

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**TALIANA KÊNIA ALVES BEZERRA**

**ESTUDO DA PROTEÓLISE, LIPÓLISE E COMPOSTOS VOLÁTEIS EM**  
**QUEIJO DE COALHO CAPRINO ADICIONADO DE BACTÉRIAS LÁTICAS**  
**PROBIÓTICAS**

**JOÃO PESSOA-PB**

**2015**

**TALIANA KÊNIA ALVES BEZERRA**

**ESTUDO DA PROTEÓLISE, LIPÓLISE E COMPOSTOS VOLÁTEIS EM  
QUEIJO DE COALHO CAPRINO ADICIONADO DE BACTÉRIAS LÁTICAS  
PROBIÓTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Marta Suely Madruga**

**Co-Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Maria Elieidy Gomes de Oliveira**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2015**

**TALIANA KÊNIA ALVES BEZERRA**

**ESTUDO DA PROTEÓLISE, LIPÓLISE E COMPOSTOS VOLÁTEIS EM  
QUEIJO DE COALHO CAPRINO ADICIONADO DE BACTÉRIAS LÁTICAS  
PROBIÓTICAS**

Dissertação \_\_\_\_\_ em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Marta Suely Madruga – PPGCTA/CT/UFPB**

**Coordenadora da Banca Examinadora**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiane Santi Gadelha**

**Examinador Externo**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga**

**Examinador Interno**

*A Deus, pelo seu amor incondicional*

*A minha mãe, Penha, pelas suas orações e seu amor*

*Ao meu marido, Igor, por seu amor e companheirismo*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força para enfrentar todas as dificuldades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a todos os professores que o compõem e a secretária, Lindalva, por todo apoio e dedicação.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marta Suely Madruga, pela excelente orientação, pela oportunidade de realização deste trabalho, confiança e pelo exemplo profissional e amizade. Obrigada.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Elieidy Gomes de Oliveira, pela co-orientação, correções e principalmente pelo apoio e dedicação no processamento dos queijos.

A minha mãe, Penha, pelo exemplo de mulher e de honestidade, por todo amor incondicional e orações. Mãe, amor eterno.

Ao meu pai, Severino (*in memoriam*), que onde quer que esteja nunca deixará de me amar. Pai, amor eterno.

Ao meu marido, Igor, pela força durante todos os momentos, pelo carinho, amor, paciência e compreensão por todos os períodos difíceis e de ausência. Te amo muito.

Aos meus irmãos Romulo, Tatiana e Taciana, por todo apoio, confiança e carinho. Amo muito vocês.

As minhas lindas e amadas sobrinhas Guívia, Karol e Lara, por fazerem minha vida mais colorida e feliz.

A toda a equipe LAQA (Narciza, Angela, Fábio, Valquíria, Déborah, Samara, June, Iris, Suellen e Carol), por toda ajuda e pela amizade, além de tudo. E aos Pibics Leanderson e com muito carinho a Ana Rita, por todo auxílio no laboratório e pela amizade.

As minhas queridas amigas lindas que enfrentaram junto comigo todas as batalhas do mestrado, Narciza, Geany e Rayssa, pela amizade.

As minhas amigas de hoje e sempre, Carine, Diva, Renata, Aline, Adma, Keliane e Cybelle, por todo apoio concedido e amizade.

Aos professores, Rita Queiroga, Teresa Pacheco, Carlos Gadelha e Tatiane Gadelha, pelo apoio a realizações de análises e por todos os conhecimentos repassados.

