



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DÔRIAN CORDEIRO LIMA JÚNIOR

**QUEIJO DE CABRA COM EXTRATO DE SEMENTE DE *Helianthus annuus*
(GIRASSOL) E CULTURA NATIVA DE *Limosilactobacillus mucosae*:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FUNCIONAL E SOBREVIVÊNCIA DA BACTÉRIA
LÁTICA *IN VITRO***

**Campina Grande
2022**

DÔRIAN CORDEIRO LIMA JÚNIOR

**QUEIJO DE CABRA COM EXTRATO DE SEMENTE DE *Helianthus annuus*
(GIRASSOL) E CULTURA NATIVA DE *Limosilactobacillus mucosae*:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FUNCIONAL E SOBREVIVÊNCIA DA BACTÉRIA
LÁTICA *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba para obtenção do título de mestre.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti.

Coorientador:

Prof. Dr. Antônio Silvio do Egito.

Campina Grande

2022

É expressamente proibido 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 do trabalho.

L732q Lima Júnior, Dôrian Cordeiro .

Queijo de cabra com extrato de semente de *Helianthus annuus* (Girassol) e cultura nativa de *Limosilactobacillus mucosae* [manuscrito] : avaliação do potencial funcional e sobrevivência da bactéria láctica in vitro / Dôrian Cordeiro Lima Júnior. - 2022.

65 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Burity , Departamento de Farmácia - CCBS."

"Coorientação: Prof. Dr. Antônio Silvio do Egito , Embrapa Algodão"

1. *Helianthus annuus*. 2. *Limosilactobacillus mucosae*. 3. Coagulante vegetal. 4. Queijo de cabra. I. Título

21 ed. CDD.637.3

Dôrian Cordeiro Lima Júnior

**QUEIJO DE CABRA COM EXTRATO DE SEMENTE DE *Helianthus annuus*
(GIRASSOL) E CULTURA NATIVA DE *Limosilactobacillus mucosae*:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FUNCIONAL E SOBREVIVÊNCIA DA BACTÉRIA
LÁTICA *IN VITRO***

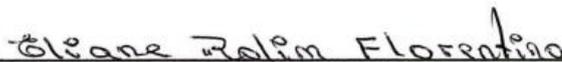
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba para a obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 22/04/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof.^a Dr.^a Eliane Rolim Florentino
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof.^a Dr.^a Mônica Correia Gonçalves
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Aos meus pais, por todo apoio e base.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Josicleide e Dôrian, por terem tornado tudo isso possível, por terem sempre me incentivado e ensinado a seguir o caminho.

À Katianne e Francisco por todo o apoio e força nos piores momentos, e por todas as risadas nos melhores momentos. Ao meu amigo Márcio, por sempre estar ao meu lado.

À minha companheira de mestrado e amiga Thamires por estar ao meu lado e me ajudar a remar. À Ana Catarina por ter sido peça chave na aquisição de insumos para esta pesquisa. Aos alunos de Iniciação Científica, voluntários e outros colaboradores que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À minha orientadora Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti por todos os ensinamentos, pela paciência e compreensão e pela confiança na condução deste trabalho. Ao meu coorientador Dr. Antônio Silvio do Egito pelos esclarecimentos e ensinamentos, que foram vitais para a realização deste trabalho.

A todos os profissionais do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA), que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Ao Laboratório de Ecologia Aquática (LEAQ) pelo suporte à realização das análises. À Embrapa Caprinos e Ovinos, em especial ao Núcleo Regional Nordeste, à Embrapa Agroindústria de Alimentos e à Embrapa Algodão pelo material disponibilizado à pesquisa e pela equipe de pesquisadores, técnicos e bolsistas que colaboraram com as atividades deste estudo, em especial a Dr.^a Márcia Maria Cândido da Silva, pesquisadora bolsista DCR/FAPESQ/CNPq e Terezinha Fernandes Duarte, técnica da Embrapa Algodão por toda a ajuda na execução dos ensaios de eletroforese.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo auxílio à pesquisa através dos equipamentos multiusuários, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da verba PROAP, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e bolsas aos colaboradores deste trabalho e à Fundação Parque Tecnológico da Paraíba (PaqTcPB) pelo apoio financeiro ao NUPEA, à Associação Gestora da Usina de Beneficiamento de Lácteos (AGUBEL) pela colaboração com parte dos insumos utilizados nos ensaios pilotos, e a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Insone, por todo o esforço na execução deste trabalho.

*“Like the stars chase the sun
Over the glowing hill, I will conquer
Blood is running deep
Some things never sleep”
(Florence and the Machine)*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial funcional de queijo elaborado com extrato de sementes de *Helianthus annuus* (girassol) e cultura nativa potencialmente probiótica de *Limosilactobacillus mucosae* (cepa CNPC007), comparando-o com um queijo controle produzido sem a cultura potencialmente probiótica. Foram produzidos seis lotes de queijo utilizando extrato de sementes de girassol como coagulante, sendo 3 lotes controle sem o microrganismo potencialmente probiótico e 3 lotes contendo o microrganismo. Foram avaliados os parâmetros viabilidade do microrganismo potencialmente probiótico, sua resistência às condições gastrointestinais *in vitro*, condições sanitárias através de análises de contaminantes (*Escherichia coli*, coliformes a 37°C e a 45°C, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp.), acidez titulável, composição centesimal (carboidratos, proteínas, lipídeos, umidade e cinzas), teor de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e perfil de proteólise. Os queijos produzidos apresentaram teor proteico médio entre 17,49% e 19,09%, sendo classificados como fontes de proteínas segundo a legislação nacional vigente que determina o mínimo de 10% para alimentos fontes deste nutriente, teor de gordura ao redor de 22% e teor médio de umidade superior a 45,9%, recebendo a classificação de queijos de alta umidade. O queijo produzido com a cultura potencialmente probiótica apresentou viabilidade de *L. mucosae* superior a 8 log UFC/g durante o período de armazenamento (60 dias a 6 ± 1°C). No teste de resistência gastrointestinal *in vitro* 16,66% das amostras analisadas no dia 1 de armazenamento apresentaram valor superior a 6 log UFC/g enquanto que nas amostras analisadas no dia 30 e 60 observou-se que 66,66% das amostras apresentaram valor superior a 6 log UFC/g. Não foi encontrada presença de *E. coli* nem de *Salmonella* sp. nos queijos e o número de coliformes totais diminuiu durante o armazenamento dos queijos que continham *L. mucosae*, chegando a zero nos queijos com 60 dias de armazenamento, demonstrando um possível efeito bioconservante da cultura de *L. mucosae* sobre esses microrganismos indicadores sanitários. Na análise do teor de compostos fenólicos os lotes analisados apresentaram resultados entre 80,97 e 124,71 mg de equivalentes de ácido gálico (Eq AG/100 g) de amostra e 51,49-85,34 mg Eq AG/100g de amostra para os queijos controle e probiótico respectivamente. Na análise da capacidade antioxidante, para a captura de 1 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), são necessários 1,289-2,619 g de queijo controle e 1,026-1,480 g de amostra de queijo com *L. mucosae*. Os queijos apresentaram algumas diferenças com relação às bandas que foram reveladas nos géis de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio das análises de eletroforese (SDS-PAGE), sendo mais intensas nos queijos com *L. mucosae*, mas tendo havido aumento da proteólise ao final do armazenamento nos dois tratamentos avaliados. O queijo produzido através de coagulação vegetal com extrato de *H. annuus* contendo *L. mucosae* CNPC007 apresentou-se como uma alternativa como fonte de microrganismos probióticos, além de poder auxiliar na promoção da saúde.

Palavras-chaves: *Helianthus annuus*. *Limosilactobacillus mucosae*. Coagulante vegetal. Queijo.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the functional potential of cheese made with *Helianthus annuus* (sunflower) seed extract and potentially probiotic native culture of *Limosilactobacillus mucosae* (CNPC strain 007), comparing it with a control cheese produced without the potentially probiotic culture. Six batches of cheese were produced using sunflower seed extract as a rennet, being 3 control batches without the potentially probiotic microorganism and 3 batches containing the microorganism. The viability of the potentially probiotic microorganism, its resistance to gastrointestinal conditions *in vitro*, the sanitary conditions through analysis of contaminants (*Escherichia coli*, coliforms at 37°C and 45°C, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp.), titratable acidity, proximate composition (carbohydrates, proteins, lipids, moisture and ash), phenolic compounds content, antioxidant capacity and proteolysis profile. The cheeses produced had an average protein content between 17.49% and 19.09%, being classified as protein sources according to the current national legislation, which determines a minimum of 10% for foods that are sources of this nutrient, a fat content of around 22%, and an average moisture content higher than 45.9%, being classified as high moisture cheeses. The cheese produced with the potentially probiotic culture showed *L. mucosae* viability greater than 8 log CFU/g during the storage period (60 days at 6 ± 1°C). In the *in vitro* gastrointestinal resistance test, 16.66% of the samples analyzed on day 1 of storage presented a value greater than 6 log CFU/g, while in the samples analyzed on day 30 and 60 it was observed that 66.66% of the samples presented a value greater than 6 log CFU/g. No presence of *E. coli* or *Salmonella* sp. was observed in the cheeses, and the number of total coliforms decreased during the storage of cheeses containing *L. mucosae*, reaching zero in cheeses with 60 days of storage, evidencing a possible biopreservative effect of the *L. mucosae* culture on these sanitary indicator microorganisms. In the analysis of the content of phenolic compounds, the analyzed batches presented results between 80.97 and 124.71 mg of gallic acid equivalents (Eq AG/100 g of sample) and 51.49-85.34 mg Eq AG/100g of sample for the control and probiotic cheeses respectively. In the analysis of the antioxidant capacity, for the capture of 1 mg of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 1.289-2.619 g of control cheese and 1.026-1.480 g of cheese sample with *L. mucosae* are needed. The cheeses showed some differences with relation the bands that were revealed in the sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), being more intense in those with *L. mucosae*, although there was an increase in proteolysis at the end of storage in both treatments. The vegetable rennet cheese produced with *H. annuus* extract and *L. mucosae* CNPC007 presented itself as an alternative source of probiotic microorganisms, in addition to being able to help in health promotion.

Keywords: *Helianthus annuus*. *Limosilactobacillus mucosae*. Vegetable rennet. Cheese.

Lista de figuras

Figura 1 – Extrato de sementes de girassol.....	38
Figura 2 – Teste de coagulação.....	39
Figura 3 – Queijos do lote piloto.....	39
Figura 4 – Queijos do lote definitivo.....	40
Figura 5 – Eletroforese dos queijos do Lote 2.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição centesimal dos leites utilizados nos lotes definitivos.....	41
Tabela 2 – Composição centesimal dos lotes dos tratamentos C e M definitivos.....	41
Tabela 3 – Valores de umidade durante os tempos de armazenamento de 1, 30 e 60 dias dos queijos (D1, D30 e D60, respectivamente).....	42
Tabela 4 – Valores de acidez titulável durante os tempos de armazenamento de 1, 30 e 60 dias dos queijos (D1, D30 e D60, respectivamente).....	43
Tabela 5 – Viabilidade de <i>L. mucosae</i> presente nos queijos durante os tempos de armazenamento de 1, 30 e 60 dias dos queijos (D1, D30 e D60, respectivamente).....	44
Tabela 6 – Sobrevivência de <i>L. mucosae</i> (valores mínimos – máximos em log UFC/g e porcentagens acima de 6 log UFC/g) durante o ensaio de resistência gastrintestinal após 1, 30 e 60 dias (D1, D30 e D60, respectivamente).....	46
Tabela 7 – Análise dos contaminantes presentes nos queijos.....	48
Tabela 8 – Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1	Leite de cabra.....	17
3.2	Alimentos funcionais	18
3.3	Proteases vegetais.....	19
3.4	<i>Helianthus annuus</i>	19
3.5	Probióticos.....	20
3.6	Culturas nativas.....	21
3.7	Sobrevivência das bactérias probióticas à passagem pelo trato gastrointestinal.....	22
3.8	Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	23
3.9	Proteólise em produtos lácteos.....	24
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	Local de desenvolvimento da pesquisa.....	25
4.2	Extrato das sementes de <i>Helianthus annuus</i> (girassol).....	25
4.3	Análise da atividade coagulante do extrato.....	25
4.4	Ativação da cepa liofilizada.....	26
4.5	Produção do lote piloto.....	26
4.6	Produção dos lotes definitivos.....	27
4.7	Análise da composição centesimal e acidez titulável.....	28
	Análise da viabilidade do probiótico.....	29
4.8	Resistência do probiótico às condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i>	29
4.9	Análise de contaminantes.....	30
4.10	Determinação da presença de coliformes totais, termotolerantes e	
4.10.1	<i>Escherichia coli</i>	30
4.10.2	Determinação da presença de <i>Staphylococcus</i> sp.....	31
4.10.3	Determinação de presença de <i>Salmonella</i> sp.....	31

4.11	Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.....	31
4.11.1	Preparo das amostras.....	31
4.11.2	Determinação de compostos fenólicos totais.....	32
4.11.3	Determinação da atividade antioxidante por DPPH.....	32
4.12	Análise proteolítica por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).....	33
4.12.1	Preparo de soluções.....	33
<u>4.12.1.1</u>	<u>Solução de acrilamida.....</u>	<u>33</u>
<u>4.12.1.2</u>	<u>Tampão do gel de separação.....</u>	<u>33</u>
<u>4.12.1.3</u>	<u>Tampão do gel de concentração.....</u>	<u>33</u>
<u>4.12.1.4</u>	<u>Tampão de corrida.....</u>	<u>34</u>
<u>4.12.1.5</u>	<u>Solução SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10%.....</u>	<u>34</u>
<u>4.12.1.6</u>	<u>Catalisador.....</u>	<u>34</u>
<u>4.12.1.7</u>	<u>Tampão de amostra.....</u>	<u>34</u>
<u>4.12.1.8</u>	<u>Glicerol com azul de bromofenol.....</u>	<u>35</u>
<u>4.12.1.9</u>	<u>Solução 5% de Coomassie Blue G-250.....</u>	<u>35</u>
<u>4.12.1.10</u>	<u>Solução Estoque Coomassie Blue G-250.....</u>	<u>35</u>
<u>4.12.1.11</u>	<u>Solução de trabalho.....</u>	<u>35</u>
4.12.2	Preparo das amostras.....	35
4.12.3	Preparo dos géis.....	36
4.12.4	Corrida eletroforética.....	36
4.13	Análise Estatística.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Extrato das sementes de <i>Helianthus annuus</i> (girassol).....	38
5.2	Análise da atividade coagulante do extrato.....	38
5.3	Produção do lote piloto	39
5.4	Produção dos lotes definitivos.....	40
5.5	Análise de composição centesimal e acidez titulável.....	41
5.6	Análise da viabilidade do probiótico.....	44
5.7	Resistencia do probiótico a passagem pelo sistema gastrintestinal.....	45

5.8	Análise dos contaminantes.....	47
5.9	Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.....	49
5.10	Análise proteolítica por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).....	51
6	CONCLUSÃO.....	54
7	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	55
	RERERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Apresentando um perfil mais parecido com o leite humano do que o leite de vaca e de ovelha, o leite caprino mostra inúmeros benefícios para a saúde dos consumidores, como uma menor probabilidade de causar reações alérgicas em pessoas com alergia ao leite de vaca (MARTINS et al., 2018), maior digestibilidade, alcalinidade, além de capacidades terapêuticas e nutritivas (PARK et al., 2007; BIDOT-FERNÁNDEZ, 2017). Essas características presentes no leite de cabra o tornam uma excelente base para a produção de outros alimentos, a exemplo de iogurtes, leites fermentados, bebidas lácteas e queijos.

