



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CULTURAS DE LACTOBACILOS  
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE SORO DE QUEIJO DE CABRA TIPO  
COALHO ATOMIZADO (PÓ) RECONSTITUÍDO FERMENTADO

MICHELANGELA SUELLENY DE CALDAS NOBRE

CAMPINA GRANDE, PB

2015

MICHELANGELA SUELLENY DE CALDAS NOBRE

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CULTURAS DE LACTOBACILOS  
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE SORO DE QUEIJO DE CABRA TIPO  
COALHO ATOMIZADO (PÓ) RECONSTITUÍDO FERMENTADO

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade  
Estadual da Paraíba para a obtenção  
do título de Mestre.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Carolina Alonso Buriti

CAMPINA GRANDE, PB

2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

N754i Nobre, Michelangela Suelleny de Caldas.  
Influência da adição de diferentes culturas de lactobacilos sobre as características de soro de queijo de cabra tipo coalho atomizado (pó) reconstituído fermentado [manuscrito] / Michelangela Suelleny de Caldas Nobre. - 2015.  
71 p. : il. color.

Digitado.  
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.  
"Orientação: Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti, Departamento de Farmácia".

1. Soro caprino. 2. Lactobacilos. 3. Probióticos. 4. Bebidas fermentadas. I. Título.

21. ed. CDD 637.3

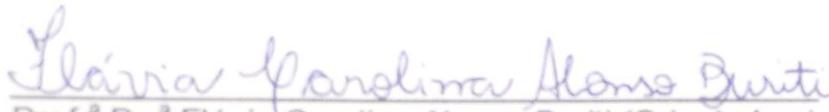
MICHELANGELA SUELLENY DE CALDAS NOBRE

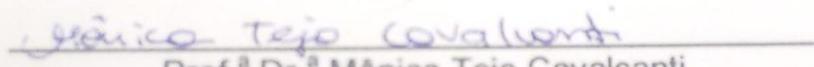
INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CULTURAS DE LACTOBACILOS  
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE SORO DE QUEIJO DE CABRA TIPO  
COALHO ATOMIZADO (PÓ) RECONSTITUÍDO FERMENTADO

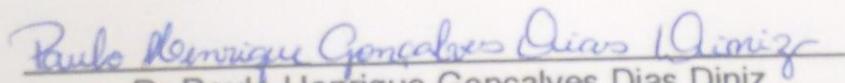
Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Estadual da Paraíba  
para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 24 /08 /2015.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Carolina Alonso Buriti (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Tejo Cavalcanti  
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

  
Dr. Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## **DEDICATÓRIA**

A minha mãe, Suely, pela dedicação,  
companheirismo e amizade.

Partilho com ela esta conquista.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela luz e força concedida a todo o momento.

À minha mãe, Suely, e meus irmãos, Mickelangela e Mickael, pela força, incentivo e apoio.

Ao meu noivo Ivan, pela compreensão e paciência nas horas de ausência, pela parceria e incentivo.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Carolina Alonso Buriti, pelos ensinamentos, dedicação, apoio e parceria que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos Elaine Pereira, Aline Pacheco e Thiago dos Santos, e à professora Eliane Rolim, pelo apoio e flexibilidade nos horários de trabalho.

Aos meus colaboradores de pesquisa Widson dos Santos, Daniely Farias e Blenda Queiroz, pelas horas dedicadas ao trabalho.

Aos professores Mônica Tejo, Germano Vêras, Karla Luna, Monica Simões, Simone Simões e Paulo Diniz pelas contribuições com conhecimentos, sugestões e revisões.

À Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada na cidade de Sobral-CE, pelo material cedido à pesquisa.

Aos Laboratórios de Ciência e Tecnologia de Alimentos, de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos, de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, de Química Analítica Quantitativa, de Genética e de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais da Universidade Estadual da Paraíba, e à empresa DuPont, por colaborarem com parte dos recursos materiais aqui utilizados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido para a realização desta pesquisa (processo 477799/2012-4).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da verba PROAP.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O soro caprino é um subproduto da produção queijeira e muitas vezes descartado sem nenhum tratamento como efluente, tornando-se uma fonte de poluição. Como alternativa, a utilização de soro de queijo para a produção de bebidas lácteas tem sido uma opção muito atraente, notadamente devido ao seu valor nutricional. Culturas probióticas são constituídas de microrganismos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, melhorando seu equilíbrio intestinal, podendo ser utilizadas em bebidas fermentadas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes culturas de lactobacilos com potencial probiótico sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sobre o padrão de degradação proteica de soro de queijo de cabra tipo coalho em pó reconstituído fermentado. O processo de fermentação foi realizado em quatro tratamentos, C1, C2, C3 e C4, adicionados, respectivamente, das culturas de *Lactobacillus casei* BGP93, *Lactobacillus paracasei* BGP1, *L. paracasei* LPC37 e *Lactobacillus rhamnosus* LR32, todos eles também adicionados de *Streptococcus thermophilus* TA40 como cultura *starter*. Foram monitorados os valores de pH, acidez titulável, *S. thermophilus* e *Lactobacillus* sp. no soro reconstituído após a adição das culturas antes da fermentação (TI), depois da fermentação (TF), e após um (D1) e sete (D7) dias de armazenamento a 4 °C. Foi avaliado o uso da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) como método alternativo para a determinação de populações de *Lactobacillus* sp. As análises de grau de proteólise pelo método o-ftaldialdeído (OPA), cromatografia líquida ultrarrápida de alta eficiência em fase reversa (RP-UFLC) e eletroforese em gel de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sódio) (SDS-PAGE) foram realizadas para avaliar a degradação proteica nas amostras ao longo do processamento e armazenamento. O soro contendo o microrganismo *L. rhamnosus* (C4) foi o que obteve pH mais baixo (4,83) e acidez mais alta (0,637g de ácido láctico/100 g) após 7 dias de armazenamento. A viabilidade de *Lactobacillus* sp. em todos os tratamentos (C1, C2, C3 e C4) obedeceu aos critérios nacionais para alimentos probióticos, mantendo-se acima de 9 log UFC na porção diária recomendada (200 ml). O método NIR mostrou-se adequado no método de calibração para os valores de *Lactobacillus* sp.; no entanto, faz-se necessária quantidade maior de amostras de cada tratamento para melhorar a performance dos modelos de calibração e na construção de modelos de predição a serem realizados em trabalhos posteriores. O teor proteico foi próximo de 25 mg/g em todos os tratamentos durante todos os períodos de amostragem e, portanto, sem diferenças significativas entre eles ( $p > 0,05$ ). Os cromatogramas do soro reconstituído sem adição da cultura apresentaram diferenças em relação àqueles obtidos para os tempos TI, TF, D1 e D7 em todos os tratamentos, provavelmente devido ao tratamento térmico aplicado nas amostras antes da adição das culturas. O grau de proteólise não diferiu significativamente entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ); entretanto, pela análise do conjunto de resultados obtidos, incluindo os dados de cromatografia e eletroforese para o tratamento C1, no qual houve o aparecimento de frações com baixo peso molecular, verificou-se uma tendência de maior atividade proteolítica no soro contendo a cultura probiótica *L. casei* BGP93.

**Palavras chaves:** soro de queijo de cabra, probióticos, proteólise.

## ABSTRACT

The goat milk whey is a by-product of cheese production and often discharged without any kind of treatment as effluent, becoming a source of pollution. Instead, the use of whey to produce dairy drinks has been a very attractive option, remarkably because of its nutritional value. Probiotic cultures contain microorganisms that bring health benefits to the host by improving its intestinal balance, and they can be used in fermented beverages. This study aimed to evaluate the influence of different potential probiotic lactobacilli cultures on the physicochemical and microbiological features, and also on the pattern of protein degradation on reconstituted and fermented goat Coalho Cheese whey powder. The fermentation process was performed in four trials, C1, C2, C3 and C4, added, respectively, of *Lactobacillus casei* BGP93, *Lactobacillus paracasei* BGP1, *L. paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* LPC37 LR32, all of them also added of *Streptococcus thermophilus* TA40 as starter culture. Titratable acidity, pH values, and viability of both *S. thermophilus* and *Lactobacillus* sp. were monitored in the reconstituted whey after adding cultures before fermentation (TI), after fermentation (TF), and after 1 (D1) and 7 (D7) days of storage at 4 °C. The use of near infrared spectroscopy (NIR) was evaluated as an alternative method for the determination of *Lactobacillus* sp. populations. The analyses of proteolysis by the method *o*-phthaldialdehyde (OPA), ultrafast reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-UFLC) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were performed to evaluate the protein degradation in samples throughout the processing and storage period. The whey added of *L. rhamnosus* (C4) obtained the lowest pH (4.83) and the highest acidity (lactic acid 0.637g / 100 g) after 7 days of storage. The viability of *Lactobacillus* sp. in all trials (C1, C2, C3 and C4) obeyed the Brazilian criteria for probiotic foods, remaining above 9 log CFU in the recommended daily serving portion (200 ml). The calibration procedure for *Lactobacillus* sp. values in NIR analysis was adequate; however, it is required additional samples of each trial to improve the performance of calibration models and the construction of prediction models to be performed in future studies. The protein content was around 25 mg/g in all treatments over all sampling periods and, therefore, no significant difference between them was verified ( $p > 0.05$ ). The chromatograms of the reconstituted whey without addition of cultures showed differences from those obtained for the TI, TF, D1 and D7 sampling periods in all trials, probably due to the thermal treatment of samples prior to the addition of cultures. The degree of proteolysis did not differ significantly between treatments ( $p > 0.05$ ); however, according with the analysis of all the results, including electrophoresis and chromatography data for the C1 trial, in which low molecular weight fraction was formed, there was a trend towards of higher proteolytic activity in goat cheese whey added of the probiotic culture *L. casei* BGP93.

**Keywords:** Goat cheese whey, probiotics, proteolysis.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Espectros NIR das amostras de soro em pó reconstituído adicionado da cultura *starter* de *S. thermophilus* TA40 e das culturas potencialmente probióticas *L. casei* BGP93 (C1), *L. paracasei* BGP1 (C2), *L. paracasei* LPC37 (C3) e *L. rhamnosus* LR32 (C4) antes da fermentação (TI), depois da fermentação (TF), e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7). ..... 46

**Figura 2** - Gráfico de escores da regressão dos espectros do soro em pó reconstituído adicionado da cultura *starter* de *S. thermophilus* TA40 e das culturas potencialmente probióticas *L. casei* BGP93 (C1), *L. paracasei* BGP1 (C2), *L. paracasei* LPC37 (C3) e *L. rhamnosus* LR32 (C4) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF), e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7), utilizando como parâmetro *Lactobacillus* sp. no componente principal 1 (PC1)..... 47

**Figura 3** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7). ..... 52

**Figura 4** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 (tratamento C2) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7). ..... 53

**Figura 5** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* LPC37 (tratamento C3) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7). ..... 53

**Figura 6** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. rhamnosus* LR32 (tratamento C4) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7). ..... 54

**Figura 7** - Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 17,5%, das proteínas presentes no soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7), juntamente com o padrão de peso molecular Sigma - S8445 (PM)..... 56

**Figura 8** - Análise densitométrica do padrão Sigma - S8445. .... 57

**Figura 9** - Análise densitométrica das proteínas presentes nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7), analisadas por SDS-PAGE, juntamente com o padrão de peso molecular Sigma S8445 (PM). .... 58

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Cepas e proporções utilizadas para cada tratamento ..... 31
- Tabela 2** - Valores de acidez titulável (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7). ..... 38
- Tabela 3** - Valores de pH (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7). ..... 40
- Tabela 4** - Populações de *S. thermophilus* (média  $\pm$  desvio padrão) obtidas para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7). ..... 42
- Tabela 5** - Populações de *Lactobacillus* sp. (média  $\pm$  desvio padrão) obtidas para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7). ..... 44
- Tabela 6** - Teores de proteína (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos para os tratamentos C1, C2, C3 e C4, no soro reconstituído sem microrganismo (SR) e adicionado de microrganismo, antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7). ..... 50
- Tabela 7** - Valores de proteólise (média  $\pm$  desvio padrão) obtidas para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7). ..... 51
- Tabela 8** - Unidades polipeptídicas reveladas (faixa de 121 – 28,35 kDa) nas análises eletroforéticas, com gel de 17,5%, nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7). ..... 60

**Tabela 9** - Unidades polipeptídicas reveladas (faixa de 26,05 – 5,32 kDa) nas análises eletroforéticas, com gel de 17,5%, nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7). ..... 61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE - Enzima Conversora de Angiotensina  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CMP - Caseino-Macropéptido  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
HCA - Análises de Agrupamentos Hierárquicos  
ICS - International Chemometrics Society  
Ig - Imunoglobulinas  
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade  
LF - Lactoferrina  
Mid-IR - Infravermelho Médio  
NIR - Infravermelho Próximo  
OPA - o-Ftaldialdeído  
PC- Componente Principal  
PCA - Análises de Componentes Principais  
PCR - Regressão por Componentes Principais  
PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais  
ANOVA - Análise de Variância  
RMSEC - Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada  
RMSEP - Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio de Previsão  
RNA - Ácido Ribonucleico  
RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa  
RP-UFLC - Cromatografia Líquida Ultrarrápida em Fase Reversa  
SA - Albumina do Soro  
SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio  
TCA - Ácido Tricloroacético  
Tris-HCl - Tris(hidroximetil)aminometano Hidroclorato  
UV - Ultravioleta  
 $\alpha$ -La - Alfa-Lactalbumina  
 $\alpha_{s1}$ -CS - Alfa- $s_1$ -Caseína  
 $\beta$ -Cs - Beta-Caseína  
 $\beta$ -Lg - Beta-Lactoglobulina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1 Alimento funcional</b> .....	15
<b>2.2 Alimentos probióticos</b> .....	16
<b>2.3 Importantes aspectos relacionados aos produtos de leite de cabra</b> .....	17
<b>2.4 Produtos de soro de leite caprino</b> .....	20
<b>2.5 Peptídeos bioativos obtidos a partir de proteínas do leite e soro de cabra</b> .....	21
<b>2.6 Técnicas analíticas utilizadas no estudo das modificações proteicas em alimentos</b> .....	24
<b>2.7 Aplicações da quimiometria e espectroscopia de infravermelho próximo na análise de alimentos</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	29
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>4.1 Obtenção das amostras de soro atomizado</b> .....	30
<b>4.2 Fermentação do soro lácteo atomizado reconstituído</b> .....	30
<b>4.3 Avaliação das características físico-químicas e da viabilidade dos microrganismos starter e probióticos no soro atomizado reconstituído fermentado</b> .....	32
4.3.1 pH e acidez titulável.....	32
4.3.2 Determinação das populações de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> .....	32
<b>4.4 Espectroscopia na região do infravermelho próximo</b> .....	33
<b>4.5 Determinação de proteínas no soro reconstituído puro e contendo as culturas lácticas e avaliação da atividade proteolítica ao longo dos períodos de amostragem</b> .....	33
4.5.1 Quantificação de proteínas.....	33
4.5.2 Determinação do grau de proteólise.....	34

<b>4.6 Análise por cromatografia líquida ultrarrápida de alta eficiência em fase reversa (RP-UFLC)</b> .....	34
<b>4.7 Determinação de atividade proteolítica através de eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)</b> .....	35
<b>4.8 Análise estatística dos dados</b> .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>5.1 Avaliação das características físico-químicas do soro atomizado reconstituído fermentado</b> .....	38
<b>5.2 Avaliação da viabilidade dos microrganismos “starter” e probióticos no soro atomizado reconstituído fermentado</b> .....	41
<b>5.3 Espectroscopia NIR</b> .....	46
5.3.1 Modelo de calibração .....	47
<b>5.4 Determinação do teor proteico e avaliação da atividade proteolítica dos microrganismos “starter” e probióticos no soro atomizado reconstituído fermentado</b> .....	49
<b>5.5 Análise por cromatografia líquida ultrarrápida de alta eficiência em fase reversa (RP-UFLC)</b> .....	52
<b>5.6 Determinação de atividade proteolítica através de eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)</b> .....	55
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um aumento na prevalência de doenças relacionadas à alimentação, como doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão, diabetes e até mesmo o câncer. A produção de novos alimentos funcionais está crescendo em resposta ao aumento do conhecimento sobre a relação dos alimentos e a saúde (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

O uso de leite e/ou soro de queijo com propriedades nutricionais particulares, como o de cabra, puro ou em combinação com cepas bacterianas com propriedades probióticas e/ou produtoras de metabólitos fisiologicamente ativos, representa uma das opções tecnológicas para a produção de novos alimentos funcionais (MINERVINI *et al.*, 2009; BURITI *et al.*, 2014). A composição nutricional do soro de leite, especificamente o seu teor de proteínas, possui alta qualidade nutritiva com efeitos positivos sobre a saúde humana.