A todos do ITAL e a Edilza que auxiliaram em análises complementares da pesquisa.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

## RESUMO

O estudo da proteólise, lipólise e perfil de voláteis de queijo de coalho caprino ao qual foram adicionadas bactérias probióticas durante o armazenamento. Os queijos foram denominados de: QS, queijo de coalho controle elaborado com a cultura “starter” de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; QLA, queijo de coalho com cultura de *Lactobacillus acidophilus*; QLP, queijo de coalho elaborado com *Lactobacillus paracasei*; QB, queijo de coalho com *Bifidobacterium lactis*; e QC, queijo de coalho com co-cultura, contendo os 3 micro-organismos em associado. Os queijos foram analisados após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A contagem das células probióticas nos queijos foi superior a  $6,5\text{ log UFC g}^{-1}$  de queijo no 1º dia de armazenamento e  $7\text{ log UFC g}^{-1}$  de queijo, no 28º dia. Com base nos estudos comparativos realizados, ressalta-se que o uso das diferentes culturas lácticas probióticas afetou o perfil lipídico, proteico e aromático do queijo de coalho caprino, durante o armazenamento. Verificou-se que as culturas lácticas, independente do tipo, quando adicionadas aos queijos de coalho, apresentaram ação lipolítica ( $p < 0,01$ ) durante o armazenamento, provocando a redução dos ácidos graxos de cadeia longa e aumento dos ácidos graxos de cadeia curta. Os ácidos liberados influenciaram diretamente nos compostos do aroma peculiar do produto, principalmente, o aroma característico de caprinos, com aumento dos ácidos caprílico, caproico e cáprico. Observou-se efeito positivo da adição da cultura de *Bifidobacterium lactis* e da co-cultura de probióticos no perfil de ácidos graxos, e uma maior produção de voláteis, que resultou em maiores concentrações durante o período de estocagem do CLA (0,74 e 0,54 g/100g de ácidos graxos), e ótimos valores das relações AGPI/AGS (0,23 e 0,065) e DFA (50,23 e 45,08), associados à redução dos índices de aterogenicidade (2,15 e 2,38) e trombosidade (1,69 e 1,82). Vinte e cinco compostos voláteis foram identificados no queijo de coalho caprino: sendo seis alcoóis, quatro hidrocarbonetos, quatro terpenos, três ácidos, três cetonas, três aldeídos e dois ésteres. Nos cinco tipos de queijos de coalho caprino avaliados, observou-se produção de ésteres ao longo do armazenamento e redução de aldeídos. O aroma frutado dos ésteres é almejavél, uma vez que suaviza aromas indesejavéis e característicos de alguns compostos como ácidos e aldeídos. A utilização da combinação das culturas probióticas (co-cultura) também influenciou ( $p <$

0,01) a proteólise do queijo de coalho caprino, proporcionando maior teor de proteína solúvel, maior índice proteolítico de profundidade e maior liberação de aminoácidos no 1º dia após o processamento. Os queijos de coalho caprinos probióticos apresentaram índice de proteólise em extensão máxima após sete dias de estocagem, sendo que suas frações de  $\alpha_2$  e k-caseína foram as que obtiveram maior grau de hidrólise ao longo do armazenamento. Dentre os queijos elaborados com bactérias probióticas isoladas, enfatiza-se que a *B. lactis* exibiu ação proteolítica mais intensa, proporcionando elevado teor de proteína solúvel e maior degradação da fração de  $\alpha_2$  caseína ao longo do armazenamento. Os queijos probióticos fabricados a partir de leite de cabra possuem excelentes características em relação aos atributos nutricionais e aromáticos, em destaque os produzidos adicionando *Bifidobacterium lactis* e a co-cultura de probióticos.

**Palavras-chaves:** queijo caprino, produtos lácteos, lipólise, proteólise, voláteis, aminoácidos livres, otimização, probióticos.