O processo de coagulação do leite foi descoberto por acaso quando esse alimento foi armazenado em pele secas de animais na antiguidade. Por muito tempo foram utilizados estômagos de bezerro como coagulante de leite para a fabricação de queijos devido a presença de enzimas, principalmente a quimosina (MANZOR; SHABIR; MOHD, 2013). A produção de queijos aumentou de forma acelerada mundialmente, mas a produção de coagulante proveniente de estômagos de bezerros diminuiu a partir de 1961, o que fez com que fosse necessário a busca por outras fontes de coagulantes, como enzimas produzidas por microrganismos e por plantas (JACOB; ROHM, 2010).

Nesse aspecto a utilização de enzimas com capacidade de coagulação de fontes vegetais são uma ótima alternativa, visto que insumos vegetais são renováveis e essas enzimas estão presentes em diversas espécies de plantas (EGITO et al., 2007).

Mazorra-Manzano (2013) demonstrou que o extrato de kiwi apresenta uma boa atividade de coagulação do leite, bem como o extrato de gengibre e de melão. Outro estudo conduzido por Guiama et al. (2010) utilizando o gênero *Solanum* demonstrou que nove espécies desse gênero possuem capacidade de coagular o leite. Correia et al. (2016) utilizou extrato de flor de cardo para coagular leite de ovelha na produção do queijo Serra da Estrela (Portugal), tendo conseguido resultados satisfatórios e similares ao da produção do queijo utilizando quimosina. Freitas et al. (2016) conduziu um estudo onde foi demonstrada a atividade coagulante do látex de *Calotropis procera* (ciumeira) e *Cryptostegia grandiflora* (boca-de-leão) em leite bovino.

Compostos fenólicos tem se tornado interesse de um número crescente de estudos, e isso se deve a sua capacidade antioxidante que sequestra os radicais livres

presentes no organismo humano, que são responsáveis por diversos males em especial o estresse oxidativo das células (DORMAN et al., 2003; SILVA et al., 2010).

Autores tem reportado a capacidade antioxidante de extratos feitos com sementes de algumas espécies vegetais. Num estudo feito com extrato de soja foi observado um forte poder antioxidante (LIU; CHANG; WIESENBORN, 2005). Extrato de semente de uva a 100 ppm demonstrou capacidade antioxidante entre 65% e 90% (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001).

Giada (2008) conduziu um estudo usando extrato aquoso de sementes de *Helianthus annuus* onde foi visto que os compostos fenólicos representavam 1,34% das amostras, considerado uma boa quantidade. Dentre os compostos fenólicos, foram identificados o ácido clorogênico, ácido quinínico, ácido cafeico e ácido *p*-hidroxibenzoico.

Há uma crescente demanda por parte da população por alimentos com funções além das nutricionais, seja para evitar possíveis doenças, ou melhorar o funcionamento do organismo. Alimentos e bebidas que contêm probióticos se tornam mais atrativos àqueles sem probióticos devido ao seu efeito benéfico ao organismo. A definição da *International Association of Probiotics and Prebiotics*, aceita até os dias atuais, refere probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, confere um benefício de saúde ao hospedeiro” (HILL et al., 2014), a qual corroborou com e atualizou a definição anterior (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2001). De forma geral os probióticos trazem como benefício ao hospedeiro um trato gastrintestinal mais saudável e melhoras no sistema imunológico (MARTINS et al., 2018). Devido à sua ocorrência natural no intestino humano, cepas de *Lactobacillaceae* são comumente utilizadas na produção de forma comercial de cepas probióticas (VIZOSO PINTO et al., 2006; REQUE; BRANDELLI, 2022).

Com a finalidade de aumentar o número de cepas probióticas, a descoberta e caracterização de novas cepas potencialmente probióticas se tornam de vital importância, principalmente em países em desenvolvimento, para o estudo e elaboração de novos alimentos contendo probióticos, devido ao acesso ainda ser restrito para pequenos produtores de laticínios (SILVA et al., 2022; VINDEROLA et al., 2008).

Nesse contexto, o uso concomitante de leite de cabra, extrato vegetal e microrganismo probiótico na produção de queijo pode tornar possível a obtenção de

um alimento com múltiplos benefícios funcionais a saúde, além de uma nova opção de alimento para os produtores e comércio locais para uma demanda da população que cresce cada vez mais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um queijo de cabra com extrato de semente de *Helianthus annuus* (girassol) e cultura nativa potencialmente probiótica.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- a) produzir o extrato das sementes de *Helianthus annuus*;
- b) analisar a atividade coagulante do extrato vegetal;
- c) produzir o queijo de cabra com o extrato vegetal e a cultura nativa potencialmente probiótica de *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007;
- d) analisar a composição centesimal e a acidez titulável do queijo;
- e) analisar a viabilidade do probiótico no queijo;
- f) analisar a resistência às condições gastrintestinais simuladas do probiótico presente no queijo;
- g) analisar a presença de contaminantes no queijo;
- h) determinar a quantidade de fenólicos totais no queijo;
- i) analisar a atividade antioxidante do queijo pela técnica de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
- j) avaliar o perfil proteico do queijo por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite de cabra

Derivando do latim *lacte*, a palavra leite pode ser definida como líquido branco secretado pelas glândulas mamárias, um pouco antes e após o parto dos mamíferos (FENIMAN; PASSINI; MUCELIN, 2003).

A definição de leite caprino, de acordo com a legislação brasileira, é: “produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados” (BRASIL, 2000).

Variações de condições ambientais, raça, alimentação, sistema de criação, estágio de lactação, tecnologia empregada, genética fisiológica e idade podem alterar a composição do leite de cabra. A composição média do leite de cabra é de 4,4% de lactose, 3,7% de gordura, 3,3% de proteína e 0,7% de cinzas (ALVES et al., 2014; DOMINGO et al., 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).

Sendo um alimento de grande potencial econômico devido às suas características químicas, o leite de cabra pode ser utilizado na fabricação de diversos produtos, como leite UHT (*Ultra High Temperature*), queijos, sorvetes, manteigas, coalhada, bebidas fluídas, entre outros (BORBA et al., 2014).

A caprinocultura é realizada majoritariamente por pequenos produtores no Brasil. A região Nordeste detém 92,72% do rebanho nacional de caprinos. A Paraíba tem recebido incentivos à caprinocultura leiteira desde o ano de 2000, incentivos estes, que, melhoram os sistemas de aquisição, processamento e distribuição do leite caprino. A caprinocultura, portanto, veio a ser a principal atividade agropecuária nas regiões do Cariri, Sertão e Curimataú (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016 GALDINO, 2016; SUASSUNA, 2012).

Por ter um papel importante no setor socioeconômico nas regiões semiáridas, a pecuária caprina mostra-se como atividade de grande potencial. Uma maior integração entre as associações de criadores, instituições de pesquisa e governos mostra-se como marco importante no melhoramento do potencial leiteiro do rebanho, bem como do fomento ao desenvolvimento da indústria de laticínios (GALDINO, 2016; OLIVEIRA, 2009).

3.2 Alimentos funcionais

A constante busca por melhores hábitos de vida tem aumentado a procura por alimentos que tragam benefícios à saúde além de simplesmente alimentar. Alimentos funcionais podem suprir essa necessidade tendo em vista os seus benefícios.

Movimentando aproximadamente 94 bilhões de reais apenas em 2017 no Brasil, o mercado de alimentos e bebidas saudáveis, colocou o país na quinta posição dos países que mais consomem produtos do gênero (VILAR, 2018).

Alimentos funcionais são definidos como os que, além de fornecerem uma nutrição básica, geram benefício à saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional (BECKER, 2009; SANTOS; BARBOSA; BARBOSA, 2011; TEODORO et al., 2021).

A definição de alimento funcional segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução nº18 de 30/04/1999 é:

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 o consumo sem supervisão médica. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

Para que um alimento seja considerado funcional, um dos critérios que devem ser atendidos inclui a capacidade de resultar em efeitos positivos obtidos após a ingestão de quantidades não tóxicas, que perduram mesmo após a suspensão da ingestão do alimento, e consequente ação metabólica, contribuindo para a saúde física e para a diminuição de morbidades crônicas (BALDISSERA et al., 2011).

Durante a pandemia do novo coronavírus (SARS-CoV-2), causador da COVID-19, que atingiu todo o mundo nos últimos anos, houve um grande aumento pela procura de terapias que pudessem fortalecer o sistema imune e aumentar mecanismos antioxidantes que podem ajudar a proteger contra a COVID-19. Dentre esses suplementos estão derivados de plantas, vitaminas e minerais, alimentos probióticos, entre outros (GÜNALAN et al., 2021; HAN et al., 2020). Nesse contexto, o desenvolvimento de novos alimentos probióticos adicionados de ingredientes fontes de antioxidantes visa atender esta demanda atual dos consumidores que buscam tais produtos.

3.3 Proteases vegetais

Estando presentes em quase todos os tecidos vegetais, as proteases vegetais apresentam poder proteolítico e demonstram capacidade de coagular o leite em condições específicas. Proteases vegetais têm sido utilizadas na fabricação de queijo desde a antiguidade. As regiões que mais concentram produção de queijos feitos com proteases vegetais são as regiões do Mediterrâneo, países da África Ocidental e do sul da Europa (MANZOR; SHABIR; MOHD, 2013).

Proteases vegetais com poder de coagular o leite foram identificadas em diversos gêneros vegetais, como *Ananas*, *Calotropis*, *Opuntia*, *Cereus*, *Euphorbia*, *Ficus*, *Lactuca*, *Helianthus*, entre outros (EGITO et al., 2007).

A classificação das proteases vegetais se dá pela presença de resíduos de aminoácidos presentes na estrutura do sítio catalítico da enzima. Os tipos são cisteína, serina, aspártica e metaloprotease. A maioria das proteases vegetais, semelhante à quimosina, hidrolisam seletivamente a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ-caseína. Algumas proteases vegetais hidrolisam outros sítios, a exemplos da protease extraída de *Solanum dubium* que hidrolisa a ligação Ser₁₀₄-Phe₁₀₅ da κ-caseína bovina (NICOSIA et al., 2022).

Fguiri et al. (2021) conduziram um estudo utilizando extratos de kiwi, gengibre e abacaxi para avaliar a atividade coagulante das enzimas vegetais dessas plantas em leite de camela. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos de abacaxi e de kiwi geraram um maior rendimento da coalhada em comparação com a quimosina, enquanto que os extratos de gengibre e abacaxi demonstram maior poder proteolítico que a quimosina.

3.4 *Helianthus annuus*

Pertencente à família *Asteraceae*, a espécie *Helianthus annuus* L. (girassol) é originária do México, e tem grande participação na produção de óleo comestível, sendo considerada uma das quatro oleaginosas de maior produção de óleo no mundo. Também vem despertando o interesse dos setores farmacêutico, cosmético, de limpeza e tintas, além da sua grande importância na indústria alimentícia (TURCHETTO et al., 2021).

Tendo fácil adaptabilidade, o girassol é cultivado em todas as partes do Brasil, desde as regiões mais quentes acima da linha do equador, até as regiões mais frias ao sul do país. Apresenta muita resistência a estresse hídrico e altas temperaturas, além de ter uma alta eficiência no uso da água, o que lhe confere boa viabilidade como fonte de agregação de renda. A parte de maior interesse são as sementes, que concentram grande quantidade de óleo comestível além de diversos outros compostos (SILVA et al., 2022).

Diversos benefícios à saúde foram observados com o consumo das sementes e do óleo de girassol, entre eles: efeito antioxidante, anti-inflamatório, protetor cardiovascular, antiolesterol, anticâncer, antiasmático e antidiabético. Esses benefícios se dão principalmente à presença de constituintes nutricionais, que incluem lipídeos mono e poli-insaturados, tocoferóis, ferro, cobre, zinco, proteínas, fitosteróis, folato, e vitamina B (ADELEKE; BABALOLA, 2020).

Leverrier et al. (2019) conduziram um estudo onde foi avaliado o estado de saúde de pacientes obesos ao longo de 12 semanas de consumo de extrato de semente de girassol. Ao fim do estudo foi observado que o consumo do extrato foi responsável pela diminuição do índice de massa corpórea, circunferência abdominal e peso corporal, além do melhoramento dos índices lipídicos do sangue como colesterol e triglicérides.

3.5 Probióticos

Para manter o equilíbrio do trato gastrointestinal podem ser empregadas suplementações da dieta com probióticos, prebióticos e simbióticos, garantindo o desempenho normal de todas as funções fisiológicas do organismo (FERNANDES, 2016; SAAD, 2006; SILVA et al. 2022).

Os probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades ideais, conferem melhoramento do equilíbrio intestinal, trazendo benefícios à saúde do hospedeiro. Para tal, esses microrganismos devem sobreviver através das barreiras gastrointestinais em número suficiente, para que se tenha o efeito desejado à saúde (CASAROTTI; PENNA, 2015; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2006; NOBRE, 2015; HILL et al., 2014).

Os probióticos promovem os benefícios à saúde através de três efeitos: modulação do recebimento de respostas inflamatórias, efeitos diretos contra bactérias patogênicas e efeitos indiretos contra estas bactérias. A maioria dos probióticos pertencem à família *Lactobacillaceae* e ao gênero *Bifidobacterium*. Estes microrganismos são utilizados em diversos produtos como leite, sorvete, queijo, iogurte, formulações em gotas, em pó, entre outros (LALEMAN; TEUGHEL, 2015; ZHENG et al., 2020).

A ANVISA não determina, atualmente, uma quantidade mínima de microrganismos para a alegação de probiótico e, segundo esta autarquia nacional, o próprio pesquisador ou empresa deve definir a propriedade funcional, que será analisada com base nas definições da Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2019).