No entanto, o soro gerado durante a produção industrial de queijo ainda é uma fonte importante de contaminação ambiental quando descartado sem tratamento. Um exemplo disto é que durante a produção de queijo de cabra tipo 'coalho' cerca de 9 litros de soro são gerados para cada quilo de queijo produzido. Dessa forma, o uso do soro de queijos para produção de produtos lácteos, inclusive no Brasil, implica um destino mais racional deste subproduto industrial, com um impacto benéfico ao ambiente. Além disso, a utilização de soro de queijo para a produção de bebidas lácteas tem sido uma opção altamente atraente, por ser o soro de leite um substrato interessante para veicular bactérias probióticas (BORBA *et al.* 2014; BURITI *et al.*, 2014).

Pesquisas voltadas à identificação dos efeitos benéficos à saúde através do consumo de probióticos têm avançado nos últimos 20 anos. Dentre as várias estratégias para incorporar probióticos em alimentos, a produção de produtos lácteos, como queijo, sorvete e leites fermentados com probióticos, vem sendo um dos segmentos mais desenvolvidos e pesquisados (MEDEIROS *et al.*, 2014).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes culturas de lactobacilos com potencial probiótico sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sobre o padrão de degradação protéica de soro de queijo de cabra tipo coalho atomizado reconstituído fermentado. Para esta finalidade, o soro de queijo de cabra seco por atomização foi utilizado devido a maior facilidade de conservação, transporte e armazenamento, podendo desta forma minimizar os riscos de contaminação e aumentar a estabilidade do produto final. Além disso, oferece maior confiabilidade na padronização da quantidade de sólidos utilizada nas formulações e garantir maior homogeneidade do produto.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Alimento funcional

As pesquisas correlacionando alimentos e saúde têm sido cada vez mais estimuladas pela crescente modificação nos hábitos alimentares da população e sua relação com o aumento significativo de doenças como hipertensão, diabetes e obesidade.

Uma mudança no perfil de alimentos produzidos pelas indústrias ocorreu na convergência de diversos fatores críticos, como a consciência do desgaste da saúde pessoal devido ao estilo de vida agitado, às escolhas inadequadas dos alimentos de conveniência (alimentos prontos para o consumo, produtos congelados, misturas em pó para o preparo de alimentos, etc.) e à falta de exercício físico. Observa-se o investimento da indústria em produtos contendo ingredientes naturais, saudáveis e nutritivos (internacionalmente denominados “*better for you foods*”), no setor de alimentos orgânicos, bem como na produção de alimentos funcionais, alegando propriedades de saúde como uma forma clara de diferenciar os seus produtos e, na maioria dos casos, agregar valor e melhorar a margem de lucro (GRANATO *et al.*, 2010).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução nº 18 de 30/04/1999, define alimento funcional como “todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

O mercado de alimentos e bebidas funcionais tem atraído um grande número de empresas de alimentos e bebidas e de consumidores em diversos países. Informações referentes a 2007 mostraram que o gasto anual do consumidor médio norte-americano em alimentos e bebidas funcionais foi de cerca de US\$ 90, resultando em um mercado superior a US\$ 27 bilhões naquele ano. No ano de 2000, o mercado mundial de alimentos funcionais gerou US\$ 33 bilhões e em 2005 esse total foi de US\$ 73,5 bilhões. Para o período posterior a 2010, o mercado foi estimado em US\$ 167 bilhões, com um potencial de crescimento anual de 10%. No Brasil, as vendas de alimentos

funcionais em 2007 atingiram US\$ 500 mil, que correspondeu a quase 1% do total das vendas de alimentos. Além disso, cerca de 65% do total de alimentos funcionais comercializados no Brasil naquele momento eram produtos probióticos. No Japão, considerado como o local de origem dos alimentos funcionais, o mercado desses produtos também tem sido significativo (GRANATO *et al.*, 2010).

## **2.2 Alimentos probióticos**

Os probióticos são microrganismos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro melhorando seu equilíbrio intestinal. Para que se tenha o efeito desejado à saúde, esses microrganismos devem sobreviver através das barreiras gastrointestinais em número suficiente. Neste sentido, o leite fermentado tem sido o veículo de base alimentar mais utilizado para fornecer bactérias probióticas (RANADHEERA *et al.*, 2014; CASAROTTI; PENNA, 2015).

A seleção das bactérias probióticas tem como base os critérios: de gênero, origem e estabilidade frente ao ácido estomacal e aos sais biliares, capacidade de aderir à mucosa intestinal, capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrintestinal humano, capacidade de produzir compostos antimicrobianos e atividade metabólica no intestino (RAIZEL *et al.*, 2011).

Segundo a ANVISA, “a quantidade mínima viável de microrganismos probióticos para alimentos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Vários benefícios à saúde têm sido atribuídos a cepas de *Lactobacillus* spp., as quais têm recebido grande atenção como microrganismos probióticos (VARGA; SÜLE; NAGYT 2014).

Linhagens de lactobacilos isoladas de leite de cabra argeliana foram caracterizadas como microrganismos com potencial industrial, no tocante à

utilização em derivados lácteos como culturas adjuntas. As principais características favoráveis a esta finalidade foram a atividade proteolítica, a tolerância a concentrações de sais biliares de até 1%, a ausência de atividade  $\beta$ -hemolítica e de produção de aminas bioativas, a produção de diacetil e a sensibilidade a antibióticos inibidores da síntese de parede celular (MARROKI; BOUSMAHA-MARROKI, 2014).

Xanthopoulos, Ipsilandis e Tzanetakakis (2012), em estudo realizado com culturas de microrganismos isoladas de fezes de recém-nascidos, verificaram que as cepas *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DC412 e *Lactobacillus acidophilus* DC602 apresentaram propriedades probióticas potenciais *in vitro* tais como resistência ao baixo pH, tolerância a 0,15% de sais biliares, remoção do colesterol a partir do meio e resistência à lisozima na concentração de 100 ppm.

Didelot *et al.* (2006) verificaram que o soro de leite de cabra fermentado com uma co-cultura de *Candida parapsilosis* e *Lactobacillus paracasei* produziu peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina, conferindo um potencial anti-hipertensivo ao produto.

Wang *et al.* (2012), em estudo com iogurte de leite de cabra probiótico produzido com culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium* spp., mostrou que a viabilidade do microrganismo *L. acidophilus* foi superior ao valor mínimo necessário para efeitos benéficos ao longo de 3 semanas de armazenamento, enquanto que tal viabilidade para *L. casei* e *Bifidobacterium* spp. foi mantida mesmo após 12 semanas de vida de prateleira. Já Donkor *et al.* (2007), em estudo com iogurte probiótico fermentado a partir de diferentes culturas de microrganismos, obtiveram a inibição da enzima conversora de angiotensina e atribuíram essa atividade aos peptídeos liberados no produto final.

### **2.3 Importantes aspectos relacionados aos produtos de leite de cabra**

A importância do leite de animais não bovinos está crescendo em todo o mundo, não só em termos de quantidade (15% da produção global de leite),

mas também em termos culturais, econômicos e de interesse ecológico (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2013).

Muitos autores têm chamado a atenção para os benefícios dos leites de cabra e ovelha, devido à sua atividade moduladora de funções fisiológicas e às propriedades redutoras de risco de doenças crônicas (HERNÁNDEZ-LEDESMA; RAMOS; GÓMEZ-RUIZ, 2011). O leite de cabra resulta em efeitos benéficos para a nutrição de crianças e idosos, além de poder ser consumido sem efeitos negativos por pessoas que sofrem de alergia às proteínas do leite de vaca. A menor alergenicidade em comparação ao leite de vaca levou a um aumento do interesse no leite de cabra como alimento funcional. Atualmente, o consumo de leite de cabra faz parte da tendência para uma alimentação saudável nos países desenvolvidos (HASSAN *et al.*, 2014). O leite de cabra possui algumas propriedades particulares que conferem vantagens tecnológicas em comparação com o leite de vaca, como um menor tamanho dos glóbulos de gordura, o que proporciona uma textura mais suave, em produtos derivados, quantidades menores da fração  $\alpha_{s1}$ -caseína, resultando em um coágulo mais suave, uma maior capacidade de retenção de água e menor viscosidade (YANGILAR, 2013).

Uma variedade de produtos é elaborada com leites de cabra e ovelha. Alguns dos mais conhecidos são os queijos Roquefort, Pecorino Romano, Feta, Manchego, Bryndza e os queijos franceses de leite de cabra, os quais, devido à sua textura e sabor, bem como suas propriedades nutricionais e benefícios à saúde, têm sido uma alternativa valiosa e saudável aos produtos de leite de vaca (HERNANDES-LEDESMA; RAMOS; GÓMEZ-RUIZ, 2011).

Devido ao seu valor alimentar, nutricional, e aos benefícios adicionais à saúde, os produtos caprinos chamam a atenção para o desenvolvimento da caprinocultura, bem como para o aumento da produção de leite e carne caprina. O leite de cabra é uma excelente matéria-prima, a partir da qual, produtos de alto valor nutritivo são elaborados (BERNACKA, 2011). Porém, o leite de cabra pode apresentar grande variabilidade na composição bioquímica, propriedades tecnológicas e qualidade bacteriológica de acordo com fatores genéticos, condições ambientais e práticas agrícolas (HASSAN *et al.*, 2014).

No Brasil, apesar das ricas propriedades nutricionais e funcionais do leite de cabra e, como consequência do soro de leite de cabra, derivado da produção de queijos, ainda são poucos os produtos fabricados e comercializados a partir destas matérias-primas. Porém, nota-se que já existem alguns produtos de cabra comercializados no país, incluindo leite em pó, doce de leite que pode ser adicionado de coco, nozes e frutas desidratadas, rapadura, chocolates, cookies e biscoitos como sequilhos (RIBEIRO; RIBEIRO, 2010).

No entanto, sabe-se que a aceitabilidade do leite de cabra e alimentos derivados é reduzida entre a população não familiarizada com tais produtos. Nesse sentido, Costa *et al.* (2014) avaliaram a expectativa de consumidores não usuais em relação a iogurtes de leite de cabra (probióticos e convencionais) e investigaram se a exposição repetida pode aumentar a aceitação a esses produtos. Como resultado, estes autores demonstraram que as expectativas em relação aos iogurtes de origem caprina são significativamente inferiores aos de origem bovina, constatando a falta de familiaridade dos consumidores com aqueles produtos. Quanto à exposição repetida, observou-se que houve um aumento significativo da familiaridade dos consumidores com o iogurte de cabra em um período de 6 dias e demonstrou-se uma correlação positiva entre a exposição e a aceitação no período testado. Não foram observadas diferenças na aceitação entre iogurte de leite cabra probióticos e convencionais. Dessa forma, segundo os autores, o aumento da exposição dos consumidores aos alimentos de leite de cabra é uma estratégia para aumentar a sua aceitabilidade desses produtos.

Assim, o uso de leite e/ou soro de queijo de cabra, que apresenta propriedades nutricionais particulares, na forma pura ou em combinação com cepas de bactérias com propriedades probióticas e produtoras de metabólitos fisiologicamente ativos, representa uma das opções de tecnologia para a fabricação de novos alimentos lácteos funcionais (HASSAN *et al.*, 2014).

## **2.4 Produtos de soro de leite caprino**

As proteínas do soro do leite exibem uma série de atividades biológicas que influenciam a digestão, respostas metabólicas aos nutrientes absorvidos, crescimento e desenvolvimento de órgãos específicos e resistência a doenças.

As principais proteínas do soro de leite caprino são  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), estando a  $\beta$ -Lg em maior concentração (1,8 – 2,8 g/L) em relação à  $\alpha$ -La (0,6 – 1,1 g/L). As imunoglobulinas (Ig), albumina do soro (SA) e proteose-peptonas estão presentes em concentrações menores. Outra proteína solúvel encontrada em pequenas quantidades é a lactoferrina (LF) e, no caso do soro de queijo de coagulação enzimática, o caseino-macropeptídeo (CMP) também está presente (HERNÁNDEZ-LEDESMA; RAMOS; GÓMEZ-RUIZ, 2011).

Diversos produtos têm sido desenvolvidos visando o aproveitamento do soro lácteo caprino. Borba *et al.* (2014) desenvolveram um creme de ricota a partir da adição de soro e leite de cabra e de vaca, justificando esta mistura devido ao aroma e sabor pronunciado existente em produtos lácteos produzidos apenas com leite de cabra ou soro de leite de cabra, representando obstáculos para uma maior aceitação destes produtos. Dessa forma, o soro de diversos tipos de queijo de cabra pode ser aproveitado na elaboração de novos alimentos e utilizado tanto na forma *in natura*, como passar previamente por processo de secagem.

A tecnologia de secagem por atomização (também conhecida por nebulização ou pulverização) é adequada para secar muitos produtos sensíveis ao calor, como produtos lácteos, alimentos em geral e produtos farmacêuticos, devido ao curto tempo de secagem e à capacidade para obter um produto sob a forma de pó. A vantagem deste tipo de secagem inclui, portanto, a combinação de um processamento de tempo curto que leva à obtenção de um produto de melhor qualidade. Tal como observado para leites bovinos, o processo de secagem é uma excelente opção para estender a vida de prateleira do leite de cabra, convertendo o leite em pó, sem alterar suas características nutricionais e sensoriais (REDDY *et al.*, 2014). Portanto, este processo é vantajoso para a secagem do soro lácteo caprino, de modo a prolongar o seu tempo de armazenamento.

## **2.5 Peptídeos bioativos obtidos a partir de proteínas do leite e soro de cabra**

Peptídeos bioativos são definidos como componentes derivados de alimentos que, complementarmente ao seu valor nutricional, exercem um efeito fisiológico no organismo. Esses peptídeos são inativos quando íntegros dentro da sequência de aminoácidos da proteína principal e precisam ser liberados para exercer algum efeito (RYAN *et al.*, 2011).

Conforme revisado por Hernández-Ledesma *et al.* (2014), alimentos proteicos são normalmente hidrolisados em uma larga variedade de peptídeos durante o processo de digestão gastrointestinal. Alguns dos peptídeos liberados compartilham características estruturais semelhantes a de peptídeos endógenos, como angiotensina e bradicinina, podendo agir no organismo como moduladores agonistas ou antagonistas de funções fisiológicas. Dentre as propriedades dessas moléculas biologicamente ativas se destacam as ações anti-hipertensiva, antiinflamatória, antioxidante, hipocolesterolêmica, moduladora da absorção de minerais, contra *diabetes mellitus* tipo 2, antimicrobiana, imunomoduladora, entre outras.

As proteínas do leite, assim como um grande número de outras proteínas alimentares, contêm sequências de aminoácidos que, quando libertadas como peptídeos por hidrólise enzimática ou fermentação, exercem efeito fisiológico benéfico (GOBBA *et al.*, 2014). As proteínas naturais do leite, em especial  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -Cs) e  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -Cs), e as proteínas do soro, como  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, Ig, lactoperoxidase, lisozima e lactoferrina, incluindo glicomacropéptídeos encontrados no soro de queijos de coagulação enzimática, vêm sendo reconhecidas como fonte de peptídeos bioativos quando digeridas por enzimas (ALMAAS *et al.*, 2011; RAIKOS; DASSIOS, 2014). Tais peptídeos bioativos podem afetar o sistema cardiovascular, exercendo efeitos antitrombóticos, anti-hipertensivos, opióides, antioxidantes, imunomoduladores entre outros. Peptídeos bioativos foram identificados principalmente a partir de leite de vaca, mas as proteínas do leite de cabra também podem fornecer peptídeos com atividades antioxidante, antibacteriana, imuno-moduladora e de inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE) (ESPEJO-CARPIO *et al.*, 2013; GOBBA *et al.*, 2014).

Peptídeos bioativos podem ser formados a partir de vários métodos incluindo a fermentação microbiana com culturas vivas, hidrólise e proteólise enzimática utilizando enzimas de origem fúngica, bacteriana ou vegetal (KENT *et al.*, 2012).

Vários produtos comerciais enriquecidos com peptídeos bioativos estão disponíveis no mercado internacional. A maioria destes produtos foi produzida com peptídeos bioativos provenientes do leite de vaca e estudos recentes ainda têm abrangido essencialmente a separação, caracterização, produção e biodisponibilidade dos peptídeos bioativos derivados do leite daquela espécie (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2013).

Em comparação ao número de trabalhos disponíveis sobre as proteínas e peptídeos de origem bovina, ainda são poucos os estudos sobre peptídeos liberados a partir de proteínas de soro de leite de ovinos e caprinos. No entanto, observa-se que as estruturas primárias destas proteínas mostram uma grande homologia com os observados para as proteínas de origem bovina, indicando que as proteínas do soro do leite de ovinos e caprinos também podem atuar como fonte de numerosos peptídeos bioativos (HERNÁNDEZ-LEDESMA; RAMOS; GÓMEZ-RUIZ, 2011).

Em estudo realizado por Kullisaar *et al.* (2003) na cidade de tartu na Estônia, com 21 participantes, sendo cinco homens e dezesseis mulheres, foi avaliado o efeito do consumo de leite de cabra fermentado com probiótico (*Lactobacillus fermentum*) sobre os marcadores de estresse oxidativo (incluindo marcadores de aterosclerose) em sangue e urina humanos e sobre a microbiota intestinal. Dentre os resultados obtidos, os autores destacaram a melhora dos fatores antiaterogênicos através da diminuição dos níveis sanguíneos de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em todos os participantes do grupo que recebeu o leite de cabra fermentado. De acordo com os autores, estes efeitos benéficos podem estar relacionados com a liberação de peptídeos bioativos a partir das proteínas do leite durante a fermentação.