## ABSTRACT

The study of proteolysis, lipolysis volatiles profile of caprine Coalho cheese to which were added probiotic bacteria during storage. The cheeses were named: QS, control sample of Coalho cheese prepared with a starter culture of *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis*, and *Lactococcus lactis*, subsp. *cremoris*; QLA, Coalho cheese with culture of *Lactobacillus acidophilus*; QLP, Coalho cheese sample formulated with *Lactobacillus paracasei*; QB, Coalho cheese with *Bifidobacterium lactis*; and QC, Coalho cheese with co-culture containing the 3 microorganisms in associated. The cheeses were analyzed after 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage at the temperature of  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The probiotic cell counts in cheese was superior to  $6.5\text{ log CFU g}^{-1}$  of cheese in the first day of storage, and surpassed  $7\text{ log CFU g}^{-1}$  of cheese in the 28<sup>th</sup> day of storage. Based on comparative studies carried out, it must be highlighted that the use of the various probiotic lactic cultures affects the lipid, protein, and aromatic profiles of caprine Coalho cheese during storage. It was verified that, when they were added to the Coalho cheese samples, the lactic cultures, regardless of type, presented lipolytic action ( $p < 0.01$ ) during storage, causing a reduction in long chain fatty acids and an increase in short chain fatty acids. The acids released have direct influence in particular compounds of the aroma of the product, especially the characteristic caprine aroma, with an increase in caprylic, caproic and capric acids. It was observed that the addition of the *Bifidobacterium lactis* culture and the co-culture of probiotics had a positive effect on the fatty acid profile, with a higher production of volatiles, resulting in more concentrations during the CLA storage period (0.74 and 0.54 g/100 g of fatty acids), optimal values for the PUFA/SFA relationships (0.23 and 0.065) and DFA (50.23 and 45.08), associated with a reduction in the atherogenicity index (2.15 and 2.38) and in the trombosidade index (1.69 and 1.82). Twenty-five volatile compounds were identified in caprine Coalho cheese: six alcohols, four hydrocarbons, four terpenes, three acids, three ketones, three aldehydes and two esters. In the five types of cheese samples analyzed, one was able to observe the production of esters during storage and the reduction of aldehydes. The fruity aroma of esters is desirable, since it lessens undesirable aromas which are found in some compounds such as acids and aldehydes. The use of a combination of probiotic cultures (co-culture) also influenced ( $p < 0,01$ ) the proteolysis of caprine Coalho cheese, providing a higher percentage of soluble protein, a higher proteolytic depth index and a greater release of fatty acids in the first day after processing. The probiotic caprine Coalho cheese samples presented a proteolysis rate which was at its highest after seven days of storage, and their fractions of  $\alpha\text{s}_2$  and k-casein were the ones with the highest degree of hydrolysis during storage. Among the samples prepared using isolated probiotic bacteria, it must be emphasized that *B. lactis* presented a more intense proteolytic action, showing a high percentage of soluble protein and a greater degradation of the  $\alpha\text{s}_2$  casein during storage. Probiotic cheeses produced using goat milk have excellent characteristics in terms of nutritional and aromatic attributes; highlighted the *B. lactis* and prodizidos adding the co-culture of probiotics.

Keywords: caprine cheese, dairy products, lipolysis, proteolysis, volatiles, free fatty acids, optimization, probiotics.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Delineamento experimental .....	27
Figura 2	Fluxograma de obtenção de queijo de coalho caprino .....	28

### ARTIGO 1

Figure 1	Pareto graph of the dependent variable ‘number of peaks’ .....	47
Figure 2	Response surface for the dependent variable ‘number of peaks’ .....	47
Figure 3	Profile of Predicted Values and Desirability for the number of peaks captured by HS-SPME-GC-MS in Coalho cheese .....	49

### ARTIGO 2

Figura 1	Perfil de ácidos graxos: ( <b>A</b> ) - Somatório de ácidos graxos de cadeia curta – AGCC; ( <b>B</b> ) - Somatório de ácidos graxos de cadeia média - AGCM; ( <b>C</b> ) - Somatório de ácidos graxos de cadeia longa - AGCL, de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	68
Figura 2	Perfil de ácidos graxos: ( <b>A</b> ) - Somatório de ácidos graxos monoinsaturados – AGMI; ( <b>B</b> ) - Somatório de ácidos graxos poliinsaturados – AGPI de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	69
Figura 3	Análise de componentes principais de variáveis definidas em dois componentes principais.....	73
Figura 4	Classes químicas de compostos voláteis: ( <b>A</b> ) – Ésteres; ( <b>B</b> ) – Ácidos; ( <b>C</b> ) – Álcoois; ( <b>D</b> ) – Cetonas; ( <b>E</b> ) – Aldeídos; ( <b>F</b> ) – hidrocarbonetos; ( <b>G</b> ) - Terpenos de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	75