Vários fatores influenciam a concentração dos probióticos e a sobrevivência destes, como a matriz do alimento no qual foi adicionado, a adição de diferentes tipos de frutas e/ou diferentes ingredientes, a presença de outros microrganismos no produto, entre outros fatores (SANTO et al., 2011).

3.6 Culturas nativas

Nos últimos anos tecnologias sofisticadas tem sido cada vez mais empregadas no isolamento e identificação de cepas potencialmente probióticas. Entretanto, técnicas sofisticadas para a caracterização probiótica não são acessíveis para a maioria dos laboratórios devido a razões econômicas. Técnicas acessíveis são desejáveis para a triagem e isolamento de novos potenciais candidatos para a formulação de alimentos probióticos para o mercado local de países em desenvolvimento (SILVA et al., 2022; VINDEROLA et al., 2008).

A família *Lactobacillaceae* contém várias espécies potencialmente probióticas, incluindo *Limosilactobacillus mucosae*. Essa bactéria apresenta colonização eficiente no intestino devido a sua adesão ao muco gastrintestinal. *L. mucosae* apresenta capacidade de modular o sistema imunológico intestinal e inibir bactérias patogênicas o que a torna uma cepa valiosa no desenvolvimento de alimentos probióticos. A cepa *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 foi isolada de leite de cabra por um grupo de pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (MORAIS et al., 2022).

Os benefícios da cepa *L. mucosae* CNPC007 foram descritos em diversos estudos de alimentos contendo a cepa, entre eles: queijo de cabra (MORAES et al., 2018), iogurte grego (MORAIS et al., 2022), bebida láctea isenta de lactose com polpa de jambolão (DANTAS et al., 2022), bebida láctea não fermentada com casca de jabuticaba (SOUSA et al., 2021). Além dos benefícios descritos, a cepa não apresentou toxicidade *in vivo* quando incorporada em leite de cabra suplementado com inulina fermentado (PEREIRA et al., 2022).

Devido a recentes aperfeiçoamentos nas técnicas de sequenciamento genômico e também a uma base de dados genéticos cada vez mais completa, Zheng et al. (2020) propuseram a reclassificação taxonômica do gênero *Lactobacillus*. Foram propostos vinte e cinco gêneros, incluindo o gênero *Lactobacillus*, e outros como *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus* e *Limosilactobacillus*. Dessa forma, *Lactobacillus mucosae* passou a ser chamado de *Limosilactobacillus mucosae*. O termo genérico “lactobacilos” foi mantido para designar todos os organismos que foram classificados como *Lactobacillaceae*.

3.7 Sobrevivência das bactérias probióticas à passagem pelo trato gastrointestinal

A habilidade de resistir às condições adversas do trato gastrintestinal é uma das características vitais que um microrganismo probiótico precisa apresentar para que sobreviva e colonize o intestino do hospedeiro. O pH ácido do estômago e os sais biliares secretados no duodeno são os principais obstáculos para a sobrevivência dos microrganismos probiótico ingeridos junto com os alimentos (RANADHEERA et al., 2012).

A simulação dos meios gástrico e entérico é um dos ensaios realizados *in vitro* que são sugeridos para avaliar o potencial probiótico do microrganismo. A seleção do tipo de alimento que será utilizado como matriz alimentar é realizada com a ajuda dos resultados da simulação *in vitro* que verifica a tolerância do microrganismo ao sistema gastrintestinal, para aumentar as chances de sobrevivência e, com isso, a eficácia do probiótico (SCHILLINGER; GUIGAS; HOLZAPFEL, 2005).

Ingredientes vegetais podem se apresentar como matrizes desafiadoras para probióticos, alterando a viabilidade e sobrevivência probiótica, devido à presença de ácidos orgânicos e compostos fenólicos presentes nesses vegetais podem apresentar

efeito antimicrobiano. Contudo, o teor de compostos fenólicos presente nesses vegetais pode ajudar na sobrevivência de probióticos em alimentos e também exercer efeito prebiótico no intestino (RIBEIRO et al., 2020).

Alimentos lácteos demonstram efeito tamponante e, conseqüentemente, efeito protetor sobre as bactérias probióticas quando submetidas ao processo de digestão. Alguns ingredientes prebióticos também podem promover um ambiente favorável para os microrganismos probióticos, causando efeito protetor durante o armazenamento dos alimentos e durante a passagem pelo sistema gastrointestinal (GALDINO et al., 2021).

3.8 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com uma ou mais hidroxilas na sua estrutura. Apresentam diversas estruturas moleculares devido a sua grande variabilidade estrutural. São descritos mais de cinco mil compostos fenólicos, dentre os quais se destacam as cumarinas, flavonoides, taninos, tocoferóis, ácidos fenólicos entre outros (ANGELO; JORGE, 2007).

Possuem distribuição ampla na natureza, fazendo parte da constituição de diversas espécies vegetais, sendo produtos do metabolismo secundário que as plantas produzem como ferramentas de defesa. Os compostos fenólicos têm ação antioxidante pela sua capacidade de doar elétrons e hidrogênio e também pela ação dos seus radicais intermediários (SILVA et al., 2010).

Para obter informações sobre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos a quantificação do total de fenólicos se mostra de grande importância, trazendo também informações do potencial benéfico a saúde (SUCUPIRA, 2012).

Existem vários tipos de ensaios para avaliar a atividade antioxidante de moléculas com ação biológica, entre eles se destacam reações químicas com substratos contendo lipídeos e técnicas instrumentais (ALVES et al., 2010). A maioria desses ensaios se baseia na capacidade de absorção do radical oxigênio, em fotoquimioluminescência ou eliminar radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (MARECEK et al., 2017).

Através da deslocalização de um elétron desemparelhado, a DPPH é caracterizada como um radical livre estável, que também faz com que esse composto apresente coloração violeta, apresentando absorção em cerca de 520 nm quando em

solução etanólica. O ensaio consiste em medir a capacidade de uma determinada substância de sequestrar o radical DPPH reduzindo-o a hidrazina. Este processo faz com que o DPPH que apresenta coloração violeta mude de cor se tornando amarelo pálido. Além da concentração de antioxidante, o tempo de reação gasto para que haja o sequestro do radical também é necessário para avaliar a atividade antioxidante (ALVES et al., 2010; SANCHEZ-MORENO et al., 1998).

3.9 Proteólise em produtos lácteos

O processo de maturação dos queijos é essencial para que texturas e propriedades sensoriais adequadas possam ser desenvolvidas. Nesse contexto, a proteólise é um dos principais indicadores de maturação. Várias abordagens podem ser adotadas para monitorar o processo bioquímico que acontece nos queijos durante a maturação afim de evitar que ocorra proteólise excessiva, que pode causar gosto amargo nos queijos devido a formação de peptídeos de baixo peso molecular (SATO et al., 2012).

Durante o processo de maturação ocorrem diversas alterações bioquímicas nos queijos, alterando seus principais constituintes, entre eles proteínas, lipídeos, lactose residual. Alguns dos compostos encontrados em queijos maturados incluem: peptídeos, aminoácidos, lactonas, ácidos orgânicos, metil cetonas, álcoois e aminas, que são responsáveis por características referentes ao sabor e aroma dos queijos (COSTA JUNIOR et al., 2009; GONÇALVES; CARDARELLI, 2021).

Para acelerar ou melhorar a maturação dos queijos e conseqüentemente o desenvolvimento de sabor, culturas bacterianas podem ser adicionadas no processo de fabricação para alterar as características dos queijos através de proteólise secundária. De modo geral, a adição de culturas é responsável pela redução do sabor amargo e pelo aumento da concentração de peptídeos de sabor desejável e precursores de sabor (BARROS et al., 2006).

Alguns dos métodos utilizados para avaliar a proteólise em queijos são análise da extensão da proteólise através da quantificação de nitrogênio solúvel, análise da extensão da proteólise pela quantificação de ácido tricloroacético, eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência (DE RENSIS; PETENATE; VIOTTO, 2009; EGITO et al., 2007; PEREIRA et al., 2019; SANTOS et al., 2019).

4 METODOLOGIA

4.1 Local de desenvolvimento da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida, em sua maior parte, no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), havendo etapas também realizadas no Laboratório de Ecologia Aquática (LEAQ) e no Laboratório de Bioquímica, ambos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da mesma instituição, e no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

4.2 Extrato das sementes de *Helianthus annuus* (girassol)

O extrato foi preparado utilizando sementes de *Helianthus annuus* compradas no comércio local de Campina Grande – PB. As sementes foram colocadas de molho em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 1 hora. Após esse período as sementes foram enxaguadas com água destilada para retirar o excesso de hipoclorito de sódio. As sementes de girassol sanitizadas (1,2 kg) foram trituradas em liquidificador até obter-se uma massa homogênea. A essa massa foi adicionado 1,5 L de solução salina 1%. A mistura foi homogeneizada e posteriormente mantida em refrigeração por 24 horas a 5°C. Após esse período, o líquido foi extraído por método de expressão utilizando-se uma prensa para queijos. O extrato foi acondicionado em frascos e congelados a -18°C (EGITO et al., 2007).

4.3 Análise da atividade coagulante do extrato

Para o ensaio da atividade coagulante foram utilizados tubos de ensaio contendo 1 ml de leite com cloreto de cálcio 0,025 g/L, onde foram adicionadas quantidades variadas de extrato em cada um dos tubos, partindo de uma concentração mais alta para concentrações mais baixas. Utilizou-se as quantidades de 500 µL, 450 µL, 400 µL, 350 µL, 300 µL, 250 µL, 200 µL, 150 µL, 100 µL, 90 µL, 80 µL, 70 µL, 60 µL, 50 µL, 40 µL, 30 µL e 20 µL. Os tubos contendo o leite e o extrato foram levados para banho maria a 37°C e foram analisados ao longo do tempo, de 5

em 5 minutos, inclinando-se os tubos para verificar se houve ou não coagulação do leite (ARIMA, 1967).

4.4 Ativação da cepa liofilizada

Foi empregada a metodologia descrita por Barcelos (2017), com algumas modificações. Foi utilizada a cepa de *L. mucosae* CNPC007 disponibilizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A cepa liofilizada foi colocada em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS, HiMedia). Em seguida os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (primeira ativação). Após esse período, um novo cultivo foi realizado transferindo-se 100 µL do conteúdo dos tubos incubados (primeira ativação) para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS, que foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas (segunda ativação).

Os tubos foram centrifugados a 3018 × *g* por 10 minutos. O *pellet* obtido foi lavado com 10 mL de solução salina 0,85% e esse processo se repetiu três vezes para a obtenção dos pellets que foram utilizados no processo de fabricação dos queijos.

4.5 Produção do lote piloto

Foram realizados três lotes piloto de fabricação do queijo. Para o queijo controle utilizou-se 5 litros de leite de cabra pasteurizado provenientes da Associação Gestora da Usina de Beneficiamento de Lácteos (AGUBEL), localizada em Sumé – PB, que foram aquecidos a 37°C e adicionados de 220 mL de extrato de semente de girassol e 1,25 g de cloreto de cálcio. A coagulação do leite ocorreu depois de aproximadamente 1 hora da adição do extrato. A massa coagulada foi então cortada em cubos de aproximadamente 1cm³ para que houvesse a separação do soro. Foram utilizados 45 g de sal dissolvidos em aproximadamente 2 litros de soro, que ficaram em contato com a massa coagulada por 15 minutos, para a realização da salga. O soro foi retirado conforme a massa coagulada era quebrada e sedimentava no fundo do recipiente. Depois de dessorada, a massa coagulada foi então enformada e prensada durante 24 horas, utilizando prensa para queijos artesanais. Após esse período os queijos foram desenformados e colocados sob refrigeração em

temperatura de 8°C durante 48 horas para que maturassem. Após a maturação os queijos foram embalados à vácuo e armazenados sob refrigeração a 6°C. Para o queijo com a bactéria probiótica foi empregado o mesmo processo, porém foram adicionados 5 *pellets* da cepa *L. mucosae* CNPC007 ao leite antes da adição do extrato de semente de girassol.

4.6 Produção dos lotes definitivos

Foram produzidos dois tratamentos, um contendo a cepa nativa potencialmente probiótica de *L. mucosae* CNPC007 que foi denominado de “M”, e o outro controle, que foi produzido sem a cepa e que foi denominado de “C”. Foram produzidos três lotes de ambos os tratamentos (triplicatas independentes). Os lotes do tratamento contendo a cepa potencialmente probiótica foram nomeados de M1, M2 e M3, e os lotes do tratamento controle, produzidos sem a cepa potencialmente probiótica, foram nomeados de C1, C2 e C3. Para o queijo controle utilizou-se 7,5 litros de leite de cabra que foram pasteurizados a 65°C por 15 minutos e depois resfriados a 37°C. O leite foi proveniente de produtores locais da cidade de Soledade – PB. Quando o leite atingiu a temperatura de 37°C, 330 mL de extrato de semente de girassol e 1,875 g de cloreto de cálcio foram adicionados. A coagulação do leite ocorreu depois de aproximadamente 1 hora da adição do extrato. A massa coagulada foi cortada em cubos de aproximadamente 1 cm³ para que houvesse a separação do soro. O soro foi retirado conforme a massa coagulada era quebrada e sedimentava no fundo do recipiente. Foram utilizados 67,5 g de sal dissolvidos em aproximadamente 2 litros de soro, que ficaram em contato com a massa coagulada por 15 minutos, para que fosse feita a salga. Depois de dessorada, a massa coagulada foi enformada e prensada durante 24 horas, utilizando prensa para queijos artesanais (Zatti Indústria Ltda.), a qual foi adaptada para a prensagem simultânea de quatro formas plásticas com capacidade para 250-300 g de queijo, cada. Após esse período os queijos foram desenformados e colocados sob refrigeração em temperatura de 8°C durante 48 horas para que maturassem. Após a maturação os queijos foram embalados à vácuo e armazenados sob refrigeração a 6°C. Para o queijo com a cepa potencialmente probiótica, o mesmo processo foi realizado, porém foram adicionados 5 *pellets* da cepa CNPC007 ao leite antes da adição do extrato de semente de girassol. Cada lote

de cada tratamento foi analisado no dia 1 (dia em que o lote ficou pronto para embalar) e após 30 e 60 dias de armazenamento.

4.7 Análise da composição centesimal e acidez titulável

Os leites e queijos dos tratamentos controle (“C”) e probiótico com *L. mucosae* (“M”) foram avaliados quanto aos teores de umidade e de sólidos totais (após secagem total das amostras em estufa a vácuo), cinzas (após queima de toda a matéria orgânica das amostras) e gorduras (pelo método de Gerber), além da acidez titulável, todas estas análises segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Também foram determinados o teor de proteínas (pelo método de micro Kjeldahl) (AOAC INTERNATIONAL, 2005) e o total de carboidratos pela diferença dos outros componentes em 100g de amostra (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2003).