Peptídeos antioxidantes são também interessantes para a indústria de alimentos por atuarem potencialmente na prevenção ou no atraso da deterioração oxidativa, contribuindo para o prolongamento da vida útil de

alimentos. Gobba *et al.* (2014), constataram que os peptídeos liberados da hidrólise enzimática de frações proteicas do leite de cabra, especialmente aqueles contendo tirosina, foram eficientes na captação de radicais livres e na inibição da formação de produtos secundários da oxidação de lipídios.

Almaas *et al.* (2011) estudaram *in vitro* a presença de peptídeos antibacterianos derivados do soro caprino após hidrólise por enzimas gastrointestinais humanas. Os peptídeos obtidos exerceram forte atividade contra os patógenos *Escherichia coli* (cepa K12), *Bacillus cereus* (cepa RT INF01) e *Listeria monocytogenes*, e foram inativos contra o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (cepa ATCC 53103). Portanto, a ação antimicrobiana contra os agentes patógenos e a inatividade ao probiótico estudado são indicativos do potencial uso clínico do soro caprino.

Nas últimas décadas, pesquisas *in vitro* indicam que proteínas do leite e peptídeos derivados de sua hidrólise enzimática possuem a capacidade moduladora na ativação e proliferação de linfócitos. Eriksen *et al.* (2008) pesquisaram a atividade moduladora de peptídeos derivados de soros de queijos de cabra e de vaca sobre células mononucleares periféricas do sangue humano. Para hidrólise das proteínas do soro foram utilizados sucos gástrico e duodenal humanos e proteases comerciais, simulando o processo de digestão *in vivo*. Foi detectado que os hidrolisados obtidos de soro lácteo caprino e bovino apresentaram potencial de inibição dose-dependente das células mononucleares periféricas, através de mecanismo ainda não elucidado, sendo sugerido que as frações proteicas afetam a produção de sinais de ativação envolvidos na proliferação de linfócitos.

A propriedade de inibição da ACE recebe ampla atenção devido aos potenciais efeitos benéficos no tratamento da hipertensão. A ACE é uma metalopeptidase contendo zinco em sua estrutura que atua no sistema renina-angiotensina-aldosterona transformando angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstrictor, e catalisa a degradação da bradicinina, um nanopeptídeo com propriedade hipotensora. Dessa forma, a inibição dessa enzima pode resultar na diminuição da pressão arterial (ESPEJO-CARPIO *et al.*, 2013).

De acordo com Madureira *et al.* (2010), os peptídeos inibidores da ACE derivados de caseínas ( $\alpha_{s1}$ -Cs e  $\beta$ -Cs), são denominados casoquininas enquanto que aqueles derivados de proteínas do soro ( $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg) são chamados de lactoquininas.

Estudos evidenciam a liberação de peptídeos inibidores da ACE a partir da fermentação ou por hidrólise enzimática das frações proteicas do leite de cabra. Na pesquisa realizada por Espejo-Carpio *et al.* (2013) a hidrólise por duas proteases comerciais de frações proteicas do leite e do soro caprino produziu peptídeos ativos na inibição da ACE, com destaque de melhor atividade inibitória para os peptídeos liberados a partir da caseína. Didelot *et al.* (2006), utilizando soro caprino como substrato, verificaram que a fermentação pela co-cultura *Candida parapsilosis* e *Lactobacillus paracasei* resultou na formação de peptídeos com ação inibitória sobre a ACE, sendo o mais potente caracterizado e identificado como WLAHK ( $\alpha$ -La f(104–108): Trp–Leu–Ala–His–Lys).

Hammé *et al.* (2010) investigaram o efeito das lactoquininas liberadas de proteínas do soro caprino fermentado por uma co-cultura de *Kluyveromyces marxianus* e *Lactobacillus rhamnosus* na adipogênese e no conteúdo lipídico de adipócitos humanos. Foi constatada a redução *in vitro* da proliferação de pré-adipócitos após incubação com o hidrolisado e, após isolamento, foi verificado que o triptofano induziu a redução de 18% do conteúdo lipídico.

## **2.6 Técnicas analíticas utilizadas no estudo das modificações proteicas em alimentos**

Nos últimos anos, várias técnicas analíticas têm sido utilizadas para o estudo tanto do teor das frações proteicas no leite, que podem variar em função de variáveis ambientais e da alimentação animal, como das modificações proteicas que ocorrem em alimentos, especialmente naqueles com maior potencial de apresentarem peptídeos bioativos, principalmente produtos lácteos fermentados e leite de cabra e derivados. Estas técnicas incluem análises eletroforéticas, utilizando géis de poliacrilamida com

dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), cromatográficas, espectroscópicas, entre outras.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um dos métodos utilizados para analisar frações de proteínas do leite. É uma análise rápida caracterizada por obter boas separações, alta resolução, precisão e reprodutibilidade dos resultados (BONFATTI *et al.*, 2008).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é uma técnica relativamente simples e com alta seletividade. Consiste na separação de moléculas (proteínas, ácido desoxirribonucleico-DNA e ácido ribonucleico-RNA) carregadas em um determinado meio sobre a influência de uma diferença de potencial. Dessa forma, as moléculas são separadas de acordo com o tamanho, as de menores massas molares migram primeiro do que as de maiores massas molares. A presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) no gel de poliacrilamida assegura uma condição desnaturante às proteínas (BOSSU, 2009).

O método o-ftaldialdeído (OPA) com mercaptoetanol é uma técnica fluorométrica útil para a determinação de aminas primárias e peptídeos. É um método rápido, sensível e simples, e é diretamente aplicável a todas as proteínas (CHURCH *et al.*, 1983).

Donkor *et al.* (2007) avaliaram a atividade proteolítica em lotes de iogurte produzidos com cepas probióticas selecionadas (*Lactobacillus acidophilus* L10, *Bifidobacterium lactis* B94 e *Lactobacillus paracasei* L26) em comparação com os lotes de iogurte controle (sem probióticos) através do método OPA, concluindo que houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na quantidade de grupamentos amino liberados nos iogurtes probióticos em comparação com o controle durante a fermentação e ao longo do armazenamento, indicando atividade proteolítica dos microrganismos probióticos. No mesmo estudo, os autores avaliaram também a extensão da proteólise através de SDS-PAGE, além de isolarem os peptídeos solúveis em água através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). Estas duas análises indicaram que o perfil proteolítico no

iogurte de controle era diferente e menor quando comparado ao iogurte probiótico.

Santillo *et al.* (2009) avaliaram o papel de enzimas nativas do leite de cabra da raça gargânica na proteólise da caseína na presença e ausência de inibidores de protease específicos através das técnicas de RP-HPLC e SDS-PAGE. Os autores observaram que o perfil de proteólise mudou de acordo com o tipo de inibidor de protease utilizado e que, portanto, as enzimas nativas são importantes para a hidrólise da caseína.

Raimondo *et al.* (2013) ao estudarem, durante o período de seca, a concentração das proteínas do soro de leite de cabra, principalmente aquelas associadas ao sistema imune como SA, LF e Ig, utilizando a técnica de SDS-PAGE, relataram um aumento progressivo na concentração total destas proteínas, fato explicado, provavelmente, pelo aumento da necessidade animal de prevenir infecções durante este período.

## **2.7 Aplicações da quimiometria e espectroscopia de infravermelho próximo na análise de alimentos**

A *International Chemometrics Society* (ICS) define quimiometria como a área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para extrair o máximo de informação química a partir da análise dos dados multivariados. O crescimento e desenvolvimento da quimiometria estão fortemente relacionados com o desenvolvimento e a popularização dos microprocessadores, nas décadas de 1970 e 1980, resultando em equipamentos analíticos que permitiram a aquisição de uma grande quantidade de informação sobre uma amostra em pouquíssimo tempo, como, por exemplo, espectros de UV/visível, de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e espectroscopia de infravermelho médio (Mid-IR) (BOTELHO, 2014).

As técnicas quimiométricas podem ser divididas em três classes distintas: a análise exploratória de dados, que utiliza os métodos de análises de componentes principais (PCA) e agrupamentos hierárquicos (HCA); a construção de modelos quantitativos de calibração, que utilizam regressão por

componentes principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS); e a construção de modelos qualitativos de classificação (SANTOS, 2005). O método PLS relaciona a informação contida no bloco Y, das variáveis independentes (concentração do analito ou outras propriedades), com o bloco X, das variáveis dependentes (espectrais), durante a decomposição dos dados, utilizando os dois blocos simultaneamente. Por outro lado, o método PCR decompõe X separadamente e depois correlaciona seus escores com Y, através de uma regressão linear múltipla (BOTELHO, 2014).

A espectroscopia NIR tem aplicações em diversos campos, incluindo a ciência e tecnologia de alimentos. Devido à alta capacidade de absorção de água na região do infravermelho próximo, a espectroscopia NIR tem sido amplamente utilizada para estudar a água e as interações água-soluto. Neste sentido, a espectroscopia NIR resulta em uma ferramenta bastante útil para as análises de mudanças que ocorrem na estrutura da água, sendo utilizada para analisar mudanças físicas associadas com a umidade em alimentos e produtos agrícolas, determinar atividade de água e investigar estados amorfos de açúcares (SANTOS *et al.* 2014a).

As técnicas espectroscópicas, especialmente em NIR, destacam-se entre as recentes metodologias analíticas para análise de alimentos por permitirem o monitoramento não destrutivo e rápido de vários parâmetros nos alimentos. Em alguns produtos lácteos, especialmente queijos, a espectroscopia em NIR é atualmente utilizada para determinação de umidade, gordura e proteína. Estudos apontam a sensibilidade da espectroscopia NIR no monitoramento da coagulação do leite durante a fabricação de queijos, na detecção de misturas de leite de diferentes espécies e na avaliação da influência da alimentação e da altitude na qualidade do leite (CASTILLO *et al.*, 2000; GONZÁLEZ-MARTÍN *et al.*, 2007; VALENTI *et al.*, 2013; ABDELGAWAD; GUAMIS; CASTILLO 2014).

González-Martín *et al.* (2007) analisaram queijos produzidos com 16 diferentes proporções de leites de vaca, ovelha e cabra pelo uso de espectroscopia NIR, obtendo resultados satisfatórios, demonstrando que através da utilização desta metodologia é possível identificar os diferentes tipos

de leite utilizados na elaboração destes queijos e quantificar o seu teor, podendo esta técnica ser utilizada para detectar práticas fraudulentas.

Aliakbarian *et al.* (2015) utilizaram a espectroscopia NIR para classificar e avaliar a estabilidade de leite fermentado com *Streptococcus thermophilus* (TA40) e *Lactobacillus acidophilus* (LAC4) adicionado de compostos fenólicos extraídos de bagaço de azeitona e uva, concluindo que o NIR pode ser considerado uma alternativa rápida e viável para a caracterização das amostras, pois obteve 98,7% de correta classificação das amostras quanto à fonte de fenólicos, 92% da predição interna total e 81% da predição externa.

Cámara-Martos *et al.* (2015) através da metodologia NIR detectaram *Escherichia coli* ATCC25922, referência para os microrganismos indicadores de higiene, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, referência para os indicadores de deterioração no leite integral alcançando uma variância explicada de 99,41% em PC1, enquanto em PC2 foi alcançado somente 0,50%.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência de diferentes culturas de lactobacilos com potencial probiótico sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sobre o padrão de degradação proteica de soro de queijo de cabra em pó reconstituído fermentado.

#### **3.2 Objetivos específicos**

São objetivos específicos do presente trabalho:

- a) avaliar a viabilidade dos microrganismos *starter* e potencialmente probióticos utilizados na fermentação do soro reconstituído e as modificações de pH e acidez;
- b) investigar o uso da espectroscopia no infravermelho próximo com um método alternativo para o estudo das características microbiológicas do soro fermentado;
- c) determinar o teor proteico total dos soros de queijo tipo coalho de cabra após sua reconstituição e fermentação;
- d) caracterizar as proteínas do soro atomizado (pó) de queijo tipo coalho de cabra;
- e) identificar as bactérias lácticas potencialmente probióticas mais proteolíticas;
- f) avaliar o perfil de degradação proteica após a secagem, sua reconstituição e fermentação das bactérias lácticas identificadas como proteolíticas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção das amostras de soro atomizado

As amostras de soro atomizado em pó foram fornecidas pela Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada na cidade de Sobral-CE. O soro utilizado para a secagem foi obtido a partir do processamento de queijo tipo coalho de cabra. O soro foi seco em mini-atomizador Büchi, modelo B-290, empregando-se temperatura de entrada de 160 °C, temperatura de saída de 90-92 °C, fluxo de ar em condições normais de temperatura e pressão igual a 667 L/h e velocidade de bombeamento igual a 25 mL/min.

### 4.2 Fermentação do soro lácteo atomizado reconstituído

O soro de queijo de cabra tipo coalho em pó foi reconstituído em água destilada (20%, m/m). Em seguida, foi tratado termicamente a 85 °C por um período de 30 minutos e resfriado até 45 °C para adição das culturas lácticas (ORDÓÑEZ-PEREDA *et al.*, 2005). As culturas utilizadas para as formulações foram: *Streptococcus thermophilus* (TA40, DuPont), *Lactobacillus casei* (BGP93, Sacco), *Lactobacillus paracasei* (BGP1, Sacco), *Lactobacillus paracasei* (LPC37, DuPont) e *Lactobacillus rhamnosus* (LR32, DuPont).

Quatro tratamentos (C1, C2, C3 e C4) foram produzidos em quatro lotes (quatro repetições genuínas de cada tratamento). A cultura *starter* liofilizada de *S. thermophilus* TA40 foi adicionada em todos os tratamentos, os quais diferiram entre si apenas na combinação com os microrganismos adjuvantes potencialmente probióticos. No tratamento 1 (C1) a cultura *starter* foi combinada com *L. casei* BGP93; no tratamento 2 (C2) com *L. paracasei* BGP1; no tratamento 3 (C3) com *L. paracasei* LPC37; e no tratamento 4 (C4) com *L. rhamnosus* LR32. As proporções utilizadas de cada microrganismo, definidas em estudos preliminares realizados por este grupo de pesquisa (SANTOS *et al.*, 2013), são especificadas na **Tabela 1**. Depois de adicionadas as culturas lácticas, o soro reconstituído foi incubado a 45 °C em estufa microprocessada. Após a fermentação, os produtos foram armazenados sob refrigeração a 4 °C por 7 dias.

**Tabela 1** - Cepas e proporções utilizadas para cada tratamento.

Microrganismo	Tratamentos			
	C1	C2	C3	C4
<i>S. thermophilus</i> TA40 (mg/100 g)	3,00	3,00	3,00	3,00
<i>L. casei</i> BGP93 (mg/100 g)	20,00	-	-	-
<i>L. paracasei</i> BGP1 (mg/100 g)	-	20,00	-	-
<i>L. paracasei</i> LPC37 (mg/100 g)	-	-	5,00	-
<i>L. rhamnosus</i> LR32 (mg/100 g)	-	-	-	20,00

Legenda: - = Ausente.

Nos estudos iniciais realizados por este grupo de pesquisa, foi verificado que a cultura de *L. paracasei* LPC37 na proporção de 20 mg/100g, apresentava uma concentração celular muito superior às demais culturas na mesma proporção. Naqueles estudos, foi sugerido o uso de uma menor proporção da cultura de *L. paracasei* LPC37 (5 mg/100 g), a qual resultaria em viabilidade deste microrganismo comparável às demais culturas de *Lactobacillus* utilizadas em maior proporção, além desta redução ser mais vantajosa em termos econômicos para a indústria (SANTOS *et al.*, 2013, 2014b).

As amostras de soro reconstituído foram coletadas para as análises antes da adição das culturas (SR), após a adição das culturas antes do início da fermentação (TI), ao final da fermentação (TF), e após 1 e 7 dias de armazenamento a 4 °C (D1 e D7, respectivamente). Com exceção, das determinações de acidez titulável, pH, e das populações de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* sp. que foram realizadas nos períodos de amostragem mencionados (TI, TF, D1 e D7), todas as demais análises foram realizadas a partir de amostras previamente congeladas a -18 °C nos períodos de amostragem mencionados.