Figura 6	Análise de componentes principais de variáveis definidas em dois componentes principais.....	82
----------	--	----

### ARTIGO 3

Figura 1	( <b>A</b> ) - Proteína solúvel (mg/mL); ( <b>B</b> ) - Índice de proteólise em extensão (%); ( <b>C</b> ) - profundidade (%) de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	98
Figura 2	Frações proteicas de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	100
Figura 3	HPLC-fase reversa de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	101
Figura 4	Área total de HPLC-fase reversa de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	102
Figura 5	Perfil de aminoácidos livres de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao 1°, 14° e 28° dia de armazenamento à 10 °C ± 2 °C.....	104
Figura 6	Análise de componentes principais de variáveis definidas em dois componentes principais.....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis independentes e níveis do planejamento DCCR, para extração de compostos voláteis em queijo coalho caprino .....	30
Tabela 2	Planejamento experimental $2^3 + 3$ repetições do ponto central + configuração estrela (2x3) .....	30

### ARTIGO 1

Table 1	Central composite rotatable design ( $2^3$ ) with the independent variables, levels and experimental responses ( $y =$ number of peaks) of the SPME extraction of volatiles in Coalho cheese.....	46
Table 2	Volatile compounds in the headspace of in caprine Coalho cheese...	51

### ARTIGO 2

Tabela 1	Relações e índices de ácidos graxos de cinco amostras de queijo de coalho caprino.....	72
Tabela 2	Porcentagem de ácidos e ésteres em queijos de coalho caprino adicionado com culturas lácticas probióticas e tradicional.....	77
Tabela 3	Porcentagem de álcoois em queijos de coalho caprino adicionado com culturas lácticas probióticas e tradicional.....	78
Tabela 4	Porcentagem de cetonas e aldeídos em queijos de coalho caprino adicionado com culturas lácticas probióticas e tradicional.....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
	2.1 CAPRINOCULTURA LEITEIRA NO MUNDO E NO BRASIL.....	16
	2.2 QUEIJO DE COALHO CAPRINO.....	17
	2.3 BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS EM QUEIJO .....	18
	2.4 PRINCIPAIS VIAS BIOQUÍMICAS EM QUEIJO .....	20
	<b>2.4.1</b> Proteólise .....	21
	<b>2.4.2</b> Lipólise .....	22
	<b>2.4.3</b> Glicólise .....	22
	2.5 VOLÁTEIS EM QUEIJO.....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
	3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO .....	26
	3.2 CULTURAS E REAGENTES.....	26
	3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
	3.4 PROCESSAMENTO DOS QUEIJOS DE COALHO CAPRINO.....	28
	3.5 VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS.....	29
	3.6 AVALIAÇÃO QUÍMICA DOS QUEIJOS DE COALHO CAPRINO..	29
	<b>3.6.1</b> Perfil aromático .....	29
	<b>3.5.2</b> Perfil de ácidos graxos.....	32
	<b>3.5.3</b> Perfil proteico .....	32
	3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
	4.1 ARTIGO 1.....	42
	4.2 ARTIGO 2.....	59
	4.3 ARTIGO 3.....	89
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	111