Para a análise dos teores de umidade e de sólidos totais foram pesados 2 g de amostra em cadinhos de porcelana tarados que foram colocados em estufa à vácuo a 70°C por 24 horas. Após esse período, os cadinhos foram pesados.

Para a análise de cinzas foram pesados 2 g de amostra em cadinhos de porcelana calcinados que foram pré-incinerados com as amostras em chama e então colocados em mufla a 550°C por 4 horas. Após esse período, os cadinhos foram pesados.

A análise de acidez titulável foi realizada pesando-se 10 g de amostra que foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. O balão volumétrico foi então preenchido com álcool etílico 95% até a aferição no menisco. O balão foi agitado e deixado em repouso por 6 horas. Após esse período, o conteúdo do balão foi filtrado utilizando-se papel filtro. Alíquotas de 10 ml do filtrado foram utilizadas na titulação, empregando-se solução de hidróxido de sódio 0,01 N como solução titulante e fenolftaleína 0,1% como indicador. O volume gasto na titulação foi marcado após o ponto de virada da titulação.

Para a análise de gordura pelo método de Gerber, 1 g de amostra foi pesado em béquer de 100 mL, onde foram adicionados 5 ml de ácido sulfúrico ($d=1,86 \text{ g/cm}^3$). O béquer foi então levado a aquecimento até a completa dissolução da amostra. O conteúdo do béquer foi então transferido para um butirômetro de leite. Esse processo

foi repetido até que 20 ml de ácido sulfúrico fosse adicionado ao butirômetro. Uma alíquota de 1 mL de álcool isoamílico foi então adicionada ao butirômetro, que foi logo após arrolhado e agitado até completa mistura. O butirômetro foi levado a um banho maria a 65°C por 15 minutos e, posteriormente, centrifugado por 10 minutos. Por fim foi lida a quantidade de gordura marcada na escala do butirômetro.

4.8 Análise da viabilidade do probiótico

Especificamente para os queijos do tratamento “M”, a viabilidade do probiótico foi avaliada durante o período de armazenamento dos queijos. As populações de *L. mucosae* foram determinadas pela técnica de "*pour-plating*", onde 25 g de amostra foram transferidos assepticamente para 225 ml de água peptonada e essa mistura foi submetida a diluições seriadas com o mesmo diluente. Em seguida, 1 mL das diluições foi colocado em placas de Petri, onde foram adicionados 20 mL de ágar De Man Rogosa Sharpe (MRS, HiMedia) acidificado a pH 5,4. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e foram contadas as colônias características (BURITI et al., 2014).

4.9 Resistência do probiótico às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

A avaliação da resistência da cepa de *L. mucosae* às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* para os queijos do tratamento “M” foi feita utilizando a metodologia descrita por Buriti et al. (2010) e Galdino et al. (2021). Foram utilizados 25 g de amostras dos queijos que foram diluídos em 225 mL de solução de cloreto de sódio a 0,5%. Alíquotas de 10 mL da diluição foram então distribuídos em frascos de Erlenmeyer. Foi então adicionado 0,3 mL de solução de ácido clorídrico 1 N e as enzimas pepsina de mucosa suína (Sigma, EUA, 0,1 mL) e lipase (Amano lipase F-AP15, de *Rhizopus oryzae*, Sigma, 0,01 mL) que foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio 0,5%, totalizando 11,4 mL de solução (3,07 g/L de pepsina; 0,9 mg/L de lipase) que apresentou pH entre 1,5 e 2,0. As soluções foram incubadas a 37±1°C por 2 horas sob agitação (150 rpm). Posteriormente foram adicionados 0,17 ml de solução de cloreto de sódio 0,5% e 2 ml de solução de fosfato de sódio pH 12 (NaH₂PO₄·2H₂O, 14 g; NaOH 1 N 150 ml; H₂O destilada qsp 1 L) contendo as enzimas bile (Bile bovina, Sigma, 0,1017 g) e pancreatina (Pancreatina de pâncreas suíno,

Sigma, 0,0101 g), totalizando um volume de 13,57 mL (9,53 g/L de bile e 0,953 g/L de pancreatina) que ficou com pH entre 4,7 e 5,8. As soluções foram novamente incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ e agitadas a 150 rpm por 2 horas. Após 4 horas do início do ensaio, foi adicionado 1 mL de solução de fosfato de sódio pH 12 contendo as enzimas bile (0,1448 g) e pancreatina (0,0145 g), totalizando um volume final de 14,57 mL (9,57 g/L de bile e 0,9570 g/L de pancreatina), que apresentou pH entre 6,2 e 6,7, sendo por fim incubado a $37\pm 1^\circ\text{C}$ e agitado a 150 rpm por 2 horas, totalizando 6 horas de ensaio. Alíquotas das soluções foram retiradas após 30 minutos, 2 horas, 4 horas e 6 horas do ensaio *in vitro*, as quais foram diluídas em série e despejadas em placas de Petri. Posteriormente, foi adicionado ágar MRS com pH 5,4 às placas, que foram incubadas por 48 horas. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.10 Análise de contaminantes

Os queijos produzidos em ambos os tratamentos, “C” e “M”, foram analisados quanto à presença de contaminantes microbiológicos seguindo a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de acordo com a sua classificação quanto ao teor de umidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019).

4.10.1 Determinação da presença de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*

Alíquotas dos queijos (25 g) foram diluídas em água peptonada inicialmente na proporção de 1:10, a partir da qual foram preparadas diluições sequenciais até se obter a diluição 10^{-3} .

Na etapa presuntiva, alíquotas de cada diluição obtida foram adicionadas em triplicata a tubos contendo 10 mL de caldo lauril-triptose (Kasvi) e tubos de Durhan invertidos. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. Considerou-se resultados positivo os tubos de Durhan que apresentaram gás no seu interior.

Na etapa confirmativa de coliformes totais, os tubos considerados positivos da etapa presuntiva foram repicados para tubos contendo 10 mL do meio de cultura caldo verde-brilhante-bile-lactose (Kasvi) e tubos de Durhan invertidos. Os tubos foram

incubados a 35°C por 24 horas. Considerou-se resultados positivo os tubos de Durhan que apresentaram gás no seu interior.

Na etapa confirmativa de coliformes termotolerantes, os tubos considerados positivos da etapa presuntiva foram repicados para tubos com 10 mL de meio de cultura caldo EC (Kasvi) contendo tubos de Durhan invertidos, que foram incubados a 45°C por 24 horas.

A análise de *Escherichia coli* é realizada apenas se houver presença de caldos EC positivos, realizando-se repique desses conteúdos em caldo lauril sulfato contendo discos ColiComplete (Millipore) por, no mínimo, 28 h. A positividade para *E. coli* é determinada pela produção de reação azul fluorescente quando observada em luz ultravioleta.

4.10.2 Determinação da presença de *Staphylococcus* sp.

Foram utilizados 100 µL da diluição 10^{-2} que foram colocados em placas de Petri contendo ágar manitol salgado (Kasvi), sendo posteriormente espalhados na superfície do meio utilizando-se uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas.

4.10.3 Determinação de presença de *Salmonella* sp.

Foram pesados 25 g de amostra que foram diluídos em 225 mL de água peptonada a fim de se obter a diluição 10^{-1} . A diluição foi incubada a 35°C por 24 horas para enriquecimento. Utilizando-se uma alça de platina foi retirada uma alíquota da amostra enriquecida e estriada em placas de Petri contendo Meio Diferencial Para *Salmonella* sp. RajHans (HiMedia). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

4.11 Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

4.11.1 Preparo das amostras

Foi utilizada a metodologia descrita por Dantas et al. (2022) com modificações. As amostras de queijo do lote 2 de ambos os tratamentos, “C” e “M”, foram pesadas na quantidade de 2 g, misturadas a 6 mL de metanol acidificado e mantidas em

temperatura de refrigeração de 5°C durante a noite. As misturas refrigeradas foram centrifugadas a 12000 × g por 5 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo 5810R, Eppendorf). O resíduo foi lavado com metanol acidificado, havendo repetição do procedimento por duas vezes. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para as análises.

4.11.2 Determinação de compostos fenólicos totais

A análise foi realizada com o reagente de Folin Ciocalteu (Sigma) e ácido gálico (Vetec) como padrão segundo o método de Santos et al. (2017) com modificações. Alíquotas de 60 µL de cada sobrenadante, 2.340 µL de água destilada e 150 µL de reagente de Folin Ciocalteu foram transferidos para tubos de ensaio e homogeneizados. Após 8 minutos, 450 µL de solução Na₂CO₃ (30 g, 100 mL) foram adicionado aos tubos, os quais foram homogeneizados e mantidos no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida 750 nm em espectrofotômetro e um ensaio de calibração foi preparado utilizando ácido gálico para obter a equação. Os resultados foram expressos como mg de equivalente de ácido gálico (mg Eq AG)/g de amostra. As amostras foram analisadas em triplicata.

4.11.3 Determinação da atividade antioxidante por DPPH

A análise foi realizada através da atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), utilizando-se a metodologia adaptada de Rufino et al. (2007). Diferentes alíquotas dos extratos das amostras de queijo (50 µL, 100 µL e 200 µL) foram misturadas com DPPH (Sigma), em solução 100 µM, para um volume total de 3 mL. O decréscimo da absorbância em 517 nm foi medido após 60 min de manutenção das amostras em temperatura ambiente. Os resultados obtidos foram expressos em percentual (%) de inibição de DPPH, seguindo a equação:

$$\% \text{ de inibição de DPPH} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

onde A_c é absorvância do controle (absorvância da solução de DPPH sem o extrato das amostras) e A_s é a absorvância com o extrato das amostras.

A quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração inicial do DPPH em 50% foi calculada após construir o percentual de inibição pela curva da concentração do extrato. O resultado final da capacidade antioxidante total foi expresso em g de amostra / mg de DPPH.

4.12 Análise proteolítica por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil proteico dos queijos dos tratamentos “C” e “M” ao longo do armazenamento para a avaliação de sua proteólise foi determinado a partir da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). O sistema SDS-PAGE-2 β -mercaptoetanol descrito por Laemmli (1970) foi adaptado para uma unidade vertical para géis grandes de 18 x 16 cm (SE600, GE Healthcare), conforme as informações descritas nas próximas seções.

4.12.1 Preparo de soluções

4.12.1.1 Solução de acrilamida

Para o preparo da solução estoque de acrilamida, foram dissolvidos 36,6 g de acrilamida e 1 g de bis-acrilamida completando o volume para 100 mL de água destilada.

4.12.1.2 Tampão do gel de separação

O tampão do gel de separação foi preparado diluindo-se 18,15 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano em 50 mL de água destilada, com ajuste do pH para 8,8 com HCl 0,1 M e, posteriormente, completando o volume para 100 mL com água destilada.

4.12.1.3 Tampão do gel de concentração

O tampão do gel de concentração foi preparado diluindo-se 6 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano em 50 mL de água destilada, com ajuste do pH para 6,8 com HCl 0,1 M e, posteriormente, completando o volume para 100 mL com água destilada.

4.12.1.4 Tampão de corrida

Foram preparados 5 litros de tampão de corrida de forma a garantir volume suficiente para encher a cuba e lavar os poços dos géis antes da injeção das amostras. Em um béquer de 2 litros foram dissolvidos 30 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano, 144,38 g de glicina e 5 g de dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS foi adicionado lentamente devido a formação de espuma característica do produto. Uma vez homogeneizada, a solução foi cuidadosamente transferida para balão de 5 litros e o volume completado com água destilada. A solução foi armazenada sob refrigeração até o momento do uso.

4.12.1.5 Solução SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10%

Foram dissolvidos 10 g de SDS em 100 mL de água destilada, armazenado em temperatura ambiente até o momento do uso.

4.12.1.6 Catalisador

O persulfato de amônio, utilizado como catalisador no processo de polimerização dos géis de separação e concentração, foi preparado no momento do uso, diluindo em um microtubo tipo Eppendorf (1,5 mL) 0,05 g de persulfato de amônio em 1000 µL de água destilada, homogeneizando a solução em agitador de tubos tipo vórtex.

4.12.1.7 Tampão de amostra

O tampão de amostra foi preparado em tubo Falcon com a combinação de 5 mL de tampão de concentração, 2 mL de SDS10%, 0,5 mL de 2-mercaptoetanol e 2,5 mL de água destilada, misturando em vórtex para completa homogeneização. O

volume final desta mistura (10 mL) é suficiente para o preparo de 12 amostras (800 µL/amostra) e, portanto, houve necessidade de duplicar os valores acima para atender a quantidade de amostras deste trabalho.

4.12.1.8 Glicerol com azul de bromofenol

Esta solução foi utilizada no preparo das amostras. Para isto, pesou-se 0,05 g de azul de bromofenol que foi dissolvido em 30 ml de água destilada. Posteriormente foi adicionado 50 ml de glicerol e o volume foi completado com água destilada para 100 ml em balão volumétrico.

4.12.1.9 Solução 5% de Coomassie Blue G-250

O corante Coomassie Blue é utilizado na etapa de coloração do gel. A solução 5% de Coomassie Blue G-250 foi preparada diluindo-se 5 g do corante em 10 ml de água destilada.

4.12.1.10 Solução Estoque Coomassie Blue G-250

Foram dissolvidos 50 g de sulfato de amônio em 200 ml de água destilada. Posteriormente foram adicionados 6 ml de ácido fosfórico 85% e 10 ml de solução de Coomassie Blue G-250 e completou-se o volume para 500 ml com água destilada. A solução estoque foi armazenada em geladeira até o momento do uso.

4.12.1.11 Solução de trabalho

Preparada no momento do uso com a mistura de 400 ml da solução estoque de Coomassie Blue G-250 e 100 ml de etanol.

4.12.2 Preparo das amostras

Alíquotas de 0,002 g dos queijos foram pesados em microtubo tipo Eppendorf, onde foram adicionados 800 µL do tampão de amostra. Os microtubos foram agitados em vórtex até completa dissolução e aquecidos a 100°C por 3 minutos. Após

esfriarem, foram adicionados 200 μ L da solução de azul de bromofenol. Homogeneizados novamente e armazenados em freezer -20°C até o momento do uso.

O padrão de peso molecular Marcador Sigmamarker 6.500 - 200.000 Da (Sigma-Aldrich) utilizado foi preparado conforme as instruções de referência do fabricante.

4.12.3 Preparo dos géis

Para melhor aplicação das amostras foram preparadas duas placas para polimerização dos géis utilizando pentes de 15 poços, cada.