### **4.3 Avaliação das características físico-químicas e da viabilidade dos microrganismos starter e probióticos no soro atomizado reconstituído fermentado**

#### 4.3.1 pH e acidez titulável

Ao longo da fermentação, os parâmetros pH e acidez titulável, utilizando os métodos 017/IV e 016/IV, respectivamente, foram monitorados. Estas medições foram utilizadas como controle do processo de fermentação, de forma que, quando o soro reconstituído atingiu a faixa de pH entre 4,8 e 4,9 e acidez entre 0,5 e 0,6 g de ácido láctico/100g de soro, a fermentação foi interrompida. Estes parâmetros também foram avaliados após 1 e 7 dias de armazenamento do produto final sob refrigeração a 4 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.3.2 Determinação das populações de *S. thermophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*

Os microrganismos probióticos e *starter* foram avaliados no soro reconstituído no início (tempo inicial - TI) e no término da fermentação (tempo final - TF) e após um e sete dias (D1 e D7, respectivamente). As populações de *S. thermophilus* (cultura *starter*) e dos microrganismos potencialmente probióticos (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*) foram determinadas por cultivo em meios de cultura apropriados. A população de *S. thermophilus* foi determinada por plaqueamento de diluições decimais seriadas dos soros reconstituídos fermentados (1 mL) em placas adicionadas de ágar M17 contendo lactose, segundo o método descrito por Richter e Vedamuthu (2001), e incubadas em aerobiose a 35-37 °C por 48 horas. A determinação de *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* ocorreu em ágar De Man Rogosa Sharpe (MRS) acidificado até pH 5,4 com ácido acético, conforme o método descrito por Oliveira *et al.* (2001) e por Buriti *et al.* (2007), e incubadas em aerobiose a 35-37 °C por 72 horas para as amostras do tratamento C1 e por 48 horas para as amostras dos demais tratamentos.

#### **4.4 Espectroscopia na região do infravermelho próximo**

Foram analisadas no total 64 amostras de soro reconstituído adicionado da cultura *starter* e das bactérias probióticas (C1, C2, C3 e C4) nos tempos iniciais e finais de fermentação (TI e TF, respectivamente) e após um e sete dias de armazenamento (D1 e D7, respectivamente) com emprego do equipamento Perkin-Elmer (modelo 750 Lambda) e cubeta de vidro com caminho ótico de 1 cm, sendo que apenas 63 espectros foram utilizadas para elaboração dos modelos estatísticos, pois uma apresentou resultados anômalos e foi retirada. Os espectros foram coletados na faixa de 930 a 1400 nm.

Os dados espectrais foram tratados no programa The Unscrambler, versão 9.7 (CAMO Software), utilizando a análise por componentes principais (PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS1). Os espectros foram pré-tratados usando correção de linha de base, alisamento Savitzky-Golay primeira derivada, algoritmo de primeira ordem com janela de 11 pontos.

#### **4.5 Determinação de proteínas no soro reconstituído puro e contendo as culturas lácticas e avaliação da atividade proteolítica ao longo dos períodos de amostragem**

##### 4.5.1 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi efetuada nas amostras utilizando alíquotas de 0,2 g de soro em pó reconstituído sem a adição das culturas (SR) e de soro em pó reconstituído adicionado das culturas antes da fermentação (TI), logo após o término da fermentação (TF), no dia seguinte (D1) e 7 dias (D7) após à fermentação através da determinação de nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,38 (AOAC INTERNATIONAL, 2003). A determinação do teor de proteínas foi realizada em triplicata para cada tratamento e os resultados foram utilizados na determinação do grau relativo de proteólise.

#### 4.5.2 Determinação do grau de proteólise

Para fins de avaliação do efeito da fermentação sobre as proteínas do soro, o grau de proteólise foi determinado pela quantificação de grupos  $\text{NH}_3$  livres utilizando o método *o*-fitaldialdeído (OPA), adaptado de Church *et al.* (1983). Em uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  da amostra de soro foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de água destilada e 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 0,75 mol/L. A suspensão obtida foi agitada em vórtex por 1 min, deixada em repouso por 15 min e submetida à centrifugação, em temperatura ambiente, em  $13.000 \times g$  /15 min. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução de peptídeos solúveis em TCA (sobrenadante) foi adicionada de 2 mL do reagente OPA, agitada, e após 2 minutos em temperatura ambiente (25 °C) foi realizada a medida da absorbância em espectrofotômetro Shimadzu UV1200, no comprimento de onda 340 nm, utilizando cubeta de quartzo. Foram analisadas, em triplicata, as amostras de soro reconstituído sem a adição de microrganismos, de soro reconstituído adicionado das culturas *starter* e probióticas (C1, C2, C3 e C4) nos tempos iniciais e finais de fermentação (TI e TF, respectivamente) e após um e sete dias de armazenamento (D1 e D7, respectivamente). A atividade proteolítica dos microrganismos sobre o soro reconstituído (atividade específica de proteólise por miligrama de proteína – U/mg) foi determinada conforme a equação (1) a seguir:

$$U / \text{mg proteína} = \frac{(ABS_a - ABS_r) \times 1000}{P} \quad (1),$$

onde  $ABS_a$  é a absorbância do soro reconstituído adicionado de microrganismo nos diferentes períodos de análise (TI, TF, D1 e D7),  $ABS_r$  é a absorbância da amostra de referência (soro reconstituído sem a adição de microrganismos) e  $P$  é a concentração de proteínas das amostras em mg/g.

#### **4.6 Análise por cromatografia líquida ultrarrápida de alta eficiência em fase reversa (RP-UFLC)**

As amostras de soro reconstituído (SR) e soro adicionado da cultura *starter* e das bactérias probióticas (C1, C2, C3 e C4) nos tempos iniciais e finais de fermentação (TI e TF, respectivamente) e após um e sete dias de armazenamento (D1 e D7, respectivamente), receberam tratamento para

extração dos peptídeos solúveis em água segundo a metodologia adaptada de Donkor *et al.* (2007). Alíquotas de 5 mL das amostras tiveram seu pH ajustado para 4,55 com ácido acético e foram centrifugadas em centrífuga refrigerada Eppendorf (modelo 5810R) a 15.000 × g, em temperatura de 4 °C, por 30 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm.

Os peptídeos solúveis em água foram analisados em cromatógrafo líquido ultrarrápido (UFLC) Shimadzu equipado com coluna C-18 (5 µm, 300 Å, 50 mm × 4,6 mm; Phenomenex), degaseificador modelo DGU2-20<sub>A3</sub> (Shimadzu), duas bombas LC-20AD (Shimadzu), injetor automático SIL-20A<sub>HT</sub> (Shimadzu), forno Shimadzu CTO-20A (Shimadzu) e detector UV/visível modelo SPD-20A (Shimadzu). As amostras foram aplicadas em um volume de injeção de 5 µL e eluídas em gradiente linear de 100 a 0% do solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético – TFA – em água ultrapurificada) no solvente B (0,1% de TFA e 90% de acetonitrila em água ultrapurificada) durante 6 minutos. A separação foi realizada a uma temperatura de 27 °C e uma razão de fluxo de 1.000 mL/min foi empregada. Os peptídeos eluídos foram detectados no comprimento de onda de 214 nm na região de UV/visível.

#### **4.7 Determinação de atividade proteolítica através de eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

A análise eletroforética foi realizada nas amostras de soro fluido *in natura* (SF), soro em pó reconstituído sem a adição de culturas (SR) e soro adicionado da cultura *starter* e da bactéria probiótica *L. casei* BGP93 (tratamento C1) nos tempos iniciais e finais de fermentação (TI e TF, respectivamente) e após um e sete dias de armazenamento (D1 e D7, respectivamente). Utilizou-se o sistema SDS-PAGE-2β-mercaptoetanol, descrito por Laemmli (1970) e Donkor (2007), adaptado para o uso de géis de separação em placas (10,5 × 10 × 0,4 cm) (Hoefer SE250). O gel de aplicação contendo 6% de poliacrilamida foi montado em tampão Tris-HCl 0,6 mol/L, pH 6,8 e o gel de separação, com gradiente de 17,5% de poliacrilamida, foi montado em tampão Tris-HCl 3,77 mol/L, pH 8,9. As amostras submetidas à eletroforese foram suspensas em tampão amostra composto de 5 mL de

glicerol, 2,5 mL de Tris-HCl 0,6 mol/L (pH 6,8), 2,5 mg de azul de bromofenol, 0,3 mL de 2  $\beta$ -mercaptoeptanol, 5 mL de solução de SDS a 10% (m/v), completando o volume para 25 mL com água deionizada. As amostras, foram preparadas de tal forma que apresentassem de 2 a 4 mg de proteína/ml de tampão da amostra, depois foram tratadas a 100 °C por 10 min e centrifugadas em centrífuga Parsec (modelo CT 0603) a 3.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi separado e alíquotas de 10  $\mu$ L foram aplicadas nos poços do gel. A corrida eletroforética foi realizada em tensão constante de 200 V.

Após a eletroforese, o gel foi corado em azul de Coomassie R-250 a 0,1% (m/v), preparado em metanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v), e descorado com metanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v). Logo após, os géis tratados com azul de Coomassie R-250 foram corados também com nitrato de prata e revelados com solução reveladora composta de 6 g de carbonato de sódio, 50  $\mu$ L de formaldeído, 2 mL de tiosulfato de sódio a 20% (v/v).

Para avaliar o peso molecular das unidades proteicas separadas, o gel foi calibrado com marcador proteico contendo 12 proteínas de pesos moleculares 200; 116; 97; 66; 55; 45; 36; 29; 24; 20; 14,2 e 6,5 kDa (SigmaMarker Wide Range 6.500-200.000 Da, Sigma-Aldrich). O gel corado foi fotografado em *scanner* e a imagem obtida foi processada através do programa Image J (National Institute of Health – U.S Department of Health and Human Services). O resultado foi expresso em gráfico com picos em série, sendo cada pico correspondente a uma subunidade proteica separada. O número de gráficos dispostos no espaço cartesiano dos eixos X (distância) e Y (densidade ótica) corresponderam ao número de produtos aplicados no gel (CAVALCANTI, 2007). A área referente aos picos foi usada para obter o conteúdo relativo de cada subunidade proteica na mistura de proteínas revelada no gel.

#### **4.8 Análise estatística dos dados**

A análise estatística dos dados físico-químicos, microbiológicos, de teor proteico e de atividade proteolítica foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 9.0 (Statsoft Inc.), empregando-se análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) para os dados com homogeneidade de variância,

seguida do teste Turkey HSD (*Honestly Significant Difference*) para identificação dos contrastes (BOWER, 1998a). Os testes não paramétricos equivalentes foram aplicados quando variâncias não-homogêneas foram observadas (BOWER, 1998b). A homogeneidade dos dados foi previamente verificada utilizando os testes de Hartley, Cochran e Bartlett.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação das características físico-químicas do soro atomizado reconstituído fermentado

O pH e a acidez são parâmetros importantes na conservação de produtos lácteos fermentados e estão ligados diretamente a sua apresentação visual durante a refrigeração. É necessário um controle de qualidade rigoroso para prevenção da ocorrência de separação de fases, de acidificação elevada influenciada pelo tempo de fermentação e frequentes alterações indesejáveis nas características sensoriais do produto (MARQUES, 2012). Na **Tabela 2**, são apresentados os valores de acidez titulável obtidos no presente estudo para os tratamentos C1, C2, C3 e C4.

**Tabela 2** - Valores de acidez titulável (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7).

Tempo	Acidez titulável (g de ácido láctico/100 g)			
	C1 (BGP93)	C2 (BGP1)	C3 (LPC37)	C4 (LR32)
TI	0,324 $\pm$ 0,034 <sup>Aa</sup>	0,303 $\pm$ 0,029 <sup>Aa</sup>	0,309 $\pm$ 0,037 <sup>Aa</sup>	0,309 $\pm$ 0,052 <sup>Aa</sup>
TF	0,606 $\pm$ 0,042 <sup>Ab</sup>	0,543 $\pm$ 0,058 <sup>Ab</sup>	0,606 $\pm$ 0,086 <sup>Ab</sup>	0,595 $\pm$ 0,053 <sup>Ab</sup>
D1	0,616 $\pm$ 0,053 <sup>Ab</sup>	0,545 $\pm$ 0,024 <sup>Ab</sup>	0,597 $\pm$ 0,060 <sup>Ab</sup>	0,637 $\pm$ 0,059 <sup>Ab</sup>
D7	0,601 $\pm$ 0,028 <sup>Ab</sup>	0,575 $\pm$ 0,027 <sup>Ac</sup>	0,638 $\pm$ 0,078 <sup>Abc</sup>	0,688 $\pm$ 0,069 <sup>Bc</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao longo do tempo para um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

<sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ( $p > 0,05$ ).

Considerando o conjunto dos tratamentos estudados, a acidez antes da fermentação manteve-se entre 0,303 e 0,324 g de ácido láctico/100 g, enquanto que no sétimo dia de armazenamento esteve entre 0,575 e 0,688 g de ácido láctico/100 g. Houve um aumento significativo da acidez ao longo da fermentação em todos os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os valores da acidez titulável

mantiveram-se estáveis entre o final da fermentação (TF) e o primeiro dia de armazenamento (D1), em todos os tratamentos, sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Com exceção do tratamento C1, adicionado de *L. casei* BGP93, houve aumento significativo da acidez ( $p < 0,05$ ), entre o primeiro e o sétimo dia de armazenamento. Ainda considerando o sétimo dia de armazenamento, o tratamento C4 (adicionado de *L. rhamnosus* LR32) apresentou acidez significativamente mais alta quando comparada com C1, C2 e C3 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto à acidez ( $p > 0,05$ ) nos períodos de amostragem anteriores (TI, TF e D1).

O aumento da acidez entre o início e o fim da fermentação, bem como entre o primeiro e o sétimo dia de armazenamento, ocorreu devido ao metabolismo da cultura *starter* de *S. thermophilus* TA40, ao utilizar a lactose do soro para a produção de ácido láctico, que não seria tão significativa com a ausência desta cultura. A presença de culturas *starters* é requisito fundamental para produção rápida de ácido no leite durante a fermentação. Estes microrganismos também possuem um número de proteinases e peptidases que atuam de forma controlada para hidrolisar as proteínas do leite para obter os aminoácidos livres necessários para o desenvolvimento da célula (DONKOR, 2007).

Com relação ao pH, apresentado na **Tabela 3**, observou-se que para o conjunto dos tratamentos estudados, o maior valor de pH antes da fermentação foi de 5,77. Os valores de pH não diferiram significativamente entre os tratamentos em nenhum tempo de amostragem ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve um decréscimo significativo do pH entre o início (TI) e o fim da fermentação (TF) ( $p < 0,05$ ) e o início (TI) e sete dias de armazenamento (D7) paralelamente ao aumento significativo da acidez ( $p < 0,05$ ), atribuído à adição da cultura *starter* (*S. thermophilus*), conforme explicado previamente.

**Tabela 3** - Valores de pH (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7).

Tempo	pH			
	C1 (BGP93)	C2 (BGP1)	C3 (LPC37)	C4 (LR32)
TI	5,66 $\pm$ 0,05 <sup>Ac</sup>	5,66 $\pm$ 0,10 <sup>Ac</sup>	5,77 $\pm$ 0,07 <sup>Ab</sup>	5,71 $\pm$ 0,12 <sup>Ac</sup>
TF	4,93 $\pm$ 0,06 <sup>Aab</sup>	4,99 $\pm$ 0,06 <sup>Aa</sup>	4,93 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	4,88 $\pm$ 0,12 <sup>Aab</sup>
D1	5,10 $\pm$ 0,12 <sup>Ab</sup>	5,06 $\pm$ 0,08 <sup>Ab</sup>	4,95 $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	5,00 $\pm$ 0,11 <sup>Ab</sup>
D7	4,95 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	5,04 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	4,86 $\pm$ 0,19 <sup>Aa</sup>	4,83 $\pm$ 0,19 <sup>Aa</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao longo do tempo para um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

<sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ( $p > 0,05$ ).

Considerando o sétimo dia de armazenamento, o valor de pH mais alto (5,04) foi obtido para o tratamento C2 (*L. paracasei* BGP1) e o mais baixo (4,83) para o tratamento C4 (*L. rhamnosus* LR32), corroborando com os dados obtidos para acidez titulável, que manteve-se menor em C2 (0,575 g de ácido láctico/100 g) e maior em C4 (0,688 g de ácido láctico/100 g) aos 7 dias. Sendo assim, considerando os valores de acidez titulável e pH obtidos ao sétimo dia de armazenamento, a cultura probiótica de *L. rhamnosus* LR32 foi a que mais colaborou para a atividade acidificante em co-cultura com *S. thermophilus*.

Buriti *et al.* (2014), ao avaliarem o pH de bases fermentadas produzidas com leite e soro de queijo de cabra para uso na fabricação de bebidas lácteas, obtiveram valores de pH ao final da fermentação em torno de 5,03, ou seja, próximo aos valores obtidos nos períodos de amostragem TF, D1 e D7 no presente estudo, especialmente no tratamento C2. Já com relação à acidez titulável em ácido láctico, os autores obtiveram 0,402 g/100 g na base láctea ao final da fermentação, valor abaixo do obtido no presente estudo no período de amostragem TF. No entanto, naquele trabalho, a adição de polpa de frutas aumentou os valores de acidez das bebidas no primeiro e sétimo dia de armazenamento, que ficaram entre 0,600 g/100 g e 0,700 g/100 g, valores

também encontrados no sétimo dia de armazenamento no presente trabalho mesmo sem o uso de ingredientes adicionais.