## 1 INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um produto muito apreciado graças as suas características sensoriais, apresentando sabor levemente salgado e ácido, aroma suave, textura compacta e macia. É um queijo tradicional, parcial ou totalmente cozido, que tem sido produzido e consumido no Nordeste do Brasil por mais de 150 anos. Logo, o queijo de coalho de caprinos destaca-se como um produto lácteo de valor comercial, por uma série de razões: o seu processo de produção é simples, com alto rendimento e baixo custo, trata-se de um produto com excelente valor nutricional, que oferece baixo potencial alergênico e alta digestibilidade (OLIVEIRA et al., 2012; QUEIROGA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Devido às especificidades do leite de cabra, o queijo de coalho caprino apresenta propriedades químicas que o torna um produto apreciável pelos consumidores. O perfil proteico deste tipo de queijo exibe características específicas, como a redução ou ausência da  $\alpha_{s1}$ -caseína e diferenças estruturais da  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactalbumina, o que o torna com baixo poder alergênico, permitindo assim o seu consumo por indivíduos que possuem alergia a proteína de produtos lácteos (ALBENZIO; SANTILLO, 2011).

O queijo de coalho caprino tem recebido atenção especial de pesquisadores devido ao seu reconhecimento como alimento com potencial funcional com base em seus perfis peptídicos e antioxidantes (SILVA et al., 2012); como um potencial “carreador” de bactérias ácido lácticas (OLIVEIRA et al., 2012); como um “veículo” para os micro-organismos probióticos e de ácidos graxos CLA (SANTOS et al., 2012); como um potencial propulsor da caprinocultura da região Nordeste do Brasil, quando produzido com apelo probiótico (QUEIROGA et al., 2013).

Os probióticos são considerados micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor, quando ingeridos. As bactérias lácticas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são frequentemente adicionadas em queijos, devido à resistência desses gêneros frente à matriz láctea (GARCIA et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Estudos reportam a adição desses gêneros de bactérias lácticas probióticas em queijos como: minas frescal adicionado de *L. acidophilus*, queijo de coalho elaborado

com *L. acidophilus*, *B. lactis* e *L. casei* e queijo cremoso adicionado de *L. plantarum*, *L. paracasei* (GOMES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; BURNS et al., 2012; COMAN et al., 2012). Segundo Prandini, Sigolo e Piva (2011), já existe um potencial associado à presença de algumas bactérias lácticas, como Bifidobactérias, Propionibacteria, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* com a produção de isômeros do ácido linoleico (CLA). Dentre os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) os CLAs apresentam excelente potencialidade bioativa, demonstrando propriedades anti-inflamatória, anti-câncer, anti-cancerígena, anti-aterogênica, anti-diabetogênica, dentre outras (MARRONE et al., 2014).

Dentre as principais características que tornam o queijo de coalho caprino uma excelente alternativa para veicular para bactérias lácticas probióticas. Destaca-se a sua composição físico-química que favorece a viabilidade destes micro-organismos, a exemplo do pH e o alto teor de umidade (SANTOS et al., 2012; GARCIA et al., 2012).

Os ganhos nutricionais e sensoriais dos queijos probióticos resultam do fato de que os probióticos possuem um amplo espectro de enzimas que provocam reações bioquímicas durante o período de estocagem do queijo, resultando na produção e liberação de diferentes compostos que impactam na qualidade do produto final, com efeito direto na textura e sabor. Dentre essas reações, destaca-se o conjunto de processos que ocorrem com as proteínas (proteólise), os lipídios (lipólise) e os açúcares (glicólise) (RANDAZZO et al., 2010; ALBENZIO et al., 2013).

Nos queijos o sabor ou “flavour” constitui um dos critérios mais importantes para a sua aceitação e o consumo. O sabor/”flavour” resulta de um conjunto complexo de substâncias voláteis e não voláteis provenientes das atividades microbiológicas e bioquímicas, que ocorrem durante o processo de elaboração e maturação (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2014). Logo, observa-se que todas as modificações ocasionadas pelas ações proteolíticas, lipolíticas e glicolíticas influenciam na aceitabilidade dos queijos.