Após a montagem das placas, procedeu-se o preparo do gel de separação 15%. Em um béquer foram adicionados 24,6 mL de solução de acrilamida; 15 mL de tampão de separação; 600 μ L de SDS 10%; 19,2 mL de água; 200 μ L de catalisador e, por último 60 μ L de tetrametiletenodiamina (TEMED). Em seguida, com auxílio de uma pipeta de 5 mL as placas foram cuidadosamente preenchidas até a altura onde deverá iniciar o gel de concentração (cerca de 1cm abaixo do pente).

Após a aplicação do gel de separação, preencheu-se o espaço superior da placa com água destilada para a percepção da polimerização. Após 40 minutos, percebendo-se a linha de separação entre o gel polimerizado e a água, verteu-se a água para iniciar o processo de preparo do gel de concentração.

Para o preparo do gel de concentração (5%), os pentes foram cuidadosamente colocados entre as placas e, posteriormente, em um béquer foram adicionados 2,6 mL de solução de acrilamida; 5 mL de tampão de concentração; 200 μ L de SDS 10%; 11,6 mL de água; 200 μ L de catalisador e, por último 20 μ L de TEMED. Em seguida, com auxílio de uma pipeta de 5 mL as placas foram preenchidas até a borda superior da placa.

Após a polimerização do gel de concentração, retirou-se cuidadosamente os pentes dos géis, preenchendo os poços com tampão de corrida.

4.12.4 Corrida eletroforética

Para proceder a corrida eletroforética, aplicou-se 30 μ L da amostra e 10 μ L do padrão em poços previamente mapeados. Em seguida posicionou-se o suporte dos géis na cuba, preenchendo-a totalmente com tampão de corrida.

Para dois géis grandes, utilizou-se as seguintes condições eletroforética: 120 mA, 500V e 60W.

A corrida teve duração de 2 horas e 48 minutos. Em seguida, retirou-se os géis das placas, imergindo-os em solução de fixação (sob agitação) por meia hora. Após este período de tempo, a solução de fixação foi descartada e os géis foram imersos em solução de trabalho Coomassie Blue G-250 por uma noite.

No dia seguinte, procedeu-se a lavagem dos géis com água morna e, posteriormente, a imersão dos mesmos em solução descorante, com troca a cada 40-50 minutos para clareamento dos géis e observação das bandas

4.13 Análise estatística

Para verificar a homogeneidade dos dados foi utilizado o teste de Levene. A comparação das médias dos dados obtidos ao longo do tempo de armazenamento dos queijos foi realizada através do teste não-paramétrico de Friedman, considerando $p < 0,05$. Havendo diferença significativa, os dados foram submetidos ao teste de Wilcoxon para análise dos contrastes. A comparação dos dados entre os tratamentos em um mesmo período de armazenamento foi realizada através do teste de Mann-Whitney U. Os dados foram analisados através do Software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa).

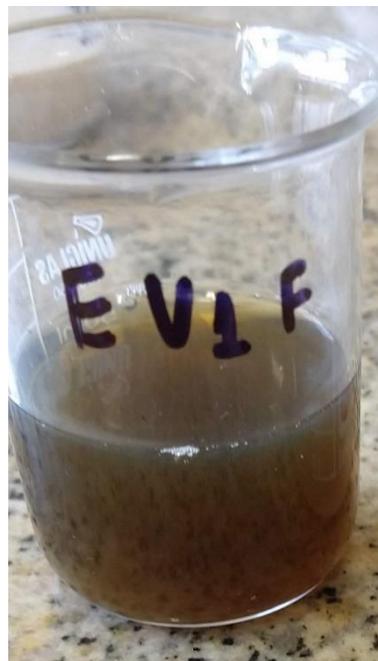
Para a análise estatística da resistência de *L. mucosae* às condições gastrointestinais simuladas através do ensaio *in vitro*, foi realizado o teste binomial exato (CONOVER, 2001) com a hipótese nula (H_0) de que a proporção de sobrevivência acima de 6 log UFC/g ao longo do ensaio deveria ser de, pelo menos, 25%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extrato das sementes de *Helianthus annuus* (girassol)

Os extratos produzidos apresentaram-se fluídos, levemente opacos, com coloração amarronzada conforme apresentado na Figura 1. Após serem congelados e descongelados para uso, as características foram mantidas.

Figura 1 – Extrato de sementes de girassol



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.2 Análise da atividade coagulante do extrato

A atividade coagulante do extrato mostrou-se satisfatória conforme mostra a Figura 2. O tubo contendo 1 mL de leite e 500 μ L coagulou após decorridos 20 minutos da adição do extrato, e o tubo contendo 40 μ L coagulou após 1 hora da adição do extrato. O tubo contendo 40 μ L foi utilizado como parâmetro para definir a quantidade de extrato que seria utilizada para a coagulação do leite na produção dos queijos. O extrato manteve sua atividade coagulante mesmo após ter sido congelado e descongelado.

Figura 2 – Teste de coagulação



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.3 Produção do lote piloto

A coagulação do leite na produção dos lotes piloto ocorreu após cerca de 1 hora da adição do extrato. Cada lote rendeu 2 queijos de aproximadamente 260 g cada, conforme mostra a Figura 3. Uma vez que nesta etapa foram utilizados 5 litros de leite para cada lote, o rendimento dos queijos dos ensaios pilotos foi de 10,4%.

Figura 3 – Queijos do lote piloto



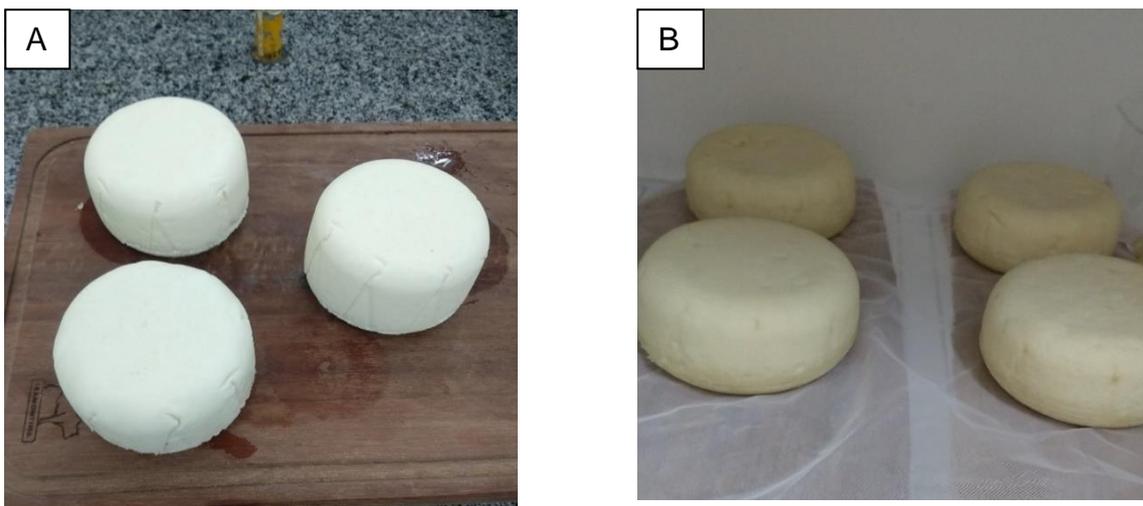
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Nota: A = Queijos antes da secagem. B = Queijos depois da secagem.

5.4 Produção dos lotes definitivos

A coagulação do leite na produção dos lotes definitivos ocorreu após cerca de 1 hora e 20 minutos da adição do extrato. Cada lote de cada tratamento rendeu 3 queijos de aproximadamente 270 g cada, conforme mostra a Figura 4. Uma vez que foram utilizados 7,5 litros de leite para cada lote desta etapa, o rendimento dos queijos dos ensaios definitivos foi de 10,8%. Dentro de cada lote de cada tratamento, um dos queijos (D1) foi escolhido para ser analisado no primeiro dia de armazenamento, e os outros queijos (D30 e D60) aos 30 e 60 dias de armazenamento, respectivamente. Durante a estocagem, foi observado que os queijos do tratamento controle apresentaram certa cremosidade quando atingiram 30 dias de armazenamento. Esse comportamento foi revertido parcialmente quando os queijos atingiram 60 dias. Essa característica foi observada em menor intensidade nos queijos M. Uma vez que não foi possível neste estudo realizar medições instrumentais que confirmassem tais resultados, recomenda-se que o perfil de textura dessas formulações de queijo seja investigado em trabalhos futuros.

Figura 4 – Queijos do lote definitivo



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Nota: A = Queijos antes da secagem. B = Queijos depois da secagem.

5.5 Análise de composição centesimal e acidez titulável

As análises para definir a composição centesimal foram realizadas nos leites utilizados para a produção dos lotes definitivos e os resultados estão apresentados como a média dos resultados \pm desvio-padrão na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal dos leites utilizados nos lotes definitivos

Leite	Componente (g/100 g)				
	Sólidos Totais	Cinzas	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos
Lotes C	13,37 \pm 0,13	0,80 \pm 0,036	2,98 \pm 0,58	4,57 \pm 0,024	5,04 \pm 0,53
Lotes M	13,25 \pm 0,047	0,84 \pm 0,004	3,27 \pm 0,099	4,55 \pm 0,024	4,63 \pm 0,17

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

As análises para definir a composição centesimal dos queijos foram feitas em cada um dos 6 lotes definitivos e os resultados estão apresentados como porcentagem (%) na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição centesimal dos lotes dos tratamentos C e M definitivos

Lote	Componente (g/100 g)				
	Sólidos Totais	Cinzas	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos
C1	50,04 \pm 2,13	3,50 \pm 0,021	21,97 \pm 1,18	23,96 \pm 1,49	7,02 \pm 8,09
C2	55,29 \pm 1,62	3,75 \pm 0,18	20,62 \pm 2,35	21,13 \pm 1,24	11,13 \pm 3,36
C3	52,61 \pm 1,89	3,99 \pm 0,078	17,34 \pm 2,02	20,26 \pm 0,62	11,40 \pm 4,37
Média	52.65 \pm 2.80 ^A	3.74 \pm 0.23 ^A	19.09 \pm 2.69 ^A	21.79 \pm 1.96 ^A	9.85 \pm 5.34 ^A
M1	52,66 \pm 1,68	3,35 \pm 0,23	17,87 \pm 2,29	22,36 \pm 1,89	10,21 \pm 3,31
M2	52,19 \pm 0,95	3,73 \pm 0,09	17,55 \pm 1,61	21,69 \pm 0,80	14,37 \pm 8,02
M3	53,74 \pm 1,44	3,98 \pm 0,33	18,12 \pm 0,39	24,08 \pm 1,29	7,58 \pm 0,96
Média	52.86 \pm 1.39 ^A	3.65 \pm 0.38 ^A	17.49 \pm 1.50 ^A	22.72 \pm 1.62 ^A	10.72 \pm 5.28 ^A

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: ^A = Letras maiúsculas iguais sobrescritas em uma coluna para um mesmo parâmetro denota que os tratamentos não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros analisados. A quantidade de cinzas em todos os lotes variou entre 3,35% e 3,99%. Esse valor alto do teor de cinzas pode ser explicado pela composição

do extrato utilizado na fabricação dos queijos que contém solução salina na composição e também pelo cloreto de sódio adicionado para salgar os queijos. Os queijos produzidos apresentaram teor proteico entre 17% e 21%, sendo classificados como fonte de proteínas segundo a Instrução Normativa 75 de 2020 da ANVISA que determina o mínimo de 10% para alimento fonte desse nutriente. O teor de gordura apresentou valores entre 20,26% e 24,08% (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020).

Serra et al. (2020) conduziram um estudo em que foram produzidos queijos utilizando leite de búfalo e de ovelha, e suco de kiwi como coagulante, onde observou-se valores de cinzas entre 1,27% e 1,69%, e de lipídeos entre 27,40% e 27,55%.

A umidade e a acidez titulável dos queijos foram analisadas durante todo o período de armazenamento a fim de se obter dados referentes à perda de umidade desses produtos dentro das embalagens e um possível aumento da acidez referente à presença de *L. mucosae*. Os resultados de umidade estão apresentados na Tabela 3 como porcentagem (%) e os resultados de acidez estão apresentados na Tabela 4 como g de ácido láctico/100 g de amostra.

Tabela 3 – Valores de umidade durante os tempos de armazenamento de 1, 30 e 60 dias dos queijos (D1, D30 e D60, respectivamente)

Lote	Umidade (g/100 g)		
	D1	D30	D60
C1	51,97 ± 0,48	50,16 ± 1,16	47,72 ± 1,05
C2	42,83 ± 1,48	45,56 ± 0,47	45,72 ± 0,71
C3	45,72 ± 0,71	47,32 ± 0,76	49,30 ± 0,72
Média	46,78 ± 4,16 ^{Aa}	47,68 ± 2,14 ^{Ab}	47,59 ± 1,72 ^{Ab}
M1	48,88 ± 0,98	45,55 ± 3,8	47,59 ± 0,34
M2	46,72 ± 2,65	48,33 ± 2,53	48,38 ± 0,27
M3	44,59 ± 2,56	47,04 ± 0,53	47,13 ± 0,36
Média	46,73 ± 2,66 ^{Aa}	46,98 ± 2,62 ^{Aa}	47,70 ± 0,62 ^{Ab}

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: ^A = Letra maiúscula igual sobrescrita em uma coluna denotam que os tratamentos não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).

^{a, b} = Letras minúsculas sobrescritas diferentes em uma linha denotam que os tempos de armazenamento diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$).

Com base nos resultados de umidade do primeiro dia de armazenamento, os lotes C1, M1 e M2 foram classificados como de alta umidade, enquanto os lotes C2, C3 e M3 foram classificados como de média umidade segundo a Portaria Nº 146, DE 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a qual estabelece o limite máximo de umidade de 45,9% para este segundo grupo de queijos (BRASIL, 1996). Quando consideradas as médias dos lotes de todos os tratamentos em todos os períodos de armazenamento, os queijos são classificados como de alta umidade por apresentarem teor entre 46% e 54,9% (BRASIL, 1996).

Nos lotes do tratamento C foi observada diferença significativa quanto à umidade entre os dias 1 e 30 de armazenamento ($p < 0,05$), não havendo diferença entre os dias 30 e 60 ($p > 0,05$). Nos lotes do tratamento M não houve diferença significativa da umidade entre os dias 1 e 30 de armazenamento ($p > 0,05$), mas observou-se diferença significativa entre o dia 60 e os demais tempos de estocagem ($p < 0,05$).