Salva *et al.* (2011), ao produzirem um leite de cabra fermentado com e sem o probiótico *L. rhamnosus* CRL1505 em diferentes proporções com *S. thermophilus* CRL806 e CRL728, observaram um decréscimo no pH durante a fermentação a 42° C. No entanto, apenas os leites de cabra fermentados com *L. rhamnosus* CRL1505 como cultura adjunta atingiram pH próximo de 4,8 em 4h de fermentação. Ainda, somente no leite fermentado contendo as cepas CRL806: CRL728: CRL1505 na proporção de 0,9: 0,1: 0,25, respectivamente, os valores de pH e acidez Dornic foram estabilizados durante o período de armazenamento de 20 dias; nos demais leites fermentados foi observada sinérese, isto é, o desprendimento do soro, que nestes produtos ocorre devido ao fenômeno de pós-acidificação.

Neste estudo, as combinações de microrganismos utilizadas para a fermentação em todos os tratamentos se mostraram eficientes na produção de ácido láctico e consequente diminuição do pH ao longo da fermentação, sendo o tratamento C4 aquele que apresentou maior acidez e, conseqüentemente, menor pH no sétimo dia de armazenamento. No entanto, este aumento da acidez ao longo do armazenamento (pós-acidificação) pode ser indesejável, pois pode ocorrer a sinérese tornando o produto pouco atrativo.

## **5.2 Avaliação da viabilidade dos microrganismos “starter” e probióticos no soro atomizado reconstituído fermentado**

Na **Tabela 4** são apresentadas as populações de *S. thermophilus* para os tratamentos C1, C2, C3 e C4. Observa-se que a viabilidade de *S. thermophilus* apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) entre TI e TF para todos os tratamentos estudados e manteve-se semelhante, em valores absolutos, no término da fermentação e após um e sete dias de armazenamento. Apenas em C1 e C2, a viabilidade de *S. thermophilus* diferiu significativamente entre o término da fermentação e o sétimo dia de armazenamento ( $p < 0,05$ ), observando-se uma redução das populações desse microrganismo em ambos os tratamentos. Por outro lado, as populações de *S.*

*thermophilus* em C3 e C4 mantiveram-se estáveis, sem diferenças significativas entre o término da fermentação e após 1 e 7 dias de armazenamento ( $p > 0,05$ ). Houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto à viabilidade de *S. thermophilus* nos períodos de amostragem avaliados ( $p < 0,05$ ). Com exceção do primeiro dia de armazenamento, a menor viabilidade das populações de *S. thermophilus* foi verificada para C2 produzido em co-cultura com *L. paracasei* BGP1, iniciando em 5,877 log UFC/mL e alcançando 8,694 e 8,476 log UFC/mL ao final da fermentação e após 7 dias de armazenamento, respectivamente. Em todos os períodos de amostragem, a maior viabilidade de *S. thermophilus* observada foi para o tratamento C4, fermentado em co-cultura com *L. rhamnosus* LR32, iniciando em 6,483 log UFC/mL no começo da fermentação e alcançando 8,954 log UFC/ml após 7 dias de armazenamento.

**Tabela 4** - Populações de *S. thermophilus* (média  $\pm$  desvio padrão) obtidas para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7).

Tempo	<i>S. thermophilus</i> (log UFC/mL)			
	C1 (BGP93)	C2 (BGP1)	C3 (LPC37)	C4 (LR32)
TI	6,468 $\pm$ 0,240 <sup>Ca</sup>	5,877 $\pm$ 0,163 <sup>Aa</sup>	6,249 $\pm$ 0,111 <sup>Ba</sup>	6,483 $\pm$ 0,282 <sup>Ca</sup>
TF	8,786 $\pm$ 0,246 <sup>ABc</sup>	8,694 $\pm$ 0,127 <sup>Ac</sup>	8,864 $\pm$ 0,128 <sup>Bb</sup>	8,939 $\pm$ 0,219 <sup>Bb</sup>
D1	8,722 $\pm$ 0,259 <sup>ABc</sup>	8,752 $\pm$ 0,263 <sup>Ac</sup>	8,887 $\pm$ 0,116 <sup>Bb</sup>	8,930 $\pm$ 0,192 <sup>Bb</sup>
D7	8,616 $\pm$ 0,159 <sup>Bb</sup>	8,476 $\pm$ 0,223 <sup>Ab</sup>	8,852 $\pm$ 0,257 <sup>Cb</sup>	8,954 $\pm$ 0,144 <sup>Cb</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao longo do tempo para um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

<sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ( $p > 0,05$ ).

Observa-se que os valores de *S. thermophilus* mantiveram-se, após a fermentação até os sete dias de armazenamento, em cerca de 8 log UFC/mL, demonstrando que atendem o valor exigido pela legislação brasileira em

bebidas lácteas fermentadas de no mínimo 6 log UFC/g de bactérias lácticas viáveis (BRASIL, 2005).

Buriti *et al.* (2014) observaram que a viabilidade de *S. thermophilus* (TA 40) em bebidas fermentadas produzidas com leite e soro de queijo de cabra foi de 9,1 log UFC/mL no primeiro dia de armazenagem, sem diferença significativa entre os valores observados nos dias 7 e 14, apesar dos autores já verificarem alguns valores na faixa de 8,7 log UFC/ mL nesse período. Neste trabalho, no primeiro dia de armazenamento dos produtos, a viabilidade de *S. thermophilus* foi próxima de 9,0 log UFC/mL, especialmente em C3 e C4, permanecendo estável, em ambos os tratamentos, até o sétimo dia. Neste estudo, para os demais tratamentos, a viabilidade de *S. thermophilus* ainda permaneceu superior a 8,4 log UFC/ mL até o sétimo dia. Sendo assim, a viabilidade de *S. thermophilus* obtida neste estudo durante o armazenamento refrigerado foi considerada elevada para os quatro tratamentos avaliados.

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 5**, observa-se que as populações de *Lactobacillus* sp. diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os quatro tratamentos antes da fermentação (TI) e aumentaram significativamente entre TI e TF ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos. A bactéria potencialmente probiótica com menor viabilidade antes da fermentação foi *L. rhamnosus* LR32 em C4, enquanto que a de maior viabilidade foi *L. paracasei* BGP1 em C2. Após a fermentação, os tratamentos C2 e C3 foram os que apresentaram, respectivamente, a maior e a menor viabilidade de *Lactobacillus* sp. Entre TI e TF, considerando as populações de *Lactobacillus* sp. de todos os tratamentos, o microrganismo *L. casei* BGP93 foi o que apresentou menor aumento, enquanto que o maior aumento ocorreu com *L. rhamnosus* LR32. Com exceção de C2, a população de *Lactobacillus* sp. permaneceu estável, ao redor de 7,20-7,30 log UFC/mL, nos diferentes tratamentos entre o primeiro e o sétimo dia de armazenamento ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, no tratamento C2 houve uma redução significativa da população de *L. paracasei* ao longo do armazenamento, de 8,004 log UFC/mL para 7,678 log UFC/mL nos referidos tempos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5** - Populações de *Lactobacillus* sp. (média  $\pm$  desvio padrão) obtidas para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após a fermentação (D7).

Tempo	<i>Lactobacillus</i> sp. (log UFC/mL)			
	C1 (BGP93)	C2 (BGP1)	C3 (LPC37)	C4 (LR32)
TI	7,152 $\pm$ 0,071 <sup>Ca</sup>	7,438 $\pm$ 0,119 <sup>Da</sup>	6,751 $\pm$ 0,319 <sup>Ba</sup>	6,572 $\pm$ 0,166 <sup>Aa</sup>
TF	7,330 $\pm$ 0,145 <sup>Bc</sup>	7,825 $\pm$ 0,174 <sup>Cb</sup>	7,176 $\pm$ 0,082 <sup>Ab</sup>	7,390 $\pm$ 0,160 <sup>Bc</sup>
D1	7,218 $\pm$ 0,158 <sup>Aab</sup>	8,004 $\pm$ 0,180 <sup>Bc</sup>	7,196 $\pm$ 0,170 <sup>Ab</sup>	7,294 $\pm$ 0,185 <sup>Abc</sup>
D7	7,360 $\pm$ 0,218 <sup>Abc</sup>	7,678 $\pm$ 0,297 <sup>Bb</sup>	7,210 $\pm$ 0,236 <sup>Ab</sup>	7,257 $\pm$ 0,177 <sup>Ab</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao longo do tempo para um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

<sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ( $p > 0,05$ ).

Neste trabalho, ao longo do período estudado, a viabilidade de *L. casei* (BGP93), *L. paracasei* (LPC37 e BGP1) e *L. rhamnosus* (LR32) em C1, C2, C3 e C4, respectivamente, obedeceu aos critérios nacionais para alimentos probióticos, mantendo-se superior a 7 log UFC/mL, ou seja, acima de 9 log UFC na porção recomendada para bebidas lácteas e produtos similares, igual a 200 mL (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), sendo que o valor mínimo estabelecido encontra-se entre 8 e 9 log UFC do microrganismo probiótico na porção de produto pronto para o consumo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Buriti *et al.* (2014) observaram que a viabilidade de *L. rhamnosus* LR32 também foi consideravelmente estável em bebidas lácteas caprinas fermentadas, permanecendo em cerca de 8 log UFC/mL durante 21 dias. Da mesma forma, no estudo realizado por Sah *et al.* (2014), ao avaliarem a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 393 e *L. paracasei* ATCC BAA52 quando usados separadamente como única fonte de probiótico em iogurtes, verificaram que estes microrganismos apresentaram boa viabilidade, 7,58 log UFC/g, 8,22 log UFC/g e 7,38 log UFC/g,

respectivamente, estando dentro dos critérios exigidos para alimentos probióticos.

Silva, Brugnera e Abreu (2013) relataram que a viabilidade do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em iogurtes de leite de cabra sem e com extrato aquoso de soja foi de  $1,6 \times 10^8$  (8,2 log) UFC/mL e  $1,1 \times 10^8$  (8,04 log) UFC/mL, respectivamente, no primeiro dia de armazenamento, e de  $3,1 \times 10^7$  (7,49 log) UFC/mL e  $2,7 \times 10^7$  (7,43 log) UFC/mL, respectivamente, aos 29 dias de armazenamento.

Tabasco *et al.* (2007) obtiveram uma viabilidade de 9,32 log UFC/mL e 6,49 log UFC/mL para *S. thermophilus* e *L. paracasei*, respectivamente, na primeira semana de armazenamento do leite fermentado com a combinação de *S. thermophilus* STY-31 e *L. paracasei* subsp. *paracasei* LC-01. No presente estudo, apesar de uma viabilidade um pouco mais baixa para *S. thermophilus* ao longo da primeira semana de armazenamento a 4 °C, os valores obtidos para *L. paracasei* foram bem mais altos para as duas cepas estudadas, BGP1 e LPC37, mantendo-se em 7,678 log UFC/mL e 7,210 log UFC/mL, respectivamente, em C2 e C3 após 7 dias.

Kullisaar *et al.* (2003) relataram um aumento na contagem de lactococos e *Lactobacillus plantarum*, de  $10^9$  para  $10^{10}$  UFC/mL e de  $3 \times 10^4$  para  $10^6$  UFC/mL, respectivamente, após a fermentação do leite de cabra, corroborando com o que foi observado no presente estudo, no qual houve aumento em todos os tratamentos entre os tempos antes da fermentação (TI) e logo após a fermentação (TF).

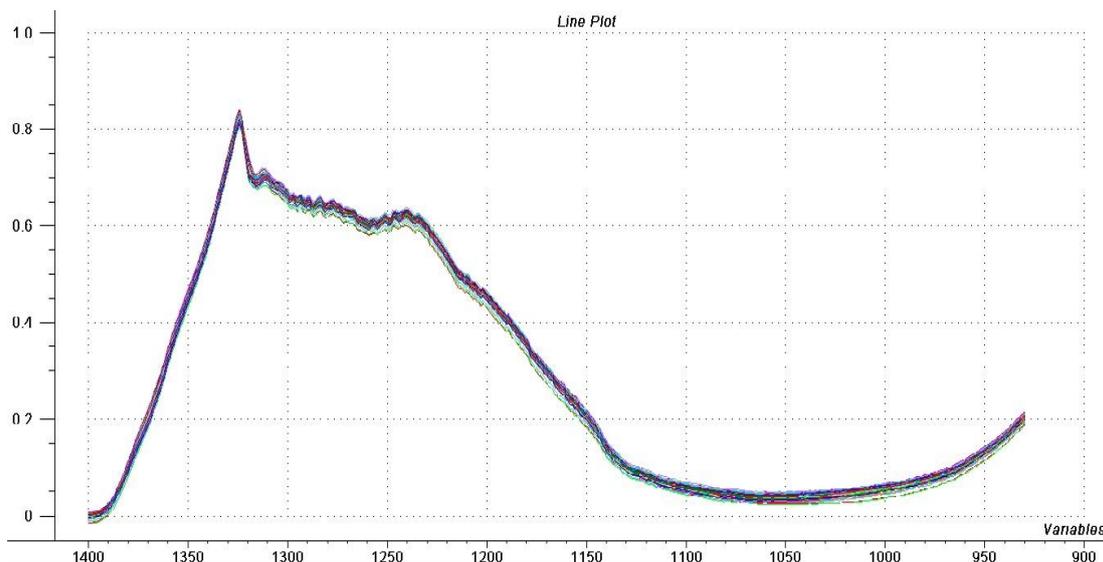
Confrontando o comportamento das cepas de *L. paracasei* estudadas, verificou-se que no tratamento C3 (LPC37) a população desse microrganismo foi mais estável entre o fim da fermentação e o primeiro e sétimo dia de armazenamento, em comparação com o C2 (BGP1) que não demonstrou a mesma estabilidade nestes períodos. Em C2, apesar da viabilidade alta de *Lactobacillus* sp. após a fermentação e aumento no primeiro dia de armazenamento, houve um decréscimo significativo da população desse microrganismo aos 7 dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ), o qual foi observado apenas neste tratamento.

Ng, Yeung e Tong (2011) explicam que a manutenção de um elevado nível de células probióticas viáveis durante o armazenamento de produtos lácteos não é uma tarefa simples. Muitos fatores influenciam a viabilidade dos probióticos, como por exemplo, acúmulo de ácido e a interação com as culturas de arranque (*starter*).

### 5.3 Espectroscopia NIR

A análise por espectroscopia NIR foi realizada no soro reconstituído adicionado da cultura *starter* e das bactérias probióticas (tratamentos C1, C2, C3 e C4) nos tempos iniciais e finais de fermentação (TI e TF, respectivamente) e após um e sete dias de armazenamento (D1 e D7, respectivamente), obtendo o total de 63 espectros representados na **Figura 1**.

**Figura 1** - Espectros NIR das amostras de soro em pó reconstituído adicionado da cultura *starter* de *S. thermophilus* TA40 e das culturas potencialmente probióticas *L. casei* BGP93 (C1), *L. paracasei* BGP1 (C2), *L. paracasei* LPC37 (C3) e *L. rhamnosus* LR32 (C4) antes da fermentação (TI), depois da fermentação (TF), e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7).



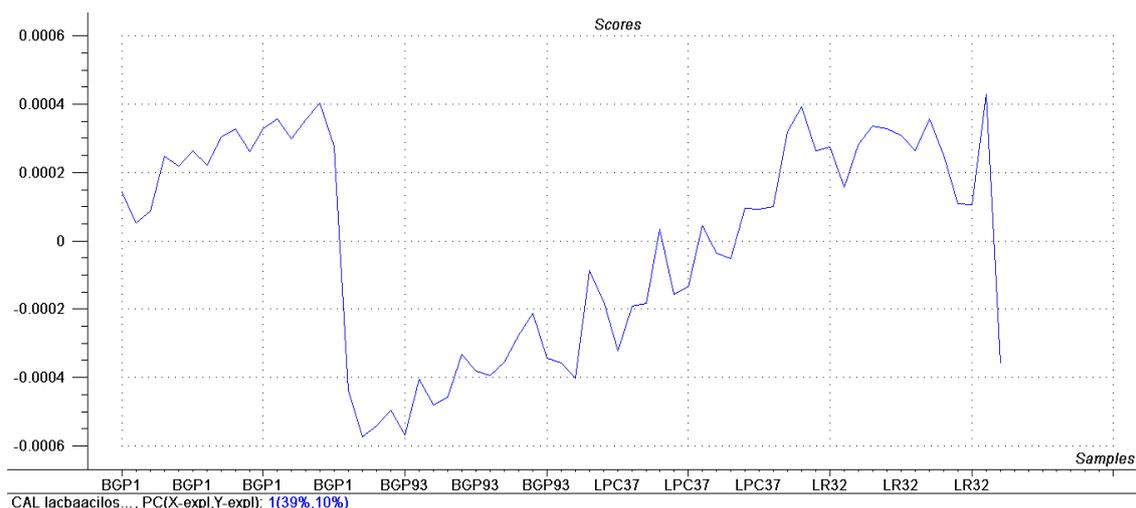
### 5.3.1 Modelo de calibração

O modelo de calibração foi construído com a totalidade dos espectros (63 espectros) obtidos e tratados conforme item 4.4, para a determinação de *Lactobacillus* sp.