O evento bioquímico mais importante encontrado no processo de maturação de queijos é a proteólise, que envolve a ação de enzimas presentes no leite e agente coagulante; de enzimas microbianas, originadas pelas bactérias lácticas adicionadas no processo do produto. Este processo ocorre devido à degradação da caseína e liberação de peptídeos e aminoácidos, que sofrem um processo de catabolismo formando

compostos voláteis como aminas, ácidos (isobutírico, isovalérico e valérico) e ésteres (WOLF et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

A lipólise é um processo bioquímico caracterizado pela hidrólise dos triglicerídeos, com a liberação de glicerol e ácidos graxos, devido à ação enzimática. Os ácidos graxos de cadeia curta (C4-C12) que são liberados por esta reação afetam diretamente as características aromáticas do queijo (BONTINIS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2014). Os ácidos graxos liberados podem reagir e produzir outros compostos aromáticos como: metil cetonas, ésteres alifáticos e aromáticos, aldeídos, lactonas e álcoois; os quais conferem sabores característicos e predominantes em determinados queijos (DELGADO et al., 2010; KONDYLI et al., 2013). Além da influência na produção de compostos aromáticos, a ação de bactérias com efeitos probióticos à queijos, podem acarretar na liberação e síntese de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) que são considerados promovedores da saúde.

A glicólise conduz a degradação da molécula de lactose, a qual é rapidamente convertida em ácido láctico pela ação das bactérias lácticas. Este ácido produzido servirá também como substrato para o desenvolvimento microbiano. O composto intermediário formado durante a conversão de lactose em ácido láctico é o piruvato e este composto pode ser convertido em várias substâncias aromáticas de cadeia curta, como: diacetil, acetona, acetaldeído, etanol e acetato (ONG; SHAH, 2009; VOIGT et al., 2010).

O potencial do queijo de coalho caprino como um alimento funcional, especialmente como uma matriz alimentar com fonte de diferentes bactérias probióticas, por exemplo, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis*, foi reportado anteriormente (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012; SANTOS et al., 2012). No entanto, estudos que cobrem as alterações proteolíticas, lipolíticas e glicolíticas que resultam da adição de bactérias probióticas durante o processamento e armazenamento de queijos de coalho caprino convencional e probióticos ainda não foram descritos. Neste contexto, na presente pesquisa objetivo-se avaliar o efeito da adição de bactérias probióticas, particularmente de bactérias lácticas *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis*, na sua forma isolada e combinada, sobre o perfil químico de queijo de coalho caprino probiótico em comparação com queijo caprino elaborado com cultura mesófila convencional “starter”, composta por *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CAPRINOCULTURA LEITEIRA NO MUNDO E NO BRASIL

A produção de leite caprino no mundo tem exibido um grande potencial econômico devido a suas qualidades nutricionais, seu baixo poder alergênico e devido a sua utilização na fabricação de uma ampla variedade de produtos, como queijos, iogurtes, sorvetes e bebidas lácteas (RIBEIRO; RIBEIRO, 2010).

Os países que destacam-se na criação de caprinos são do Mediterrâneo, Oriente Médio, Europa Oriental e países Sul Americanos. No Mediterrâneo, a produção de leite de cabra é considerada a mais tradicional e significativa do mundo, pois nesta região, em média 95 % do leite produzido é utilizado para consumo em sua forma *in natura* ou processado originando derivados lácteos (ROHENKOHL et al., 2011).

As cabras possuem excelente adaptação climática sendo predominantemente encontradas em países localizados em áreas tropicais e subtropicais, em secas de baixo potencial agrícola e podendo ser adaptável até mesmo em terras marginais, além disso, o pequeno porte do animal permite que grandes rebanhos serem criados em pequenas áreas (BRAGA LÔBO et al., 2010).

O Brasil é considerado o maior produtor de leite caprino da América do Sul, onde a produção ocorre principalmente nas Regiões Nordeste, Sul e Sudeste. Dentre estas regiões, o Nordeste concentra o maior rebanho caprino do País, representando mais de 75% da produção nacional. A Paraíba e o Rio Grande do Norte destacam-se entre os Estados brasileiros obtendo maiores produções (SILVA; GUIMARÃES; OLIVEIRA, 2012; QUEIROGA et al., 2013).