Quanto à acidez, todos os queijos apresentaram aumento desse parâmetro durante o armazenamento (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de acidez titulável durante os tempos de armazenamento de 1, 30 e 60 dias dos queijos (D1, D30 e D60, respectivamente)

Lote	Acidez titulável (g de ácido láctico/100 g)		
	D1	D30	D60
C1	0,41 ± 0,05	0,58 ± 0,05	1,23 ± 0,04
C2	0,29 ± 0,05	0,59 ± 0,05	0,83 ± 0,18
C3	0,46 ± 0,1	0,62 ± 0	0,83 ± 0,05
Média	0,39 ± 0,097 ^{Aa}	0,60 ± 0,040 ^{Aa}	0,97 ± 0,23 ^{Aa}
M1	0,47 ± 0,05	0,84 ± 0,08	1,79 ± 0,05
M2	0,47 ± 0,05	0,63 ± 0,04	1,75 ± 0,10
M3	0,55 ± 0,04	1,63 ± 0,05	1,85 ± 0,05
Média	0,50 ± 0,059 ^{Aa}	1,04 ± 0,46 ^{Bb}	1,80 ± 0,077 ^{Bb}

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: ^{A, B} = Letras maiúsculas sobrescritas diferentes em uma coluna denotam que os tratamentos diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$).

^{a, b} = Letras minúsculas sobrescritas diferentes em uma linha denotam que os tempos de armazenamento diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$).

Observa-se que os queijos do tratamento M, contendo *L. mucosae*, apresentam acidez levemente mais alta que os queijos controle já no primeiro dia de armazenamento. Essa diferença de acidez entre os queijos dos tratamentos M e C acentua-se no último dia de armazenamento. Esse fenômeno pode ser explicado pelo comportamento fermentativo da cultura *L. mucosae* que pode ter produzido ácido láctico a partir da lactose presente nos queijos. No estudo de Galdino et al. (2021), a cepa *L. mucosae* CNPC007 foi a cultura nativa que produziu maior teor de ácido láctico em leite fermentado em todos os tempos de fermentação estudados quando utilizada como monocultura.

Com base dos dados apresentados observa-se que no tratamento C não há diferença significativa entre os tempos de armazenamento ($p > 0,05$), enquanto que no tratamento M os tempos 30 e 60 diferiram significativamente do 1º dia ($p < 0,05$). Também houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias 30 e 60 ($p < 0,05$).

5.6 Análise da viabilidade do probiótico

A análise da população total de *L. mucosae* foi utilizada para atestar a viabilidade do probiótico durante o tempo de armazenamento. Os dados estão apresentados na Tabela 5 e são expressos como médias em log UFC/g \pm desvio padrão.

Tabela 5 – Viabilidade de *L. mucosae* presente nos queijos durante os tempos de armazenamento de 1, 30 e 60 dias dos queijos (D1, D30 e D60, respectivamente)

Lote	<i>Limosilactobacillus mucosae</i> (log UFC/g)		
	D1	D30	D60
M1	8,50 \pm 0,11	8,62 \pm 0,007	8,45 \pm 0,014
M2	8,08 \pm 0,023	8,77 \pm 0,037	9,01 \pm 0,021
M3	8,72 \pm 0,065	8,89 \pm 0,017	8,80 \pm 0,026
Média	8,43 \pm 0,29 ^A	8,76 \pm 0,12 ^B	8,75 \pm 0,24 ^{A, B}

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: ^{A, B} = Letras maiúsculas sobrescritas diferentes em uma linha denotam que os tempos de armazenamento diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$)

Observa-se que no dia 1 de armazenamento a população de *L. mucosae* apresenta-se menor do que nos dias 30 e 60, apresentando diferença significativa dos demais tempos de armazenamento ($p < 0,05$). O dia 30 apresentou a maior população de *L. mucosae* observada. No dia 60 houve uma pequena queda quando se compara com o dia 30, mas sem apresentar diferença significativa ($p > 0,05$). De modo geral, a população de *L. mucosae* se manteve sem muitas variações durante o período de armazenamento, não ultrapassando 0,5 ciclo log entre as médias observadas para o conjunto dos lotes entre os períodos de estocagem.

Moraes et al. (2018) obteve resultados semelhantes em seu estudo, tendo obtido resultados entre 8,28 log UFC/g e 8,72 log UFC/g.

Diante dos resultados observados, é possível afirmar que o *L. mucosae* sobreviveu durante todo o tempo de armazenamento, mantendo-se em número satisfatório por ser comparável ou superior ao obtido para o mesmo microrganismo em outros estudos com alimentos potencialmente probióticos (DANTAS et al., 2022; GALDINO et al., 2021; MORAES et al., 2018; MORAIS et al., 2022; SOUSA et al., 2021), indicando, portanto, a sua viabilidade em queijos refrigerados contendo extrato de *H. annuus*.

5.7 Resistência do probiótico a passagem pelo sistema gastrointestinal

O ensaio de resistência gastrointestinal simulada *in vitro* foi realizado para verificar a sobrevivência do microrganismo presente nos queijos à passagem pelos fluidos dos compartimentos gástrico e entérico, bem como às variações de pH e presença de enzimas e sais biliares. O teste foi feito com amostras de todos os tempos de armazenamento (1 dia, 30 dias e 60 dias). Os resultados estão apresentados na Tabela 6 e os resultados são expressos como valores mínimos - máximos em log UFC/g, sendo também indicadas as porcentagens sobreviventes acima de 6 log UFC/g.

Com base nos resultados, pode-se observar que no início do ensaio (t0h) as amostras em todos os períodos de armazenamento apresentam população semelhante de *L. mucosae*. Todas as amostras ao longo do armazenamento apresentaram redução na população durante a fase gástrica (T30min e T2h), apresentando recuperação na fase entérica (T4h e T6h). Quase todas as amostras

apresentaram população em torno de 5,5 log UFC/g depois de 4 horas de ensaio, com exceção do queijo do lote 1 do tratamento M no primeiro dia de armazenamento (M1D1) que apresentou população de 4,01 log UFC/g, assim como o queijo de 30 dias do mesmo lote (M1D30) que apresentou população de 6,56 log UFC/g (dados não mostrados).

Tabela 6 – Sobrevivência de *L. mucosae* (valores mínimos – máximos em log UFC/g e porcentagens acima de 6 log UFC/g) durante o ensaio de resistência gastrointestinal após 1, 30 e 60 dias (D1, D30 e D60, respectivamente).

Tempos	D1		D30		D60	
	Mín. – Máx.	% acima de 6 log UFC/g	Mín. – Máx.	% acima de 6 log UFC/g	Mín. – Máx.	% acima de 6 log UFC/g
Inicial						
T0h	8,66 – 9,05	100 (6/6)	8,49 – 8,85	100 (6/6)	8,75 - 9,05	100 (6/6)
T30min	3,64 – 5,95	0 (0/6)	2,90 – 6,30	16,66 (1/6)	5,77 – 6,47	33,33 (2/6)
T2h	< LD – 5,00	0 (0/6)	4,94 – 5,60	0 (0/6)	5,03 – 5,63	0 (0/6)
T4h	< LD – 5,83	0 (0/6)	5,36 – 6,58	33,33 (2/6)	5,00 – 5,90	0 (0/0)
T6h	< LD – 6,06	16, 66(1/6)	< LD – 7,05	66,66 (4/6)	5,22 – 7,54	83,33 (5/6)
Ensaio Geral	< LD – 6,06	4,17 (1/24) ^A	< LD – 7,05	29,17 (7/24) ^B	5,00 – 7,54	29,17 (7/24) ^B

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: ^A ^B = Letras maiúsculas sobrescritas diferentes em uma linha denotam que os tempos de armazenamento diferiram significativamente entre si no teste binomial exato ($p < 0,05$) para a taxa de viabilidade acima de 6,00 log UFC/g no consolidado geral do ensaio, considerada relevante para resultar em efeito benéfico ao consumidor para o consumo de probióticos, considerando a hipótese nula (H0) que esta proporção no decorrer da passagem pela simulação do trato gastrointestinal seja de, pelo menos, 25%.

Sinal convencional utilizado: <LD = menor que o limite de detecção do método.

No fim do ensaio (t6h) a maioria das amostras apresentou população superior a 6,0 log UFC/g, com exceção de três queijos, sendo as amostras no primeiro dia dos lotes 1 e 2 (M1D1 e M2D1, respectivamente) e a amostra com 60 dias do lote 3 (M3D60), nas quais, *L. mucosae* sobreviveu abaixo de 6 log UFC/g (dados não mostrados). Duas amostras apresentaram sobrevivência superior a 7,0 log UFC/g, sendo elas amostras do lote 1 aos 30 dias e do lote 2 aos 60 dias (M1D30 e M2D60, respectivamente, dados não mostrados). Comportamento similar para a perda da

viabilidade no início do ensaio e recuperação da sobrevivência nas fases finais foram descritos por Galdino et al. (2021) para bactérias lácticas nativas em leite de cabra fermentado e para *Lactobacillus acidophilus* LA-5, microrganismo reconhecidamente probiótico, em musses lácteas com polpa de goiaba por Buriti et al. (2010). No presente estudo, a diminuição na população de *L. mucosae* na fase gástrica ocorreu possivelmente devido a ao estresse causado pela diminuição de pH, que resulta em injúria aos microrganismos. Essa diminuição na viabilidade é reduzida na fase entérica devido ao aumento do pH e consequente reparação dos microrganismos (RIBEIRO et al., 2020).

Para que uma cepa bacteriana possa ser considerada probiótica é necessário que ela sobreviva às condições do trato gastrintestinal e mantenha-se em número adequado no intestino para que possa exercer seu efeito benéfico (LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; MORAES et al., 2017; SANTOS et al., 2015).

De acordo com os resultados, o microrganismo *L. mucosae* apresentou boa sobrevivência as condições gastrintestinais testadas *in vitro*, mantendo-se em quantidade suficiente ao fim do ensaio, demonstrando assim potencial para exercer atividade probiótica quando incorporado ao queijo coagulado com o extrato de semente de *H. annuus*.

5.8 Análise dos contaminantes

Os resultados da análise dos contaminantes nos queijos estão apresentados na Tabela 7. Os resultados de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* estão apresentados como NMP/g de amostra, e os resultados de *Staphylococcus* sp. como UFC/g de amostra.

Todos os queijos apresentaram resultado negativo para a presença de *Salmonella* sp., *E. coli*, e coliformes termotolerantes. Todos os lotes apresentaram diminuição na contagem de coliformes totais, com exceção do lote 2 do tratamento controle (C2). Todos os queijos apresentaram resultados satisfatórios para a pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* sp., segundo a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019 da ANVISA, que determina resultados de no máximo 10^2 /g e ausência em 25 g, respectivamente, para essa classificação. A presença de *Staphylococcus* sp. foi observada apenas no lote 1 do tratamento controle nos dias 1 e 30 de armazenamento (C1D1 e C1D30, respectivamente), apresentando ausência aos 60 dias (C1D60),

fazendo com que esse lote apresentasse resultado insatisfatório para esse parâmetro no início do armazenamento, com qualidade inaceitável de acordo com a legislação vigente que estipula valores inferiores a 10^3 UFC/g para esse microrganismo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019).

Tabela 7 – Análise dos contaminantes presentes nos queijos

Amostra	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp. (em 25 g)	<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g)
C1D1	>1.100	<3	<3	Ausente	$9,5 \times 10^3$
C1D30	460	<3	<3	Ausente	$4,0 \times 10^2$
C1D60	43	<3	<3	Ausente	<3
C2D1	>1.100	<3	<3	Ausente	<3
C2D30	>1.100	<3	<3	Ausente	<3
C2D60	>1.100	<3	<3	Ausente	<3
C3D1	3,6	<3	<3	Ausente	<3
C3D30	<3	<3	<3	Ausente	<3
C3D60	<3	<3	<3	Ausente	<3
M1D1	>1.100	<3	<3	Ausente	<3
M1D30	>1.100	<3	<3	Ausente	<3
M1D60	<3	<3	<3	Ausente	<3
M2D1	>1.100	<3	<3	Ausente	<3
M2D30	93	<3	<3	Ausente	<3
M2D60	<3	<3	<3	Ausente	<3
M3D1	>1.100	<3	<3	Ausente	<3
M3D30	460	<3	<3	Ausente	<3
M3D60	<3	<3	<3	Ausente	<3

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: C = queijo controle, M = queijo probiótico, D1 = 1° dia de armazenamento, D30 = 30° dia de armazenamento, D60 = 60° dia de armazenamento.

A diminuição mais acentuada no número de coliformes totais nos queijos que continham *L. mucosae* pode indicar um possível efeito inibitório da bactéria láctica sobre os contaminantes, o que ajudou minimizar a contaminação do produto durante o período de armazenamento, fazendo com que estes indicadores sanitários

estivessem abaixo do limite de detecção do método (< 3 NMP/g) em todos os lotes dos queijos do tratamento M aos 60 dias de armazenamento, diferindo do verificado para o tratamento controle, com o primeiro e segundo lotes ainda com a presença de coliformes totais aos 60 dias (C1D60 e C2D60). Buriti, Cardarelli e Saad (2007) conduziram um estudo onde foi analisado o potencial probiótico de uma cocultura de *Lacticaseibacillus paracasei* (anteriormente *Lactobacillus paracasei*) e *Streptococcus thermophilus* presentes em queijo cremoso fresco, onde foi observada a presença de coliformes nos queijos produzidos em quantidade entre 1,0 e 1,4 UFC/g de amostra no dia da produção (dia 0). A quantidade de coliformes foi inferior ao limite de detecção do método de análise destes contaminantes a partir do dia 14. Também foi observada a inibição de *L. paracasei* frente a *Lactobacillus sakei* (anteriormente *Lactobacillus sakei*), *Lactobacillus monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus* em placas de Petri contendo ágar MRS, onde foram observados halos de inibição entre 2 e 3 cm.

5.9 Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

Os resultados da determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante estão apresentados na Tabela 8.

Foram escolhidos os queijos do segundo lote de cada tratamento para as análises de determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Cada um dos dois tratamentos controle e com *L. mucosae* do lote 2, (C2 e M2, respectivamente), foi avaliado nos tempos de armazenamento 1, 30 e 60 dias para as análises citadas.

Observa-se que o segundo lote dos dois tratamentos apresentaram alta quantidade de compostos fenólicos. O lote C2 apresentou aumento na quantidade de compostos fenólicos totais aos 30 dias (C2D30), retornando a um valor próximo ao inicial aos 60 dias (C2D60). O lote M2 apresentou valores crescentes de compostos fenólicos totais ao longo do armazenamento, porém, tanto o lote C2 quanto o lote M2 apresentaram valores altos nas quantidades de amostra necessários para sequestrar o radical DPPH.