O modelo foi construído utilizando PC1 e apresentou erro sistemático (*bias*) baixo, erro quadrático médio de validação cruzada (RMSEC) relativamente baixo e  $R^2$  adequado ( $-1.14 \times 10^{-7}$ , 0,14 e 0,86, respectivamente).

A variância explicada em PC1 apresentou-se de 39% e 10% nos eixos x e y, respectivamente, demonstrando ser relativamente satisfatório para este parâmetro, conforme **Figura 2**.

**Figura 2** - Gráfico de escores da regressão dos espectros do soro em pó reconstituído adicionado da cultura *starter* de *S. thermophilus* TA40 e das culturas potencialmente probióticas *L. casei* BGP93 (C1), *L. paracasei* BGP1 (C2), *L. paracasei* LPC37 (C3) e *L. rhamnosus* LR32 (C4) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF), e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7), utilizando como parâmetro *Lactobacillus* sp. no componente principal 1 (PC1).



O modelo de calibração construído para *Lactobacillus* sp. foi adequado, com  $R^2$  satisfatório o que indica a possível quantificação deste parâmetro através da construção de modelos de predição a ser realizada em trabalhos futuros. Nestes casos a espectroscopia NIR poderia auxiliar na fiscalização de

produtos probióticos no sentido de verificar se estão de acordo com a viabilidade mínima de microorganismos exigida nestes produtos.

Ressalta-se, no entanto, a ocorrência de dificuldades na construção de modelos de predição em amostras biológicas por diversos fatores entre os quais se encontram: (1) faixa estreita de valores entre as amostras, no caso específico deste trabalho, as amostras permaneceram na faixa de 6,931-8,142 log UFC/mL para *Lactobacillus* sp.; (2) variabilidade entre as amostras, pois foram estudadas quatro diferentes culturas adjuvantes potencialmente probióticas em quatro diferentes períodos de amostragem; (3) própria natureza do material estudado, soro reconstituído fermentado, que é um material biológico e, portanto, diversos fatores como as características genéticas dos microrganismos e as possíveis diferenças entre a atividade metabólica destas culturas poderiam interferir nos resultados.

Como alternativa para a obtenção de modelos com melhores performances, sugere-se trabalhar com um único tratamento em cada modelo utilizando um número maior de amostras.

Dentre os trabalhos bibliográficos sobre leite e produtos lácteos pesquisados, foram encontrados dois em que foram construídos modelos de classificação através da espectroscopia NIR e, em ambos, pode-se verificar a utilização de grande quantidade de amostras. O primeiro foi realizado por González-Martín *et al.* (2007) no qual os autores obtiveram em 224 queijos produzidos com 16 diferentes proporções de leites de vaca, ovelha e cabra, um modelo satisfatório, com minimização de erros. No referido estudo, foram realizados 32 espectros em triplicata, podendo, desta forma, classificar os queijos e acordo com a proporção do tipo de leite utilizado na fabricação. O segundo estudo foi desenvolvido por Aliakbarian *et al.* (2015) no qual, utilizaram a espectroscopia NIR para classificar e avaliar a estabilidade de leite fermentado com *Streptococcus thermophilus* TA40 e *Lactobacillus acidophilus* LAC4 adicionado de compostos fenólicos dos extratos de bagaço de azeitona e de uva. Os autores utilizaram 480 espectros (12 amostras × 5 replicatas × 8 tempos de armazenamento) dos quais conseguiram classificar as amostras de acordo com o tipo de extrato adicionado.

Com relação à quantificação de microorganismos através de modelos de predição, Cámara-Martos *et al.* (2015) detectaram, através de espectroscopia NIR, um microorganismo representativo dos indicadores de higiene, *Escherichia coli* ATCC25922, e um microorganismo representativo dos indicadores de deterioração, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, adicionados ao leite integral. Para isto, eles realizaram em média 64 varreduras para cada amostra, demonstrando a necessidade de uma quantidade considerável de replicatas para utilização da metodologia NIR em microorganismos, assim como o sugerido por este trabalho. No entanto, os modelos de predição construídos, através da regressão PLS, por estes autores apresentaram para os microorganismos cultivados em leite valores de erro sistemático (-0,058, -0,083, -0,051) e RMSEP (0,284, 0,713, 0,584) relativamente altos.

#### **5.4 Determinação do teor proteico e avaliação da atividade proteolítica dos microrganismos “starter” e probióticos no soro atomizado reconstituído fermentado**

Verifica-se a partir dos dados apresentados na **Tabela 6** que o teor proteico das amostras foi próximo de 25 mg/g e que não houve diferenças significativas em nenhum período de amostragem entre nenhum dos tratamentos, nem entre os períodos de amostragem dentro de cada tratamento ( $p > 0,05$ ), comprovando a uniformidade das amostras utilizadas, mesmo entre as amostras com ou sem microrganismos. Esta uniformidade entre o teor proteico das amostras é necessária para avaliar adequadamente os efeitos das culturas utilizadas sobre a proteólise das amostras.

**Tabela 6** - Teores de proteína (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos para os tratamentos C1, C2, C3 e C4, no soro reconstituído sem microrganismo (SR) e adicionado de microrganismo, antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7).

Períodos de amostragem	Teores de Proteína (mg/g)			
	C1 (BGP93)	C2 (BGP1)	C3 (LPC37)	C4 (LR32)
SR	24,764 $\pm$ 1,114 <sup>Aa</sup>	25,169 $\pm$ 2,209 <sup>Aa</sup>	24,793 $\pm$ 1,540 <sup>Aa</sup>	24,921 $\pm$ 2,101 <sup>Aa</sup>
TI	29,064 $\pm$ 3,165 <sup>Aa</sup>	26,329 $\pm$ 1,874 <sup>Aa</sup>	25,291 $\pm$ 2,732 <sup>Aa</sup>	26,993 $\pm$ 4,372 <sup>Aa</sup>
TF	27,022 $\pm$ 3,306 <sup>Aa</sup>	25,702 $\pm$ 0,749 <sup>Aa</sup>	24,825 $\pm$ 2,741 <sup>Aa</sup>	27,707 $\pm$ 3,653 <sup>Aa</sup>
D1	27,995 $\pm$ 4,280 <sup>Aa</sup>	25,699 $\pm$ 2,966 <sup>Aa</sup>	24,272 $\pm$ 3,750 <sup>Aa</sup>	26,748 $\pm$ 4,765 <sup>Aa</sup>
D7	25,921 $\pm$ 3,680 <sup>Aa</sup>	25,086 $\pm$ 2,215 <sup>Aa</sup>	24,256 $\pm$ 2,676 <sup>Aa</sup>	24,583 $\pm$ 5,602 <sup>Aa</sup>

<sup>a</sup>Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao longo do tempo para um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

<sup>A</sup>Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ( $p > 0,05$ ).

Na **Tabela 7** são apresentadas as médias dos valores de proteólise, não havendo diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos em nenhum dos períodos de amostragem ( $p > 0,05$ ). No entanto, observa-se que em todos os tratamentos a atividade proteolítica específica aumentou significativamente depois da adição das culturas lácticas e fermentação do soro ( $p < 0,05$ ), permanecendo ainda significativamente diferentes os valores de proteólise observados após 7 dias de armazenamento quando comparados aos das amostras antes da fermentação ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas entre a atividade proteolítica específica observada após a fermentação e no primeiro e sétimo dia de armazenamento em todos os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 7** - Valores de proteólise (média  $\pm$  desvio padrão) obtidas para os tratamentos C1, C2, C3 e C4 antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF), no dia seguinte à fermentação (D1) e sete dias após à fermentação (D7).

Tempo	Atividade proteolítica específica (U/mg de proteína)			
	C1 (BGP93)	C2 (BGP1)	C3 (LPC37)	C4 (LR32)
TI	0,271 $\pm$ 0,852 <sup>Aa</sup>	0,535 $\pm$ 1,395 <sup>Aa</sup>	-0,024 $\pm$ 0,746 <sup>Aa</sup>	-1,225 $\pm$ 3,053 <sup>Aa</sup>
TF	6,661 $\pm$ 1,951 <sup>Ab</sup>	5,667 $\pm$ 2,603 <sup>Ab</sup>	5,932 $\pm$ 1,482 <sup>Ab</sup>	6,937 $\pm$ 1,422 <sup>Ab</sup>
D1	7,145 $\pm$ 0,656 <sup>Ab</sup>	5,026 $\pm$ 1,552 <sup>Aab</sup>	5,309 $\pm$ 0,479 <sup>Ab</sup>	5,309 $\pm$ 1,076 <sup>Ab</sup>
D7	7,757 $\pm$ 2,259 <sup>Ab</sup>	5,364 $\pm$ 3,608 <sup>Ab</sup>	7,204 $\pm$ 1,91 <sup>Ab</sup>	6,243 $\pm$ 2,052 <sup>Ab</sup>

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao longo do tempo para um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

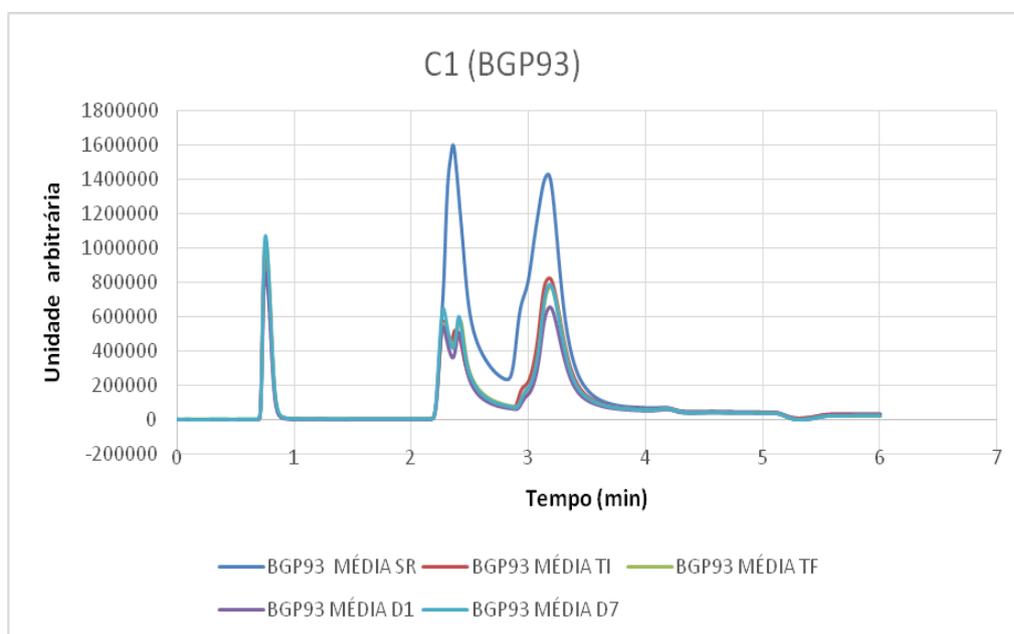
<sup>A</sup> Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ( $p > 0,05$ ).

Em trabalho realizado por Donkor *et al.* (2007), ao investigarem a atividade proteolítica de microrganismos *starters* e dos probióticos *Bifidobacterium lactis* LAFTI® B94, *L. acidophilus* LAFTI® L10 e *L. casei* LAFTI® L26 na produção de iogurte, verificou-se um aumento significativo na liberação de grupamentos NH<sub>3</sub> através do método OPA no primeiro dia e uma elevação razoável durante 30 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C. Naquele estudo, ainda, os valores de proteólise no iogurte probiótico foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que o iogurte controle (sem probióticos) no final da fermentação. Sah *et al.* (2014) quantificou graus de proteólise de 5,38% a 11,91% pelo método OPA, respectivamente, para as formulações de iogurtes controle (sem probióticos) e probiótico (com os microrganismos *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. paracasei*).

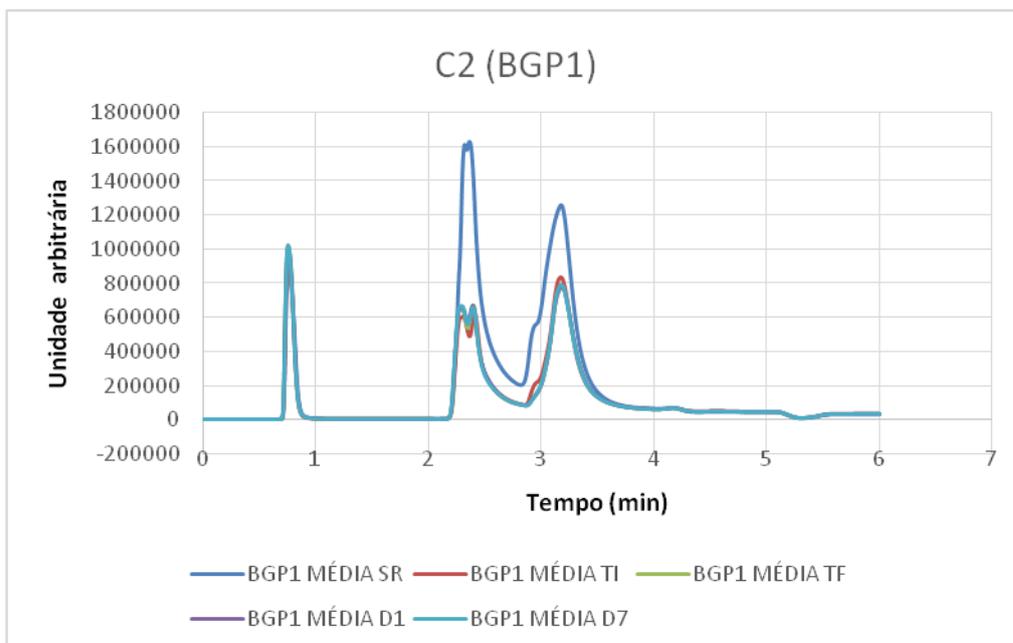
### 5.5 Análise por cromatografia líquida ultrarrápida de alta eficiência em fase reversa (RP-UFLC)

Os resultados de RP-UFLC para as amostras preparadas conforme descrição do item 4.6, estão apresentados nas **Figuras 3 a 6**. Os cromatogramas analisados dos lotes de soro em pó reconstituído e fermentado com bactérias lácticas apresentaram perfis similares, com poucas modificações entre o início e o final da fermentação e após 1 e 7 dias de armazenamento. No entanto, em todos os tratamentos foram observados picos de maior intensidade para o soro reconstituído sem a adição de microrganismos.

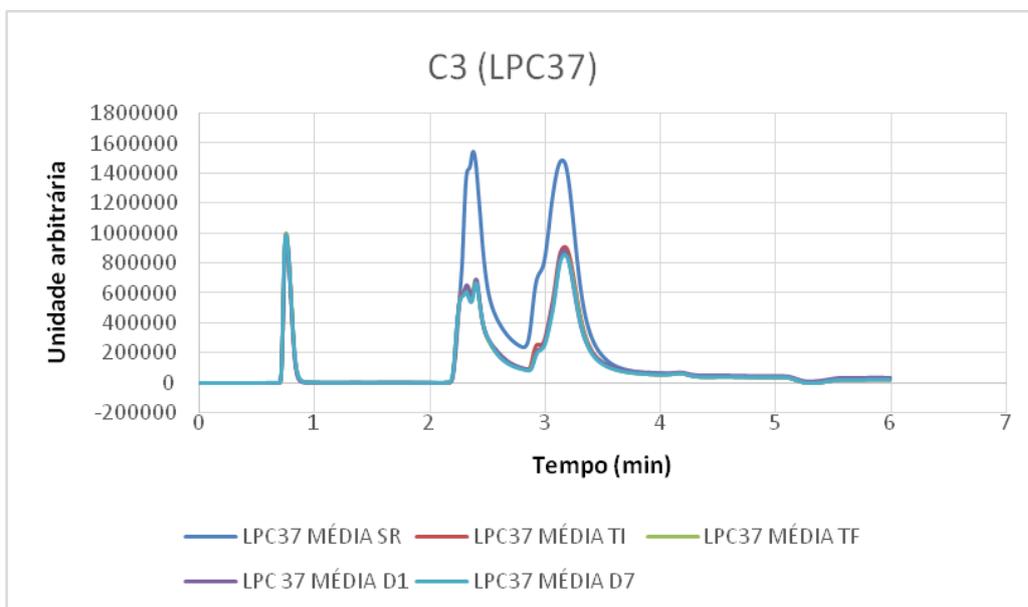
**Figura 3** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7).