Considerando as condições do semiárido brasileiro onde os índices pluviométricos são baixos e de distribuição irregular, a criação de caprinos no Nordeste do Brasil apresenta excelente alternativa para o incentivo ao agronegócio. A caprinocultura leiteira tem sido uma atividade cada vez mais promissora nessa região, devido a incentivos governamentais, deixando de ser uma atividade de subsistência e assumindo uma grande importância sócio-econômica (BANDEIRA et al., 2007).

O estado da Paraíba tem uma produção de 18.000 mil litros de leite por dia e nos últimos anos ocorreu o incentivo através da compra da produção de leite caprino pelo



governo estadual e das ações do “Pacto Novo Cariri”, que promoveu um sistema de aquisição, industrialização e distribuição de leite, o “Programa do Leite”, que também incluiu o Sertão Paraibano. Diante deste incentivo a renda de muitas famílias de agricultores de base familiar, vem a cada dia melhorando, onde um total de 1.133 famílias agricultoras depende desta atividade e estão distribuídas em 37 associações, que possuem 11 pequenas usinas de beneficiamento (RIET-CORREA et al., 2013).

## 2.2 QUEIJO DE COALHO CAPRINO

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) “queijo de coalho é o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação”. É um queijo semi rígido, com médio a alto teor de umidade produzido a partir de leite de vaca cru ou pasteurizado ou de leite de cabra (BRASIL, 2001).

O queijo de coalho caprino é um produto cujo consumo vem crescendo, devido ao aumento da demanda por produtos lácteos de cabra. Queijo de coalho é um queijo tradicional, parcial ou totalmente cozido, produzido e consumido em todo o Nordeste do Brasil por mais de 150 anos (QUEIROGA et al., 2013). É um produto de grande valor comercial por uma série de razões: o seu processo de produção de baixo custo e simples, o alto rendimento de processo, o seu baixo potencial alergênico, alta digestibilidade, bem como o seu excelente valor nutricional e devido ao seu suave sabor salgado e ácido (SANTOS et al., 2012; SILVA et al., 2012).

O coalho é um dos principais ingredientes na fabricação de queijo de coalho, na qual possui a função de coagular a caseína presente no leite, conferindo as características próprias do produto. Entretanto, a coagulação da caseína também pode ser obtida devido ao decréscimo do pH até ao seu ponto isoelétrico, que é aproximadamente 4,6. Para este método de coagulação (ácida) utiliza-se, normalmente, a ação de bactérias lácticas selecionadas (MIER; IBÁÑEZ; ORTIZ, 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

Para a obtenção da coalhada, a partir da coagulação enzimática, faz necessário inicialmente adicionar bactérias lácticas “starter”, a fim da produção de ácido láctico, que

consequentemente irá reduzir o pH do meio. A redução do pH facilita a ação do coalho sobre a caseína, pois a acidez reduz sua carga elétrica, diminuindo a estabilidade da micela. A seleção do tipo de bactérias lácticas “starter” a serem adicionadas é realizada em função do tipo de queijo pretendido. Dentre os gêneros mais reportados na literatura estão *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (PERRY, 2004; MOREIRA, 2011).

Devido às especificidades do leite de cabra, o queijo de coalho caprino apresenta propriedades químicas que o torna um produto apreciável pelos consumidores. O perfil proteico deste tipo de queijo exibe características específicas, como a redução ou ausência da  $\alpha_{s1}$ -caseína e diferenças estruturais da  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactalbumina, o que o torna com baixo poder alergênico, permitindo assim o seu consumo por indivíduos que possuem alergia a proteína de produtos lácteos (ALBENZIO; SANTILLO, 2011).