Dantas et al. (2022) conduziram um estudo onde foi analisada a quantidade de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em bebida láctea fermentada com *L. mucosae* CNPC007 e polpa de jambolão, a qual apresentou resultados de teor de fenólicos entre 35,45 – 43,62 mg Eq AG/100 g de amostra, enquanto que as

quantidades de amostra necessárias para sequestrar 1 mg de radical DPPH variaram entre 0,86874 – 0,62935 g. Sendo assim, as quantidades de compostos fenólicos encontradas por Dantas et al. (2022) foram menores que as encontradas nos queijos dos dois tratamentos deste estudo, porém a capacidade antioxidante foi maior que a observada nos queijos avaliados neste trabalho.

Tabela 8 – Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

Amostra	Concentração de fenólicos na amostra (mg Eq AG/100 g amostra)	EC50 (g de amostra/L)	EC50 (g de amostra/mg de DPPH)
C2D1	80,97	22,642	1,289
C2D30	124,71	23,692	1,349
C2D60	90,16	45,792	2,619
M2D1	51,49	44,375	1,453
M2D30	57,88	45,175	1,480
M2D60	85,34	31,333	1,026

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: C2 = segundo lote do queijo controle, M2 = segundo lote do queijo probiótico com *L. mucosae*, D1 = 1° dia de armazenamento, D30 = 30° dia de armazenamento, D60 = 60° dia de armazenamento.

No início do armazenamento, foram detectados teores de fenólicos nos queijos equivalentes ao teor de fenólicos encontrado na polpa do fruto do mandacaru no estudo conduzido por Soares et al. (2021), que também evidenciou que para este teor de compostos fenólicos foi observada uma capacidade antioxidante 10 vezes mais elevada que a dos queijos deste estudo (apenas 0,088 mg de polpa de fruta para capturar 1 mg de DPPH).

Na metodologia original, Folin e Ciocalteu (1927) desenvolveram um método para quantificar tirosina e triptofano, que são aminoácidos, utilizando o reagente desenvolvido por eles para esta finalidade. Tirosina e triptofano apresentam em sua estrutura anel benzênico, que é a estrutura responsável por reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu. Os compostos fenólicos também apresentam anéis benzênicos em sua estrutura e por isso podem ser quantificados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Desde modo, possivelmente, aminoácidos e peptídeos solúveis, que contêm anel benzênico na sua estrutura, que estavam presentes na amostra foram quantificados junto dos compostos fenólicos, visto que, os resultados para a

capacidade antioxidante são contraditórios com os resultados da quantidade de compostos fenólicos.

5.10 Análise proteolítica por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

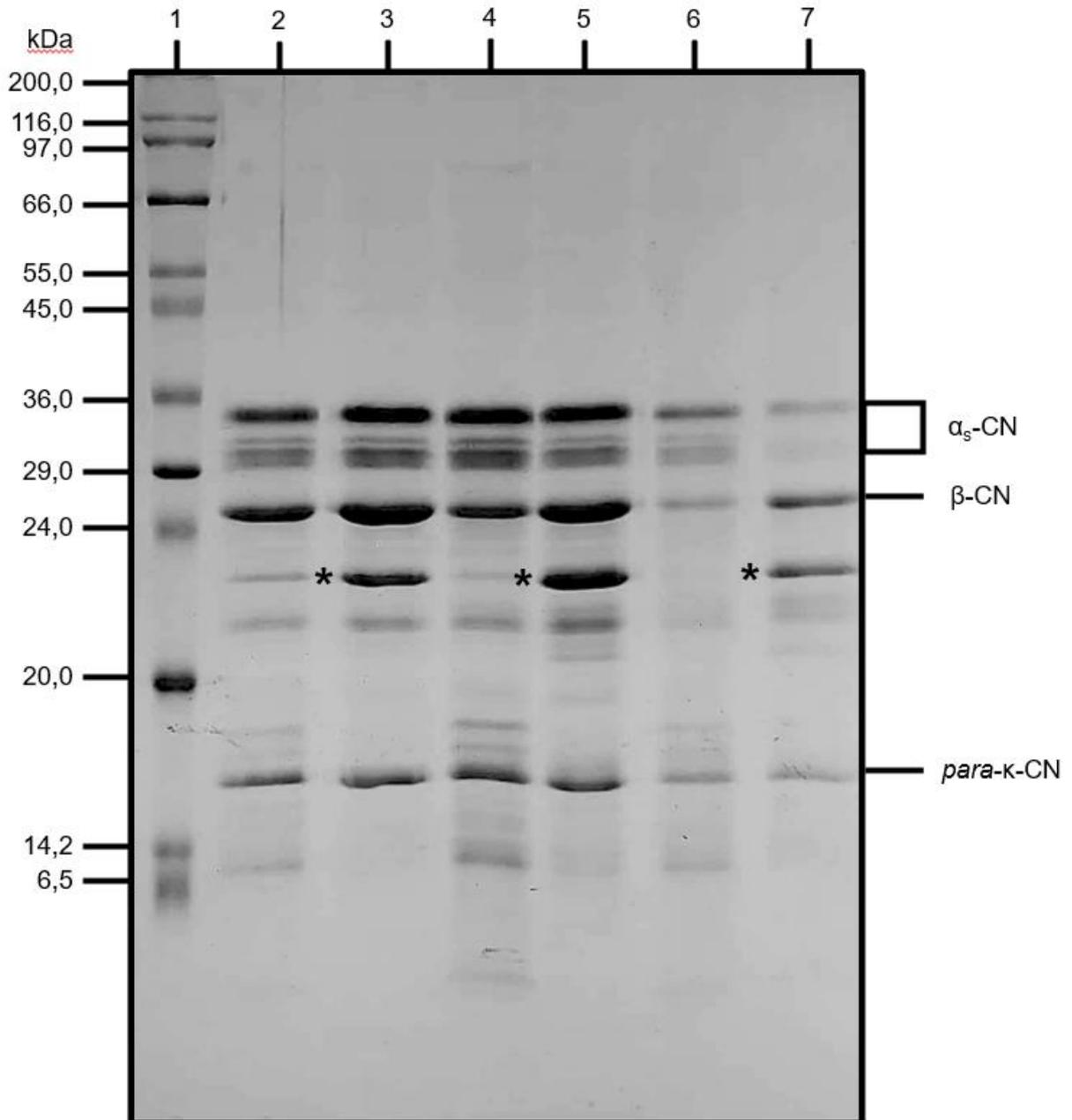
Os resultados da análise proteolítica por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) estão apresentados na Figura 5.

Assim como para os resultados de fenólicos totais e antioxidantes, os queijos do segundo lote de cada tratamento foram utilizados nesta análise.

Para todos os tratamentos as bandas de proteínas e peptídeos características de queijo se mostraram presentes, especialmente as caseínas (CN), a exemplo da α_s -CN, β -CN e o peptídeo *para*- κ -CN. Para os dias 1 e 30 verificou-se maior intensidade das bandas reveladas para as formulações produzidas com *L. mucosae* com tendência para uma redução da intensidade dessas bandas aos 60 dias em ambos os tratamentos. Para todos os dias de armazenamento verificou-se bandas intensas na região abaixo de 24 kDa para os queijos produzidos com *L. mucosae*, as quais foram pouco reveladas (dias 1 e 30) ou não reveladas (60 dias) nos queijos controle. Por outro lado, para todos os dias de armazenamento dos queijos controle verificou-se maior intensidade das bandas na região entre 6,5 e 14 kDa quando comparados aos respectivos queijos com *L. mucosae* nos mesmos dias de armazenamento. A cepa de *L. mucosae* presente nos queijos aparenta prevenir de alguma forma a proteólise dos queijos, o que é evidenciado pela ausência (dias 1 e 60) ou menor intensidade (dia 30) de bandas entre 6,5 e 14 kDa nos queijos contendo esse microrganismo.

Com relação ao potencial proteolítico do extrato vegetal, um estudo conduzido por Egito et al. (2007) utilizou extratos de sementes de girassol e albizia para analisar através de eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência o potencial coagulante e o potencial proteolítico dessas sementes durante 24 horas. Os autores observaram que a α_s -CN, a β -CN foram mais hidrolisadas pelo extrato de albizia do que pelo de girassol, apresentando-se mais resistente a proteólise na presença do extrato de girassol. A maior parte da α_s -CN desapareceu depois 40 minutos na presença do extrato de albizia, enquanto a β -CN ainda era visível após 6 horas. Já na presença do extrato de girassol as duas caseínas ainda estavam presentes após 6 horas, e traços da α_s -CN e da β -CN ainda foram detectados após 24 horas

Figura 5 – Eletroforese dos queijos do segundo lote dos tratamentos controle e probiótico com *L. mucosae*



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Nota: 1 = marcador. 2 = queijo controle dia 1. 3 = queijo probiótico dia 1. 4 = queijo controle dia 30. 5 = queijo probiótico dia 30. 6 = queijo controle dia 60. 7 = queijo probiótico dia 60. * = destaque para as bandas mais intensas verificadas nos queijos com *L. mucosae*.

No presente estudo para os queijos com extrato de *H. annuus* dos dois tratamentos, a revelação das bandas de α_s -CN, β -CN e para- κ -CN no gel foi bastante

semelhante às bandas obtidas no estudo de Egito et al. (2007). No presente estudo, entretanto, o perfil proteico do queijo contendo *L. mucosae* apresenta-se diferente do perfil proteico do queijo controle, o que é evidenciado pela presença de uma banda de forte intensidade entre 20 e 24 kDa marcada com asterisco conforme mencionado anteriormente. No entanto a proteólise nos queijos se intensifica ao longo do tempo de armazenamento, resultando na redução da intensidade das bandas reveladas no dia 60, para os dois tratamentos.

Apesar de no presente trabalho a proteólise dos queijos probióticos ter sido mais evidente apenas ao final do armazenamento, o potencial proteolítico da cepa de *L. mucosae* CNPC007 já foi descrito em alguns estudos, como por exemplo Moraes et al. (2022) onde foi relatada uma maior extensão proteolítica em iogurte contendo essa mesma cultura frente a um iogurte controle, sem o microrganismo. Igualmente, Moraes et al. (2018) descreveu a possível proteólise de *L. mucosae* em queijos de cabra como possível responsável pela alteração do aroma ao longo do período de maturação dos queijos avaliados naquele estudo.

6 CONCLUSÃO

O extrato de sementes de *Helianthus annuus* apresentou atividade coagulante satisfatória tendo conseguido coagular o leite de cabra de forma adequada para a produção dos queijos.

Não houve variações significativas na composição centesimal entre os tratamentos controle e contendo *L. mucosae* CNPC007 produzidos. Também não foram verificadas variações na umidade dos queijos durante o período de armazenamento. A acidez aumentou com o avanço do período de armazenamento nos queijos dos lotes que continham *L. mucosae*.

O microrganismo nativo *L. mucosae* manteve-se viável durante todo o armazenamento refrigerado do queijo elaborado com extrato de sementes de *H. annuus*, não apresentando variações significativas na sua população. No ensaio de simulação das condições gastrintestinais *in vitro*, a cultura nativa incorporada ao queijo de coagulação vegetal mostrou-se resistente às condições adversas, mantendo-se em concentração considerada adequada para um alimento com potencial probiótico ao final do teste.

Nas análises de contaminantes, a população de coliformes totais apresentou diminuição com o tempo de armazenamento dos queijos nos lotes que continham *L. mucosae*, mostrando um possível efeito protetivo do probiótico na formulação.

Apesar do teor elevado de fenólicos nos queijos controle e contendo *L. mucosae* avaliados, estes não demonstraram potencial antioxidante comparável a outros alimentos estudados pelo grupo de pesquisa com teor de fenólicos semelhante.

Os queijos apresentaram algumas diferenças com relação às bandas que foram reveladas nos géis de SDS-PAGE, sendo mais intensas nos queijos com *L. mucosae*, mas tendo havido aumento da proteólise ao final do armazenamento nos dois tratamentos avaliados.

Os queijos de coagulação vegetal com extrato de sementes de *H. annuus* contendo *L. mucosae* CNPC007 apresentaram-se como uma ótima alternativa como fonte de microrganismo potencialmente probiótico que pode trazer benefícios a saúde.

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pandemia causada pela COVID-19 causou paralisação ou diminuição das atividades de diversos setores da humanidade nos últimos anos, inclusive às pesquisas acadêmicas. O presente trabalho foi afetado principalmente pela dificuldade para encontrar fornecedores de determinados insumos, especialmente leite de cabra, que teve sua produção bastante diminuída durante a pandemia e também a dificuldade de manter parcerias com outras instituições para a realização de determinados ensaios e análise, visto que o acesso de pessoas aos laboratórios ficou dificultado devido as orientações sanitárias durante a pandemia. Algumas análises, a exemplo das análises de textura instrumental e sensorial com painel de julgadores, também tiveram seu desenvolvimento comprometido devido aos decretos sanitários vigentes durante a pandemia.

Apesar dos contra tempos e intercorrências ocorridos, o esforço foi válido, pois no período dos últimos 6 meses foi possível produzir e analisar o produto, e verificar sua capacidade de assegurar a viabilidade de *L. mucosae* durante todo o período de armazenamento, bem como permitir sua sobrevivência às condições gastrintestinais simuladas, além de evidenciar possível potencial bioconservante dessa bactéria láctica, que deverá ser explorado em futuros trabalhos do grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: nutritional and health benefits. **Food Science & Nutrition**, Hoboken, v. 8, p. 4666–4684, 2020.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, ano 138, n. 236-E, p.32, 10 dez. 1999.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 157, n. 249, p. 133-139, 26 dez. 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 75, de 8 de outubro de 2020. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 158, n. 195, p. 113-124, 9 out. 2020.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000033. Acesso em: 25 fev.2022.
- ALVES, M. P; MOREIRA, R. O; RODRIGUES JUNIOR, P. H.; MARTIS, M. C. F; PERRONE, I. T; CARVALHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- ANGELO, P. M.; JORGE. N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, jan. 2007.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of the AOAC International**. AOAC International: Washington DC, 2005.
- ARIMA, K.; IWASA, S.; TAMURA, G. Milk clotting enzyme from microorganisms: part I: screening clotting enzyme from microorganisms of the potent fungus. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 31, n. 5, p. 540–545, 1967.
- BALDISSERA, A. C.; BETTA, F. D.; PENNA, A. L. B.; LINDNER, J. D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.

BARCELOS, S. C. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Petit-Suisse caprino potencialmente probiótico com polpa de acerola (*Malpighia emarginata* DC)**. 2017. 171f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Ceará, Limoeiro do Norte, 2017.

BARROS, C. M. V.; CUNHA, C. R.; GALLINA, D.; VIOTTO, L. A.; VIOTTO, W. H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 11-18, 2006.

BECKER, L. V. **logurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BIDOT-FERNÁNDEZ, A. Composition, attributes and benefits of goat milk: literature review. **Journal of Animal Production**, Purwokerto, v. 29, p. 32-41, 2017.