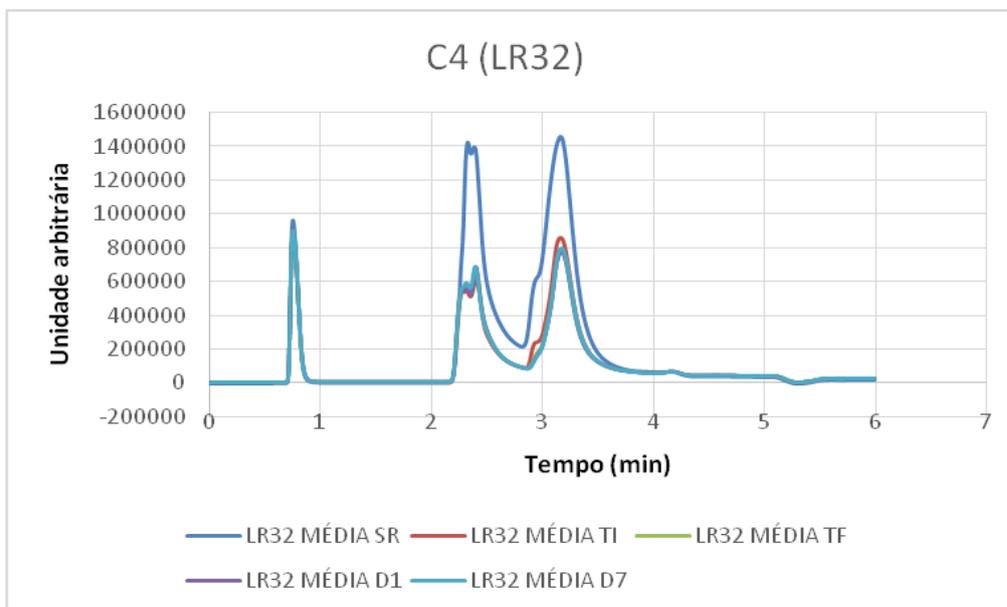
**Figura 4** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 (tratamento C2) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7).



**Figura 5** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* LPC37 (tratamento C3) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7).



**Figura 6** - Cromatograma da fração solúvel em água do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. rhamnosus* LR32 (tratamento C4) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7).



Nestes cromatogramas, destacaram-se três picos, sendo o segundo pico com uma divisão em mais dois picos pouco acentuada para as amostras de soro reconstituído (SR), com exceção do tratamento C1 que não apresentou essa divisão, que se apresenta mais aparente nas amostras de soros adicionados das culturas antes da fermentação (TI), logo após a fermentação (TF) e após 1 e 7 dias de armazenamento (D1 e D7). Estes picos estão relacionados com a presença de proteínas e/ou peptídeos na fração solúvel em água do produto. Observa-se na **Figura 3** um aumento da separação do segundo pico em dois, o que poderia estar relacionado à maior atividade de hidrólise de *L. casei* BGP93 sobre as proteínas do soro nas amostras do tratamento C1, quando comparado às amostras dos demais tratamentos, em que a separação do segundo pico foi menor.

Observa-se nos cromatogramas de todos os tratamentos, picos mais baixos nas amostras TI, TF, D1 e D7 em comparação com o soro reconstituído (SR), o que pode ser explicado pelo tratamento térmico prévio daquelas amostras a 85 °C por um período de 30 minutos e posterior resfriamento a 45 °C para adição das culturas lácticas, o que ocasionaria alteração nas proteínas do soro lácteo caprino. Tal fenômeno também foi descrito por Pintado, Silva e

Malcata (1996) ao avaliarem o efeito do tratamento térmico a 85 °C e 95 °C por períodos de 30 e 90 minutos sobre o perfil proteico em soro de leite ovino e caprino, observando que a temperatura resultou em alteração significativa nas proteínas para os dois tipos de soro de leite em todos os meses de lactação estudados. Os autores indicaram, ainda, uma mudança na estrutura das proteínas com tratamento térmico quando comparadas às sem tratamento térmico, a permanência das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg ainda solúveis sob aquecimento por 60 minutos a 85 °C, mas não a 95 °C, e que o leite ovino é mais sensível ao calor que o caprino, podendo este apresentar número maior de proteínas solúveis.

Considerando os resultados da análise de proteólise pelo método OPA do presente estudo, verificou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos; no entanto houve uma tendência de maior proteólise em C1 no primeiro e sétimo dia de armazenamento, conforme os dados apresentados na **Tabela 7**. Desta forma, tanto os resultados obtidos pelo método OPA quanto por RP-UFLC, mostram uma tendência de maior atividade proteolítica para as amostras contendo *L. casei* BGP93.

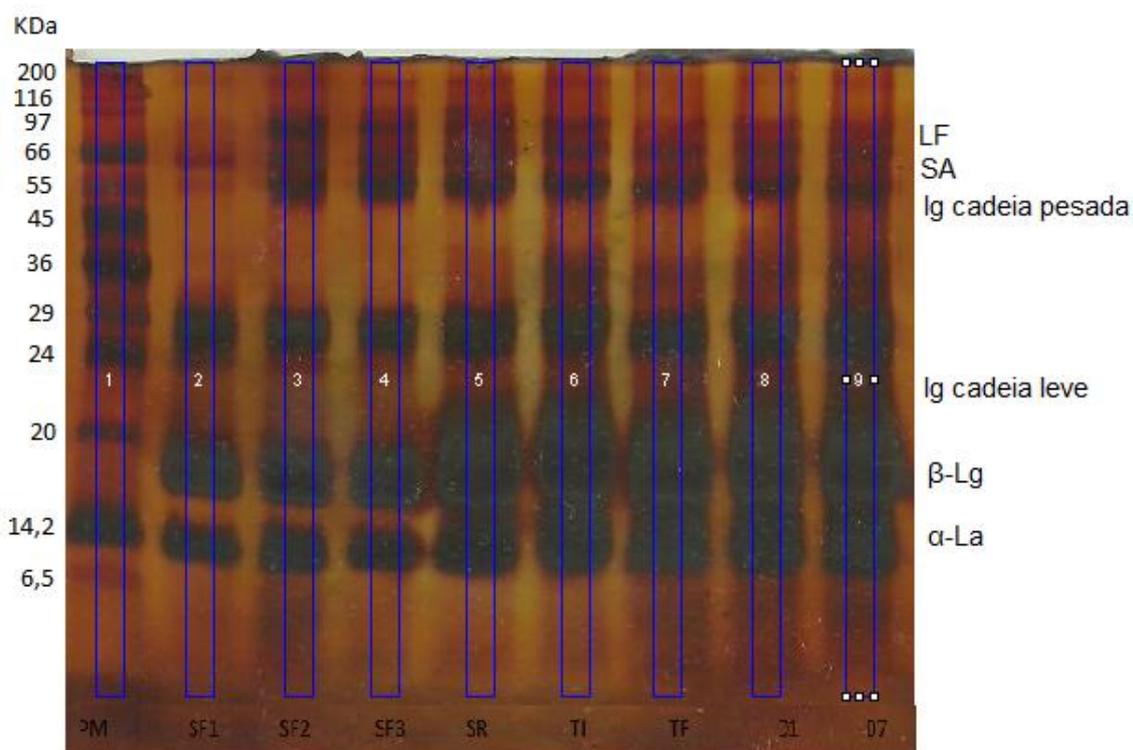
Torre *et al.* (1996) desenvolveram um método para separação das principais proteínas do soro, incluindo  $\alpha$ -La, SA e  $\beta$ -Lg A e B por RP-UFLC. No estudo de Dumitraşcu *et al.* (2013), essa técnica analítica foi utilizada na determinação da concentração das proteínas do soro ( $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La) após tratamento térmico em leite de três diferentes espécies, incluindo cabra. Outras pesquisas aplicaram RP-HPLC na avaliação da proteólise exercida por enzimas naturais ou por probióticos em soro caprino (SANTILLO *et al.*, 2009; MADUREIRA *et al.*, 2010).

### **5.6 Determinação de atividade proteolítica através de eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

As amostras do soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho e demais períodos de amostragem para o tratamento C1 foram analisadas por SDS-PAGE para comprovar a possível atividade proteolítica do microorganismo *L. casei* BGP93, utilizado na produção deste tratamento,

conforme a tendência observada nas análises anteriores de RP-UFLC e de proteólise pelo método OPA. O perfil eletroforético, no sistema SDS-PAGE apresentou bandas reveladas conforme observado na **Figura 7**.

**Figura 7** - Análise eletroforética em sistema SDS-PAGE, gel 17,5%, das proteínas presentes no soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7), juntamente com o padrão de peso molecular Sigma - S8445 (PM).

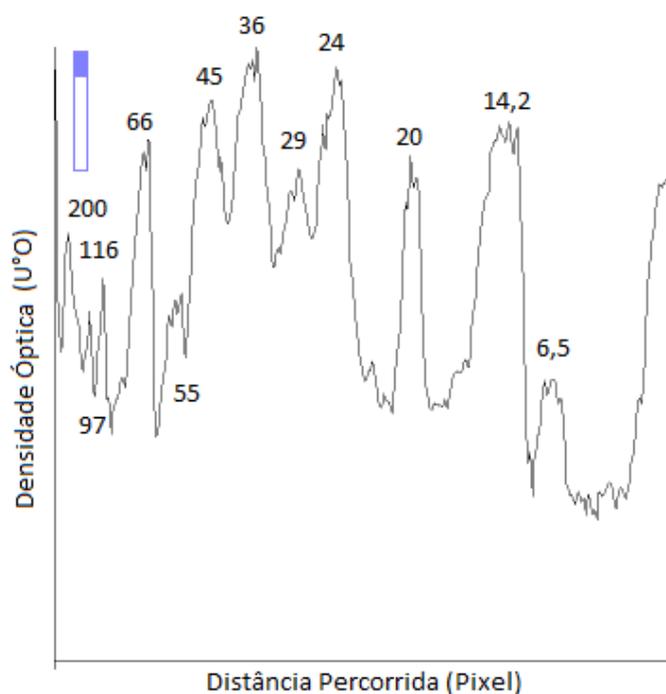


A partir das unidades reveladas no gel corado com nitrato de prata (**Figura 7**), foi possível observar que as amostras de soro fluido (SF1, SF2 e SF3) apresentaram 10, 11 e 11 unidades reveladas, respectivamente, enquanto a amostra do soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) apresentou 9 unidades reveladas. Essa variação pode ter ocorrido devido ao processo de secagem realizado nas amostras do soro líquido, processo este utilizado para manter a conservação de suas características nutricionais durante o transporte (REDDY *et al.*, 2014), o qual resultaria em uma degradação das proteínas muito sensíveis às temperaturas empregadas na atomização.

Todas as amostras após o tratamento térmico à 85 °C por 30 min (TI, TF, D1 e D7) apresentaram perfil semelhante, com bandas proeminentes nas faixas de 8,65 a 12,81; 13,5 a 20,85; 22,94 a 26,05; 33,23 a 47,14; 55,26 a 76,73 e 79,2 a 81,77kDa, equivalentes às proteínas e grupos proteicos  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg, Ig de cadeia leve, Ig de cadeia pesada, SA e LF, respectivamente. Tais proteínas e grupos proteicos também foram observados por Raimondo *et al.* (2013) ao realizar o proteinograma de cabras da raça Saanem através de SDS-PAGE em gel de 12%, por Salvatore *et al.* (2014) ao investigar a influência da concentração de proteína de soro, obtido por ultrafiltração, no rendimento de 4 misturas de ricota fresca ovina, e por Casper, Wendorff e Thomas (1998) ao determinar a variação sazonal na composição das proteínas brutas e individuais do soro de leite de queijos comerciais de caprinos e ovinos por SDS-PAGE em gel de 12,5%.

O padrão utilizado no gel foi analisado densitometricamente, onde foram revelados pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2 e 6,5 kDa, apresentados na faixa PM do gel (**Figura 7**), com bandas reveladas também indicadas na **Figura 8**, relacionadas à análise densitométrica, na qual os picos representam as subunidades proteicas separadas.

**Figura 8** - Análise densitométrica do padrão Sigma - S8445.

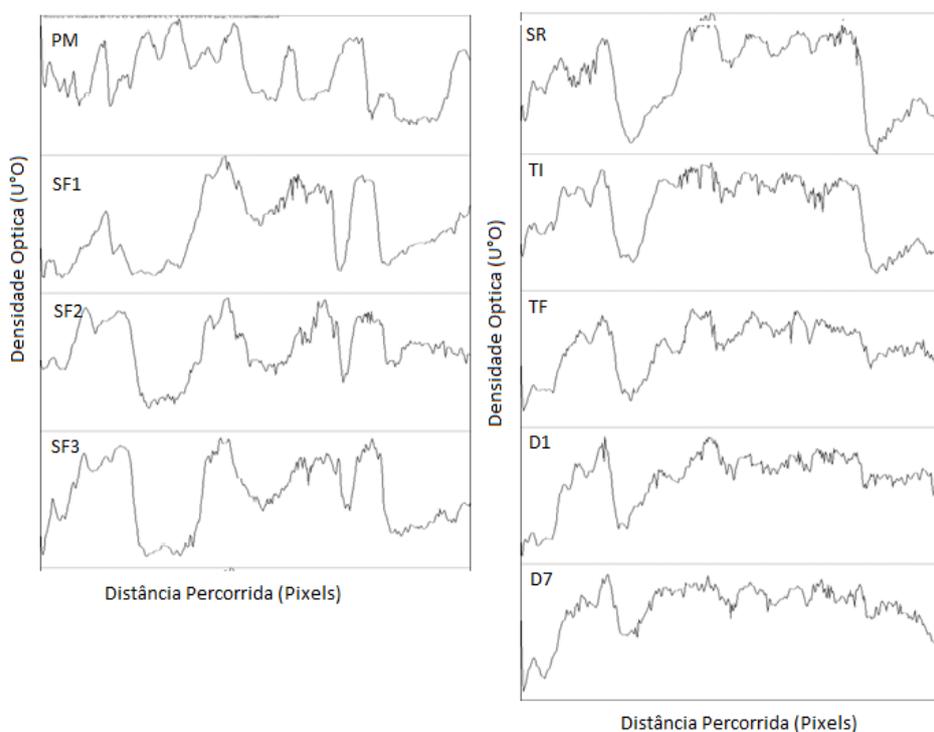


A partir da medição das distâncias percorridas, quer pelos marcadores de peso molecular, quer pela proteína purificada e aplicando logaritmos aos pesos moleculares, foi possível obter uma reta cujos parâmetros, por regressão linear, equação (2), foram utilizados para determinar o peso molecular das amostras em estudo.

$$y = -0,0018x + 2,1196 \quad (R^2 = 0,943) \quad (2)$$

As demais amostras em análise tiveram suas distâncias percorridas determinadas através da análise densitométrica (**Figura 9**), onde os picos representam as subunidades proteicas separadas e, assim, foram obtidos os logaritmos para a determinação dos pesos moleculares específicos de cada unidade revelada.

**Figura 9** - Análise densitométrica das proteínas presentes nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7), analisadas por SDS-PAGE, juntamente com o padrão de peso molecular Sigma S8445 (PM).



Os dados representados nas **Tabelas 8 e 9** são referentes aos pesos moleculares e índices percentuais das unidades polipeptídicas reveladas, os quais foram obtidos a partir da análise densitométrica comparativo ao padrão revelado no mesmo gel.

Segundo Casper, Wendorff e Thomas (1998) e Raimondo (2011), a  $\beta$ -Lg, com massa molar de 18,27 kDa, é a principal proteína do soro lácteo de cabras, representando cerca de 50,9% a 63,8 % do total de proteínas do soro. Em segundo lugar está a  $\alpha$ -La, com massa total de 14,18 kDa, representativa de 29,8 a 34,7 % das proteínas do soro. Após estas proteínas, aparecem em menor quantidade, as imunoglobulinas (Ig) de cadeia leve (23 kDa) e pesada (53 kDa), a SA (66kDa) e a LF (80kDa). Neste sentido, Raimondo *et al.* (2013), ao realizar o proteinograma do soro de leite de cabras da raça Saanem, observou a presença das proteínas  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg, Ig, SA e LF tanto no período de lactação como no período de secagem, além de outras frações com bandas entre 116-244 kDa, 32-44 kDa,  $67 \pm 1$  kDa e  $11 \pm 0,69$  kDa não identificadas pelo autor. A presença das proteínas  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg, Ig, SA e LF no soro caprino foram demonstradas neste trabalho, tanto no soro fluido *in natura* como no soro processado nos diferentes períodos de amostragem, corroborando com os referidos autores, indicando que grande parte dessas proteínas ainda são preservadas mesmo após a secagem, tratamento térmico e fermentação.

**Tabela 8** - Unidades polipeptídicas reveladas (faixa de 121 – 28,35 kDa) nas análises eletroforéticas, com gel de 17,5%, nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7).

