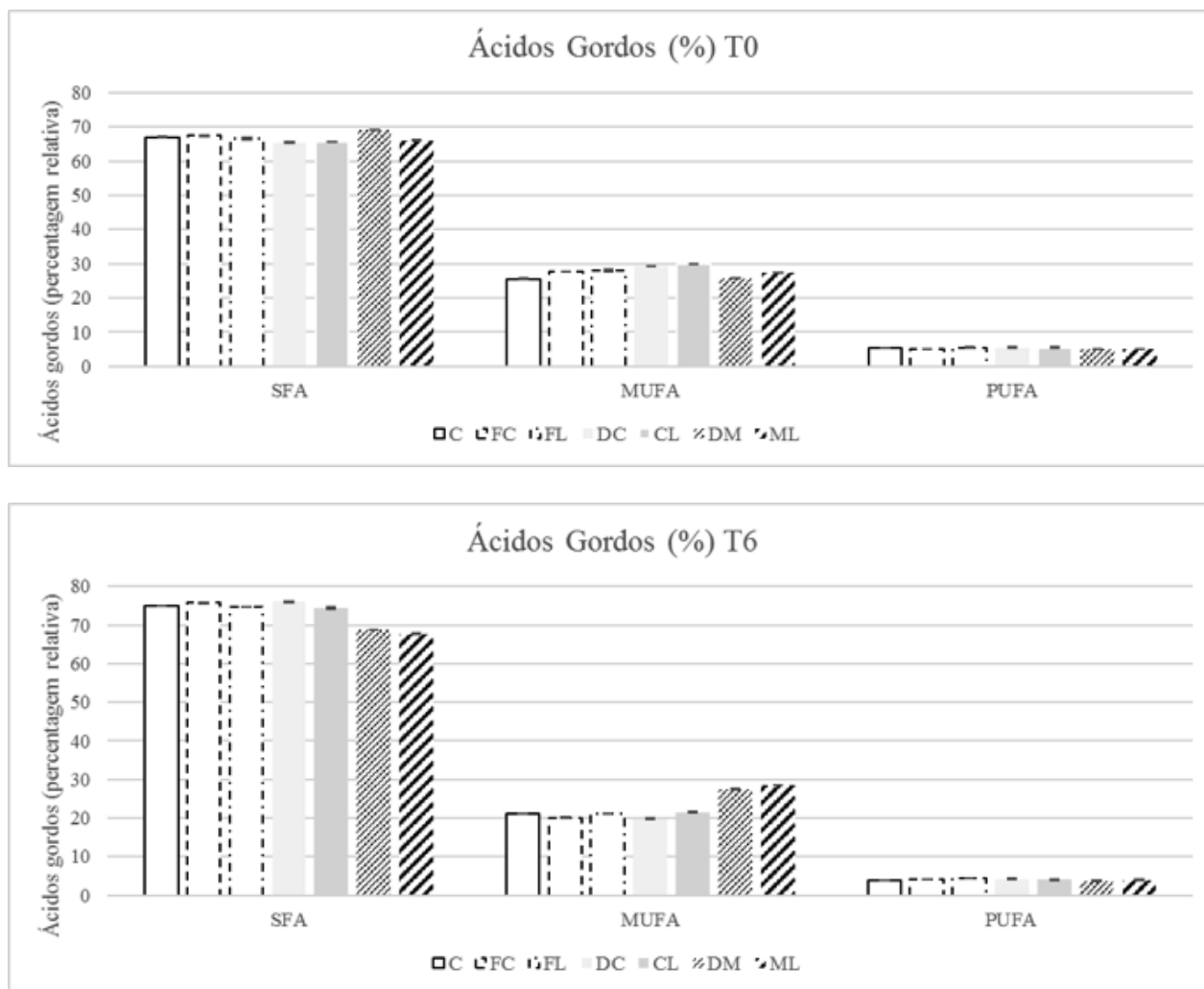


Figura 3 - Valores de ácidos gordos para T0 (3.1) e T6 (3.2). As barras de erro são referentes ao desvio padrão. Legenda: C – controle; FC – decocção de flor de castanheiro; FL – flor de castanheiro liofilizada; DC – decocção de cidreira; CL – cidreira liofilizada; DM – decocção de manjeriço; ML – manjeriço liofilizado.

da peroxidação lipídica (ensaio TBARS). A Figura 2 diz respeito ao valor nutricional, onde o painel 2.1 corresponde aos resultados de T0 e é notória a pouca alteração que as incorporações conferiram ao perfil nutricional dos queijos, sendo a humidade o constituinte maioritário. Já no caso dos resultados do T6 (Figura 2.2), a humidade, proteínas e gordura apresentaram sensivelmente a mesma quantidade, e é notório o decréscimo de humidade em todos os queijos incorporados; nas proteínas, este valor decresceu mais do que no queijo controle, enquanto a gordura e a energia se mantiveram superiores nos queijos incorporados com as duas formas de manjeriço (planta ou extrato). No caso

das gorduras (Figura 3), os ácidos gordos saturados (SFA) prevaleceram, seguidos das monoinsaturadas (MUFA). O ácido palmítico (C16:0) e o oleico (C18:1) foram os ácidos gordos individuais mais abundantes (resultados não mostrados). Nos resultados T6 (Figura 3.2), é visível a manutenção dos MUFA nos queijos incorporados, sobretudo quando se utilizou manjeriço. Finalmente, no caso dos minerais, os mais abundantes foram o Ca e o Mg, tendo sido registadas poucas diferenças com o armazenamento, à exceção de uma subida generalizada da sua quantidade, visto que houve perda de humidade durante o armazenamento.