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 ricota made from whey as well as cow's milk and goat's milk. **International Journal of Food Science and Technology**, Hoboken, v. 49, p. 1128-1279, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite de cabra. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, ano 137, n. 215, p. 23-25, 8 nov. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, ano 134, n. 48, p. 3977-3986, 11 mar.1996.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2, p. 121–129, 2010.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 1, p. 228–235, 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**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 196–203, 2014.

CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Acidification profile, probiotic *in vitro* gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 41, p. 1-6, 2015.

CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. 3. ed. New York: Wiley, 2001.

CORREIA, P.; VITOR, A.; TENREIRO, M.; CORREIA, A. C.; MADANELO, J.; GUINÉ, R. Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. **Nutrition & Food Science**, Bingley, v. 46, n. 4, p. 458-475, 2016.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; VARGAS, P. I. R.; FERNANDES, A. J. M.; PEREIRA, A. S. Avaliação da proteólise de queijo artesanal de uma unidade produtora da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 371, p. 62-69, 2009.

DANTAS, D. S.; GOMES, L. S.; GONÇALVES, L. S. C.; CORREIA, J. O.; SILVA, G. M.; QUEIROGA, A. P. R.; SANTOS, K. M. O.; FLORENTINO, E. R.; ALONSO BURITI, F. C. Lactose hydrolysis implications on dairy beverages with autochthonous *Limosilactobacillus mucosae* and *Syzygium cumini* pulp. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 155, p. 112963, 2022.

DE RENSIS, C. M. V. B.; PETENATE, A. J.; VIOTTO, W. H. Caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 488-494, 2009.

DOMINGO, E. C.; VIDIGAL, R. B.; FRANCISCO, K. C.; LOPES, J. P.; FERREIRA, D. S.; OLIVEIRA, K. A. M.; MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S. Características físico-química do leite de cabra cru produzido na zona da mata mineira. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 23, 2006, Juiz de Fora. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 61, n. 351, p.122-124, 2006.

DORMAN, H. J. D.; KOŞAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from mentha species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 4563-4569, 2003.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J.M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLE, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 17, n. 7, p. 816–825, 2007.

FENIMAN, C.M; PASINI, G.; MUCELÍN, C. A. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Medianeira – PR. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 17, p. 101-105, 2003.

FERNANDES, S. S. **Influência da adição de culturas nativas de lactobacilos com potencial probiótico sobre as características microbiológicas de derivados lácteos adicionados de produtos obtidos da casca de jabuticaba.** 2016. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

FGUIRI, I.; ATIGUI, M.; SBOUI, A.; SAMIRA, A.; MARZOUGUI, C.; DBARA, M.; HAMMADI, M.; KHORCHANI, T. Camel milk-clotting using plant extracts as a substitute to commercial rennet. **Journal of Chemistry**, London, v. 2021, p. 8, 2021.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 73, p. 627–650, 1927.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria:** report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Córdoba, Argentina: FAO: WHO, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food energy:** methods of analysis and conversion factors: report of a technical workshop. Rome: FAO, 2003. (FAO Food and Nutrition Paper, 77). ISBN 92-5-105014-7

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Probiotics in food:** health and nutritional properties and guidelines for evaluation, Rome: FAO, 2006. 53 p. (FAO Food and Nutrition Paper, 85). ISBN: 92-5-105513-0.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Milk and dairy products in human nutrition.** FAO: Rome, 2013. 404p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>>. Acesso em: 9 maio 2018.

FREITAS, C. D. T.; LEITE, H. B.; OLIVEIRA, J. P. B.; AMARAL, J. L.; EGITO, A. S.; VAIRO-CAVALLI, S.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; RAMOS, M. V. Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, Amsterdam, v. 87, p. 50-59, 2016.

GALDINO, I. K. C. P. O. **Determinações bromatológicas em soro de queijo de cabra utilizando a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR).** 2016. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

GALDINO, I. K. C. P. O.; OLIVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, A. T.; SILVA, G. M.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, K. M. O.; EGITO, A. S.; ALONSO BURITI, F. C. Fermentative behavior of native lactobacilli in goat milk and their survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 135, p. 109905, 2021.

GIADA, M. L. R. Antioxidant capacity of the striped sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) aqueous extract. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, p. 284-290, 2008.

GONÇALVES, M. C.; CARDARELLI, H. R. Mozzarella cheese stretching: a minireview. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 59, n. 1, p. 82-91, 2021.

GUIAMA, V. D.; LIBOUGA, D. G.; NGAH, E.; MBOFUNG, C. M. Milk-clotting activity of berries extracts from nine *Solanum* plants. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, p. 3911-3918, 2010.

GÜNALAN, E.; IREM KAYA CEBIOGLU, I. K.; ÇONAK, O. The popularity of the biologically-based therapies during coronavirus pandemic among the google users in the USA, UK, Germany, Italy and France. **Complementary Therapies in Medicine**, Edinburgh, v. 58, p. 102682, 2021.

HAN, B.; HOANG, B. X. Opinions on the current pandemic of COVID-19: use functional food to boost our immune functions. **Journal of Infection and Public Health**, London, v. 13, p. 1811–1817, 2020.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 11, n. 8, p. 506, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Brasília, 2016. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 22 fev. 2022.

JACOB, D. J. M.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, Hoboken, v. 64, p. 14-33, 2010.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, p. 285–290, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEVERRIER, A.; DANGUET, D.; CALAME, W.; DHOYE, P.; KODIMULE, S. P. *Helianthus annuus* seed extract affects weight and body composition of healthy obese adults during 12 weeks of consumption: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Nutrients**, Basel, v. 11, p. 1080, 2019.

- LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2007.
- LIU, J. B.; CHANG, S. K. C.; WIESENBORN, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, p. 2333–2340, 2005.
- MANZOOR, A. S.; SHABIR, A. M.; MOHD, A. P. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Science & Technology**, Paris, v. 94, p. 5-16, 2013.
- MARECEK, V.; MIKYŠKA, A.; HAMPEL, D.; ČEJKA, P.; NEUWIRTHOVÁ, J.; MALACHOVÁ, A.; CERKAL, R. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **Journal of Cereal Science**, London, v. 73, p. 40- 45, 2017. DOI: 10.1016/j.jcs.2016.11.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521016301886>. Acesso em: 25 fev. 2022.
- MARTINS, I. B. A.; DELIZA, R.; SANTOS, K. M. O.; WALTER, E. H. M.; MARTINS, J. M.; ROSENTHAL, A. Viability of probiotics in goat cheese during storage and under simulated gastrointestinal conditions. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 11, p. 853-863, 2018.
- MAZORRA-MANZANO, M. A.; PEREA-GUTIÉRREZ, T. C.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; RAMIREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, Oxford, v. 141, p. 1902-1907, 2013.
- MORAES, G. M. D., ABREU, L. R., Egito, A. S., SALLES, H. O., SSILVA, L. M. F., NERO, L. A., et al. Functional properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Brazilian goat milk. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 9, p. 235–245, 2017.
- MORAES, G. M. D., SANTOS, K. M. O., BARCELOS, S. C., LOPRES, S. A., EGITO, A. S. Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: microbiological, physicochemical and sensory attributes. **LWT-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 94, p. 57–63, 2018.
- MORAIS, J. L.; GARCIA, E. F.; VIERA, V. B.; PONTES, E. D. S.; ARAÚJO, M. G. G.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; MOREIRA, I. S.; EGITO, A. S.; DOS SANTOS, K. M. O.; SOARES, J. K. B.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G. Autochthonous adjunct culture of *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 improved the techno-functional, physicochemical, and sensory properties of goat milk Greek-style yogurt. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 105, n. 3, 2022.
- NICOSIA, F. D.; PUGLISI, I.; PINO, A.; CAGGIA, C.; RANDAZZO, C.L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. **Foods**, Basel, v. 11, p. 871, 2022.

NOBRE, M. S. C. **Influência da adição de diferentes culturas de lactobacilos sobre as características de soro de queijo de cabra tipo coalho atomizado (pó) reconstituído fermentado**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2015.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 384.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 88–113, 2007.

PEREIRA, Á. M. S.; FARIAS, D. R. B.; QUEIROZ, B. B.; NOBRE, M. S. C.; CAVALCANTI, M. T.; SALLES, H. O.; SANTOS, K. M. O.; MEDEIROS, A. C. D.; FLORENTINO, E. R.; ALONSO BURITI, F. C. Influence of a co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* on the proteolysis and ACE-inhibitory activity of a beverage based on reconstituted goat whey powder. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 11, p. 273–282, 2019.

PEREIRA, Á. M. S.; LIMA, L. C. A. S.; LIMA, L. W. S.; MENEZES, T. M.; VIEIRA, Â. M.; FRANCO, E. S.; PAZ, S. T.; MAIA, C. S.; EGITO, A. S.; SANTOS K. M. O.; ALONSO BURITI, F. C.; MAIA, M. B. S. Safety evaluation of goat milk added with the prebiotic inulin fermented with the potentially probiotic native culture *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 in co-culture with *Streptococcus thermophilus* QGE: analysis of acute and repeated dose oral toxicity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09898-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-021-09898-x>. Acesso em: 21 maio 2022.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C. A.; ADMAS, M. C.; BAINES, S. K. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 619–625, 2012.

REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. *In*: BRANDELLI, A. An introduction to probiotics. *In*: BRANDELLI, A. **Probiotics advanced food and health applications**. London: Academic Press, 2022. p. 1-17.

RIBEIRO, A. P. O.; GOMES, F. S.; SANTOS, K. M. O.; MATTA, V. M.; SÁ, D. G. C. F.; SANGIAGO, M. C. P. A.; CONTE, C.; COSTA, S. D. O.; RIBEIRO, L. O.; WALTER, E. H. M. Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 118, p. 108756, 2020.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidantes total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico, 127).

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANCHEZ MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANTOS, K. M. O.; OLIVEIRA, I. C.; LOPES, M. A. C.; CRUZ, A. P. G.; BURITI, F. C. A.; CABRAL, L. M. Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 97, p. 1108-1115, 2017.

SANTOS, K. M. O., VIEIRA, A. D. S., ALONSO BURITI, F. C., NASCIMENTO, J. C. F., MELO, M. E. S., BRUNO, L. M., BORGES, M. F.; ROCHA, C. R. C.; LOPES, A. C. S.; FRANCO, B. D. G. M.; TODOROV, S. D. Artisanal coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science & Technology**, Paris, v. 95, p. 209–230, 2015.

SANTOS, R. B.; BARBOSA, L. P. J. L.; BARBOSA, F. H. F. Probiótico: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, Macapá, v. 1, n. 1, p. 26-38, 2011.

SANTOS, W. M.; NOBRE, M. S. C.; CAVALCANTI, M. T.; SANTOS, K. M. O.; SALLES, H. O.; ALONSO BURITI, F. C. Proteolysis of reconstituted goat whey fermented by *Streptococcus thermophilus* in co-culture with commercial probiotic *Lactobacillus* strains. **International Journal of Dairy Technology**, Hoboken, v. 72, n. 4, p. 559-568, 2019.

SATO, R. T.; VIEIRA, A. T. B.; CAMISA, J.; VIANNA, P. C. B.; DE RENSIS, C. M. V.B. Assessment of proteolysis and sensory characteristics of Prato cheese with adjunct culture, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p. 3143-3152, 2012.

SCHILLINGER, U., GUIGAS, C., HOLZAPFEL, H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 1289-1297, 2005.

SERRA, A.; CONTE, G.; CORRALES-RETANA, L.; CASAROSA, L.; CIUCCI, F.; MELE, M. Nutraceutical and technological properties of buffalo and sheep cheese produced by the addition of kiwi juice as a coagulant. **Foods**, Basel, v. 9, p. 637, 2020.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A. DOS S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, M. O. M.; SANTOS, K. M. O.; SAAD, S. M. I.; ALONSO BURITI, F. C. Prospective applications of probiotics and prebiotics in foods. *In*: BRANDELLI, A. **Probiotics advanced food and health applications**. London: Academic Press, 2022. p. 209-231.

SILVA, S. D. P.; SOUZA, G. P.; CHAVES, A. R. M.; SILVA, M. A.; SOUZA, R. R.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z. Morphophysiological aspects of ornamental sunflowers cultivated in different growing seasons under semi-arid conditions. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 26, n. 4, p. 299-305, 2022.

SOARES, L. M. N.; SILVA, G. M.; ALONSO BURITI, F. C.; ALVES, H. S. *Cereus jamacaru* D.C. (mandacaru): a promising native Brazilian fruit as a source of nutrients and bioactives derived from its pulp and skin. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 76, p. 170-178, 2021.

SOUZA, M. C.; SANTOS, W. M.; SILVA, J. M. O.; RAMOS, F. P.; FREITAS, A. S.; NETA, M. C. A.; SANTOS, K. M. O.; ALONSO BURITI, F. C.; FLORENTINO, E. R. Non-fermented dairy desserts with potentially probiotic autochthonous Lactobacilli and products from peel of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Probiotics Antimicrobial Proteins**, New York, v. 3, p. 765-775, 2021.

SUASSUNA J. Leite de cabra na Paraíba. **Revista O Berro**, Uberlândia, n. 155, 2012. Disponível em: <http://www.revistaberro.com.br/?materias/ler,1887>. Acesso em: 23 fev. 2022.

SUCUPIRA, N. R. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 263-269, out. 2012.

TEODORO, N. X.; PEREIRA, A. M. S.; SANTOS, K. M. O.; ALONSO BURITI, F. C. Aplicação da biotecnologia na produção e desenvolvimento de alimentos funcionais: uma revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 37, n. 1, p. 21, 2021.

TURCHETTO, R.; TROMBETTA, L. J.; ROSA, G. M.; VOLPI, G. B.; BARROS, S. Production components of sunflower cultivars at different sowing times. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 51, p. 68137, 2021.

VILAR, M. J. **Alimentos saudáveis no radar do mercado de fusões e aquisições**. [S. l.]: Nello Investimentos, 2018. Disponível em: <https://www.linkedin.com/pulse/alimentos-saud%C3%A1veis-radar-do-mercado-de-fus%C3%B5es-e-aquisi%C3%A7%C3%B5es-vilar/?originalSubdomain=pt>. Acesso em: 24 fev. 2022.

VINDEROLA, G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F.; SUARÉZ, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J. Usefulness of a set of simple *in vitro* tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, p. 1678-1688, 2008.

VIZOSO PINTO, M. G. V.; FRANZ, C. M. A. P.; SCHINLLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, p. 205-214, 2006.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A. P.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GÄNZLE, M. G.; LEBEER, S. A. Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 70, p. 2782–2858, 2020.