Unidades Reveladas (kDa)	Conteúdo Revelado (%)								Fração atribuída	
	SF1	SF2	SF3	SR	TI	TF	D1	D7		
121	2,36	-	-	-	-	-	-	-	-	
118,46	-	5,35	3,45	5,12	3,87	4,34	1,56	2,20		
91	-	11,99	12,04	8,76	4,72	5,34	5,16	5,58		
81,77	-	-	-	-	7,14	4,61	6,18	6,93		LF
79,2	-	-	-	4,11	-	-	-	-		
76,73	11,29	-	7,69	-	-	-	-	-		
68,3	3,05	15,48	8,03	7,77	-	-	-	-		
67,57	-	-	-	-	7,31	9,23	8,93	-		SA
66,16	-	-	-	-	-	-	-	7,83		
55,26	-	-	-	-	1,38	1,20	-	-		
47,14	-	-	-	-	-	-	7,77	9,99		
46,15	3,37	3,31	2,05	-	-	-	-	-		
41,07	-	-	-	-	12,34	11,20	-	-		lg de cadeia pesada
39,79	-	-	-	-	-	-	6,27	3,80		
36,55	-	-	-	-	-	-	-	4,62		
33,23	13,62	11,27	9,66	13,60	9,50	8,30	8,22	-		
29,27	12,49	9,05	14,54	14,54	8,22	6,44	-	-		
28,35	-	-	-	-	-	-	11,62	13,63		

**Tabela 9** - Unidades polipeptídicas reveladas (faixa de 26,05 – 5,32 kDa) nas análises eletroforéticas, com gel de 17,5%, nas amostras de soro fluido *in natura* de queijo de cabra tipo coalho (SF1, SF2 e SF3), soro em pó reconstituído sem microrganismos (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (tratamento C1) antes da fermentação (TI), após a fermentação (TF) e após 1 (D1) e 7 dias de armazenamento (D7).

Unidades Reveladas (kDa)	Conteúdo Revelado (%)								Fração atribuída
	SF1	SF2	SF3	SR	TI	TF	D1	D7	
26,05	6,72	2,93	-	-	-	-	-	-	Ig de cadeia Leve
24,18	-	-	-	-	4,24	-	-	-	
22,94	-	2,78	-	-	-	-	-	-	
20,85	-	-	-	-	8,18	-	-	-	β-Lg
19,77	-	-	-	14,53	-	12,95	10,26	12,91	
17,79	-	-	-	-	6,15	5,04	-	-	
17,6	-	-	-	-	-	-	4,85	-	
16,7	18,76	11,20	14,53	-	-	-	-	-	
15,5	-	-	-	-	-	6,19	-	-	
14,39	-	-	-	-	-	-	10,63	12,07	
14,09	11,81	11,97	7,94	-	-	-	-	-	
13,5	-	-	-	14,88	10,06	6,44	-	-	
12,81	-	-	5,83	-	-	-	-	-	
11,52	-	-	-	-	-	-	7,06	9,52	α-La
9,83	-	-	-	16,71	16,89	18,72	6,29	-	
9,62	16,53	14,67	-	-	-	-	-	-	
9,32	-	-	14,25	-	-	-	-	6,08	
8,65	-	-	-	-	-	-	5,20	-	
8,38	-	-	-	-	-	-	-	4,83	
6,44	-	4,98	1,50	1,38	1,57	4,68	6,58	4,65	
5,32	-	1,64	2,36	1,63	1,35	2,39	2,26	2,34	

Assim como no estudo realizado por Raimondo *et al.* (2013), houve, neste trabalho, a revelação de frações com bandas não identificadas para as faixas de 121 a 91 kDa, 29,27 a 28,35 kDa. No entanto, neste estudo frações menores foram reveladas entre a faixa de 5,32 a 8,38 kDa, representando, possivelmente, a presença de frações peptídicas formadas em decorrência da atividade proteolítica dos microrganismos utilizados no tratamento C1, especialmente *L. casei* BGP93.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os valores de pH e acidez mantiveram-se entre 5,77-4,83 e 0,303-0,688 g de ácido lático/100 g, respectivamente. No entanto o tratamento C4, produzido com *L. rhamnosus* LR32, sofreu o fenômeno de pós-acidificação. A viabilidade de todas as bactérias potencialmente probióticas apresentou-se em nível superior ao mínimo exigido pela ANVISA para alimentos probióticos ao longo de 7 dias de armazenamento. A metodologia NIR apresentou valores de predição satisfatórios para análises de pH e *Lactobacillus* sp. e o método RP-UFLC permitiu a identificação de modificações entre as amostras de soro reconstituído sem os microrganismos (SR) e as amostras de soro reconstituído com microrganismos nos diferentes tempos (TI, TF, D1 e D7). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, mas houve diferenças significativas entre antes da fermentação (TI) e logo após a fermentação (TF) para a proteólise pelo método OPA, observando-se uma tendência de maiores valores em C1, o que corrobora com os resultados obtidos por RP-UFLC, mostrando indícios de atividade proteolítica ligeiramente maior para as amostras contendo *L. casei* BGP93. Esta atividade também foi comprovada por SDS-PAGE, através da qual a presença de frações de baixo peso molecular foram observadas em C1, possivelmente peptídeos formados devido ação proteolítica dos microrganismos presentes nesse tratamento.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. **Food Reviews International**, v. 29, n.1, p. 1-23, 2013.
- ABDELGAWAD, A.R.; GUAMIS, B.V.; CASTILLO, M. Using a fiber optic sensor for cutting time prediction in cheese manufacture from a mixture of cow, sheep and goat milk. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 157-168, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, alegações de propriedade funcional aprovada**. 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em 17 jul. 2015.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 231-E, 3 dez. 1999. Seção 1, p. 23-24.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 251, 26 dez. 2003. Seção 1, p. 28-32.
- ALIAKBARIAN, B.; CASALE, M.; PAINI, M.; CASAZZA, A.A.; LANTERI, S.; PEREGO, P. Production of a novel fermented milk fortified with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 376-383, 2015.
- ALMAAS, H.; ERIKSEN, E.; SEKSE, C.; COMI, I.; FLENGSRUD, R.; HOLM, H.; JENSEN, E.; JACOBSEN, M.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 896-905, 2011.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 17th. ed. 2nd. rev. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2003. 2v.
- BERNACKA, H. Health-promoting properties of goat milk. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 67, n. 8, p. 507-511, 2011.
- BONFATTI, V.; GRIGOLETTO, L.; CECCHINATO, A.; GALLO, L.; CARNIER, P. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 101-106, 2008.
- BORBA, K.K.S.; SILVA, F.A.; MADRUGA, M.S.; QUEIROGA, R.C.R.E.; SOUZA, E.L.; MAGNANI, M. The effect of storage on nutritional, textural and

sensory characteristics of creamy ricotta made from whey as well as cow's milk and goat's milk. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1279-128, 2014.

BOSSU, C.M. **Fracionamento de zinco em amostras de leite**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

BOTELHO, B.G. **Desenvolvimento e validação de métodos para análise direta de alimentos usando ferramentas quimiométricas, espectroscopia no infravermelho e imagens digitais**. 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. **Nutrition and Food Science**, v. 28, n. 2, p. 102-108, 1998b.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). **Nutrition and Food Science**, v. 28, n. 1, p. 41-48, 1998a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial União**, Brasília, n. 163, 24 ago. 2005. Seção 1, p. 7-10.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C.; SAAD, S.M.I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1605-1610, 2007.

BURITI, F.C.A.; FREITAS, S.C.; EGITO, A.S.; SANTOS, K.M.O. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 196-203, 2014.

CÁMARA-MARTOS, F.; LOPES, J.A.; MORENO-ROJAS, R.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. Detection and quantification of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in cow milk by near-infrared spectroscopy. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, p. 1-9, 2015.

CASAROTTI, S.N.; PENNA, A.L.B.; Incorporation of fruit flours into fermented milk: acidification profile, viability of probiotics and gastrointestinal tolerance. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 1-6, 2015.

CASPER, J. L.; WENDORFF, W. L.; THOMAS, D. L. Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3117-3122, 1998.

CASTILLO, M; PAYNE, F.A.; HICKS, C.L.; LOPEZ, M.B. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 551-562, 2000.

CAVALCANTI, M.T. **Caracterização lipídica e protéica das amêndoas da faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus* (Mart.) Pax et K. Hoffm.) com e sem espinhos**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

CHURCH, F.C.; SWAISGOOD, H.E.; PORTER, D.H.; CATIGNANI, G.L. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1219-1227, 1983.

COSTA, M.P.; BALTHAZAR, C.F.; FRANCO, R.M.; MÁRSICO, E.T.; CRUZ, A.G.; CONTE JUNIOR, C.A. Changes in expected taste perception of probiotic and conventional yogurts made from goat milk after rapidly repeated exposure. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n.5, p.2610-2618, 2014.

DIDELOT, S.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ROSENFELD, E.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; PIOT, J.M.; SANNIER, F. Preparation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. **International Dairy Journal**, v. 16, p.976-983, 2006.

DONKOR, O. N. **Influence of probiotic organisms on release of bioactive compounds in yoghurt and soy yoghurt**. 2007. 253 f. Ph. D. Thesis. Victoria University, [Melbourne], 2007.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; SINGH, T.K.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1321-1331, 2007.

DUMITRAȘCU, L.; MOSCHOPOULOU, E.; APRODU, I.; STANCIU, S.; RÂPEANU, G.; STĂNCIUC, N. Assessing the heat induced changes in major cow and no-cow whey proteins conformation on kinetic and thermodynamic basis. **Small Ruminant Research**, v. 111, p. 129-138, 2013.

ERIKSEN, E.K.; VEGARUD, G.E.; LANGSRUD, T.; ALMAAS, H.; LEA, T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. **Small Ruminant Research**, v. 79. p. 29-37, 2008.

ESPEJO-CARPIO, F.J.; GOBBA, C.D.; GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; OTTE, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 175-183, 2013.

GOBBA, C.D.; ESPEJO-CARPIO, F.J.; SKIBSTED, L.H.; OTTE, J. Antioxidant peptides from goat milk protein fraction hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 28-40, 2014.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M.; MORÓN-SANCHO, R.; SALVADOR-ESTEBAN, J.; VIVAR-QUINTANA, A.; REVILLA, I. Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheeses with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, p. 191-196, 2007.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292-302, 2010.

HAMMÉ, V.; SANNIER, F.; PIOT, J.M.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S. Effects of lactokinins from fermented acid goat whey on lipid content and adipogenesis of immortalized human adipocytes. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 642-645, 2010.

HASSAN, A.M.; ABBAS, H.M.; ABD EL-GAWAD A.M. M.; ENAB, K.A. Goats dairy products as a potentially functional food. **Life Science Journal**, v. 11, n. 9, p. 648-657, 2014.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTERAS, M.M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and interfaces science**, v. 165, p. 23-35, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M.J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 82-100, 2014.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GÓMEZ-RUIZ, J.A. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminants Research**, v. 101, p. 196-204, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. [1. ed. digital]. São Paulo: IAL, 2008. 1018 p.

KENT, R.M.; GUINANE, C.M.; O'CONNOR, P.M.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R.P. Production of the antimicrobial peptides Caseicin A and B by *Bacillus* isolates growing on sodium caseinate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p. 141-148, 2012.

KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; MIKELSAAR, M.; ZILMER, K.; VIHALEMM, T.; ZILMER, M. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 449-45, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 689-695, 1970.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F. X. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 437-456, 2010.

MARQUES, A.P. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro lácteo e café solúvel com atividade probiótica**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2012.

MARROKI, A; BOUSMAHA-MARROKI, L. Lactobacilli isolated from Algerian goat's milk as adjunct culture in dairy products. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 57, n. 3, p. 410-420, 2014.

MEDEIROS, A.C.L.; THOMAZINI, M.; URBANO, A.; CORREIA, R.T.P.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Structural characterisation and cell viability of a spray dried probiotic yoghurt produced with goats' milk and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BI-07). **International Dairy Journal**, v. 39, p. 71-77, 2014.

MINERVINI, F.; BILANCIA, T.M.; SIRAGUSA, S.; GOBBETTI, M.; CAPONIO, F. Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. **Food Microbiology**, v. 26, p. 559-564, 2009.

NG, E.W.; YEUNG, M.; TONG, P.S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 169-175, 2011.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 935-942, 2001.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J.A.; CAMBERO RODRÍGUES, M.I.; FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, L.; GARCÍA SANZ, M.L.; DE FERNANDO MINGUILLÓN, G.D.G.; HOZ PERALES, L.; SELGAS CORTECERO, M.D. **Tecnología de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 279 p. v. 2: Alimentos de origem animal.

PINTADO, M.E.; SILVA, J.A.L.; MALCATA, F.X. Comparative characterization of whey protein concentrates from ovine, caprine and bovine breeds, LWT - **Food Science and Technology**, v. 32, p. 231-237, 1999.

RAIKOS, V.; DASSIOS, T. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. **Dairy Science and Technology**, v. 94, p. 91-101, 2014.

RAIMONDO, R.F.S. **Proteinograma da secreção láctea de cabras**. 2011.149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RAIMONDO, R.F.S.; BRANDESPIM, F.B.; PRINA, A.P.M.; MIYASHIRO, S.I.; SAUT, J.P.F.; MORI, C.S.; POGLIANI, F.C.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Dynamic in the concentration of whey proteins in the mammary secretion of goats during the dry period. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 239-246, 2013.

RAIZEL, R., SANTINI, E., KOPPER, A.M., FILHO, A.D.R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K.; Effect of dairy probiotic combinations on *in vitro* gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 18-25, 2014.

REDDY, R.S.; RAMACHANDRA, C.T.; HIREGOUDAR, S.; NIDONI, U.; RAM, J.; KAMMAR, M. Influence of processing conditions on functional and reconstitution properties of milk powder made from Osmanabadi goat milk by spray drying. **Small Ruminant Research**, v. 119, p. 130-137, 2014.

RIBEIRO, A.C.; RIBEIRO, S.D.A. Specialty products made from goat milk, **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 225-233, 2010.

RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: COMPENDIUM of the methods for microbiological examination of foods. 4th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. p. 483-495.

RYAN, J.T.; ROSS, R.P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v. 3, p. 765-791, 2011.

SAH, B.N.P.; VASILJAEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O.N. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food Chemistry**, v. 156, p. 264-270, 2014.

SALVA, S.; NUÑEZ, M.; VILLENA, J.; RAMÓN, A.; FONT, G.; ALVAREZ, S. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: *in vivo* study of health benefits. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2355-2362, 2011.

SALVATORE, E.; PES, M.; FALCHI, G.; PAGNOZZI, D.; FURESI, S.; FIORI, M.; ROGGIO, T.; ADDIS, M. F.; PIRISI, A. Effect of whey concentration on protein recovery in fresh ovine ricotta cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 4686-4694, 2014.

SANTILLO, A.; KELLY, A.L.; PALERMO, C.; SEVI, A.; ALBENZIO, M. Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 655-660, 2009.

SANTOS, M.C.S. **Utilização da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e quimiometria na identificação do café torrado e moído adulterado**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2005.

SANTOS, M.I.; GERBINO, E.; ARAUJO-ANDRADE, C.; TYMCZYSZYN, E.E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. **Food Research International**, v. 59, p. 53-60, 2014a.

SANTOS, W.M.; PONTES, S.M.T.; BURITI, F.C.A. **Caracterização de soro de queijo de cabra seco por atomização e seu uso como ingrediente para a obtenção de bebida láctea fermentada com potencial funcional**. 2014. 45 f. Relatório Final do Programa Institucional de Iniciação Científica UEPB/CNPq Cota 2013-2014. Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014b.

SANTOS, W.M.; SANTOS E SILVA, D.K.; BURITI, F.C.A. **Caracterização de soro de queijo de cabra seco por atomização e avaliação dos produtos da degradação proteica na presença de bactérias probióticas comerciais**. 2013. 29 f. Relatório Final do Programa Institucional de Iniciação Científica UEPB/CNPq Cota 2012-2013. Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

SILVA, D.C.G.; BRUGNERA, D.F.; ABREU, L.R. Quantification of lactic acid bacteria and bifidobacteria in goat milk based yoghurts with added water-soluble soy extract. **African Journal of Food Science**, v. 7, n. 10, p. 392-398, 2013.

TABASCO, R.; PAARUP, T.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk, **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1107–1114, 2007.

TORRE, M.; COHEN, M.E.; CORZO, N.; RODRIGUEZ, M.A.; DIEZ-MASA, J.C. Perfusion liquid chromatography of whey proteins, **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 99-111, 1996.

VALENTI, B.; MARTÍN, B.; ANDUEZA, D.; LEROUX, C.; LABONNE, C.; LAHALLE, F.; LARROQUE, H.; BRUNSCHWIG, P.; LECOMTE, C.; BROCHARD, M.; FERLAY, A. Infrared spectroscopic methods for the discrimination of cow's milk according to the feeding system, cow breed and altitude of the dairy farm. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 26-32, 2013.

VARGA, L.; SÜLE, J.; NAGYT, P. Survival of the characteristic microbiota in probiotic fermented camel, cow, goat, and sheep milks during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2039-2044, 2014.

WANG, W.; BAO, Y.; HENDRICKS, G.M.; GUO, M. Consistency, microstructure and probiotic survivability of goats' milk yoghurt using polymerized whey protein as a co-thickening agent. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 113-119, 2012.

XANTHOPOULOS, V.; IPSILANDIS, C.G.; TZANETAKIS, N. Use of a selected multi-strain potential probiotic culture for the manufacture of set-type yogurt from caprine milk. **Small Ruminant Research**, v.106, n. 2-3, p.145-153, 2012.

YANGILAR, F. As a potentially functional food: goats' milk and products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 1, n. 4, p. 68-81, 2013.