CONCLUSÕES

A incorporação dos queijos provou ser benéfica em vários aspetos, visto que a incorporação das plantas conferiu bioatividade aos queijos. Por outro lado, o decréscimo mais abrupto da humidade nos queijos incorporados pode ser uma solução para a obtenção de queijo velho (mais curado e mais caro) num menor período de tempo, trazendo vantagens para a empresa. Visto que há uma menor quantidade de humidade nos queijos, é de esperar também a redução da carga bacteriana. As bactérias mais nocivas para a conservação de produtos lácteos são bactérias proteolíticas, responsáveis pela destruição proteica, levando à degradação do queijo em termos organoléticos e aromáticos. Deste modo, a utilização de plantas pode funcionar como agente conservante do queijo por redução da humidade. A manutenção de ácidos gordos insaturados,

sobretudo nas incorporações de manjerição provou que os extratos de plantas têm efeitos conservantes no queijo, impedindo de alguma forma a peroxidação lipídica. As poucas alterações nutricionais dos queijos incorporados são desejáveis, visto que o que se pretendia com o trabalho era potenciar a conservação e conferir bioatividade aos queijos, não alterar o seu perfil nutricional.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao projeto PRODER No. 46577, PlantLact, à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro ao CIMO (projeto estratégico PEst-OE/AGR/UI0690/2014). Agradecem também às empresas Queijos Casa Matias, Mais Ervas e Cantinho das Aromáticas pelo fornecimento das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benzie, I.F.F. & Wachtel-Galor, S. (2011) – *Herbal medicine. Biomolecular and clinical aspects*. Second Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Boskabady, M.H., Kiani, S., Haghiri, B. (2005) – Relaxant effects of *Ocimum basilicum* on guinea pig thoracic chains and its possible mechanism(s). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 13, n. 1, p. 28-33.
- Carocho, M.; Barreira, J.C.M.; Antonio, A.L.; Bento, A.; Morales, P. & Ferreira, I.C.F.R. (2015b) – The incorporation of plant materials in “Serra da Estrela” cheese improves antioxidant activity without changing the fatty acid profile and visual appearance. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 117, n. 10, p. 1607-1614. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201500018>
- Carocho, M.; Barreira, J.C.M.; Bento, A.; Fernández-Ruiz, V.; Morales, P. & Ferreira, I.C.F.R. (2015c) – Chestnut and lemon balm based ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured “Serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, vol. 204, p. 185-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.136>
- Carocho, M.; Barros, L.; Barreira, J.C.M.; Calhelha, R.C.; Soković, M.; Fernández-Ruiz, V.; Buelga, C.S.; Morales, P. & Ferreira, I.C.F.R. (2016) – Basil as functional and preserving ingredient in “Serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, vol. 207, p. 51-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.085>
- Carocho, M.; Barros, L.; Bento, A.; Santos-Buelga, C.; Morales, P. & Ferreira, I.C.F.R. (2014a) – *Castanea sativa* Mill. Flowers amongst the most powerful antioxidant matrices: A phytochemical approach in decoctions and infusions. *Biomed Research International*, vol. 2014, art. 232956. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/232956>
- Carocho, M.; Barros, L.; Calhelha, R.C.; Ćirić, A.; Soković, M.; Santos-Buelga, C.; Morales, P. & Ferreira, I.C.F.R. (2015a) – *Melissa officinalis* L. decoctions as functional beverages: A bioactive approach and chemical characterization. *Food & Function*, vol. 6, n. 7, p. 2240-2248. <http://dx.doi.org/10.1039/C5FO00309A>
- Carocho, M.; Calhelha, R.C.; Queiroz, M.R.P.; Bento, A.; Morales, P.; Soković, M. & Ferreira, I.C.F.R. (2014b) – Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers as effective antitumor and antimicrobial matrices. *Industrial Crops and Products*, vol. 62, p. 42-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.016>
- Fernández-Ruiz, V.; Olives, A.I.; Cámara, M.; Sánchez-Mata, M.C. & Torija, M.E. (2011) – Mineral and trace elements content in 30 accessions of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.) and wild relatives (*Solanum pimpinellifolium* L., *Solanum cheesmaniae* L. Riley, and *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner). *Biological Trace Element Research*, vol. 141, n. 1-3, p. 329-339. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-010-8738-6>

- Hassanien, M.F.R., Mahgoub, S.A., El-Zahar, K.M. (2013). Soft cheese supplemented with black curcumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. *Saudi Journal of Biological Science*, vol. 21, n. 3, p. 280-288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.10.005>
- Junqueira-Gonçalves, M.P.; Cardoso, L.P.; Pinto, M.S.; Pereira, R.M. & Soares, N.F. (2011) – Irradiated beetroot extract as a colorant for cream cheese. *Journal of Radiation Physics and Chemistry*, vol. 80, n. 1, p. 114-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2010.08.002>
- Rasooli, I. (2007) – Food preservation – A biopreservative approach. *Food*, vol. 1, p. 111-136.