O perfil lipídico do queijo de coalho caprino também apresenta propriedade interessante que estimula o consumo do mesmo. Produtos lácteos de ruminantes são as principais fontes de ácidos linoleico conjugado (CLA), que é um grupo de isômeros de ácido linoleico que têm sido associados na promoção da saúde e redução do risco de doenças em seres humanos, por apresentar excelente potencialidade bioativa, originando propriedades anti-inflamatória, anti-câncer, anti-cancerígena, anti-aterogênica e anti-diabetogênica (O'SHEA et al., 2012; MARRONE et al., 2014).

### 2.3 BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS EM QUEIJO

Os probióticos são considerados micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor, quando ingeridos (OLIVEIRA et al., 2012). As primeiras associações da ingestão de probióticos com efeitos benéficos à saúde ocorreram no início dos anos de 1900, onde a ação dos micro-organismos foi interligada à longevidade de camponeses búlgaros e a proteção contra bactérias prejudiciais à saúde (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Depois destas evidências diversos estudos foram realizados e comprovaram os benefícios ocasionados pela ação de probióticos na saúde humana, sendo eficazes no tratamento de distúrbios gastrointestinais, infecções respiratórias e sintomas alérgicos,

reduz o colesterol no sangue, melhora a imunidade, auxilia aumentando a absorção de minerais, proporcionam efeitos anti-mutagênicos, anti-cancerígenos, anti-hipertensivo, dentre outros (GARCIA-RUIZ, 2014; RIBEIRO et al., 2014).

As bactérias lácticas probióticas são Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa e possuem principalmente, como resultante final de seu metabolismo o ácido láctico. Essas culturas podem apresentar caráter homofermentativo ou heterofermentativo obrigatório ou facultativo (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

A homofermentação é caracterizada devido a conversão das hexoses em quase exclusivamente ácido láctico (via de Embden-Meyerhor). Já na heterofermentação obrigatória, as hexoses são convertidas tanto em ácido láctico, quanto em etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP (via 6-fosfogluconato/fosfocetolase). Entretanto, esta fermentação também pode ser realizada de forma facultativa, pois as hexoses podem ser convertidas semelhantemente à homofermentação ou em alguns casos serem convertidas em ácido láctico, acético e/ou etanol, dependendo da estirpe utilizada (GOMES; MALCATA, 1999; VASILJEVIC; SHAH, 2008) .

Para a seleção da estirpe probiótica a ser adicionada nos alimentos, como o queijo, deve-se considerar tanto os produtos resultantes de seu metabolismo, quanto a sua viabilidade frente a matriz, pois para garantir esses efeitos positivos supracitados, o alimento deve veicular uma quantidade mínima de  $10^7$  ufc  $g^{-1}$  ou  $mL^{-1}$  até o momento do consumo e o micro-organismo deve apresentar-se viável, resistindo às condições gastrointestinais. Portanto, diante disto o micro-organismo antes de ser considerado probiótico, deve passar por diversos testes, como de viabilidade na matriz alimentar, *in vitro* e *in vivo* (GARCIA et al., 2012).

Os gêneros probióticos mais utilizados, devido à resistência em diferentes tipos de queijos, são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. *Lactobacillus* são bactérias ácido lácticas apresentadas em forma de cocos ou bacilos, possuem temperatura ótima de desenvolvimento de 25 à 30 °C, são consideradas neutrófilas (pH ótimo de 5,5 à 6,0). Podem exibir diferentes características dependendo de sua espécie, apresentando tolerância ao oxigênio ou anaeróbias, homofermentativas ou heterofermentativas obrigatória ou facultativa (GOMES; MALCATA, 1999; DU TOIT et al., 2011).

Bifidobactérias exibem desenvolvimento em meio anaeróbico, sendo otimizado em intervalo de temperatura de 36 a 43 °C e pH de 6,0 a 7,0, podendo ser tolerada em

4,5 a 8,5 (CRONIN et al., 2011). Possuem diferentes formas, como hastes curtas, curvadas e bifurcadas em formato de Y, que podem ser modificadas de acordo com a espécie (GOMES; MALCATA, 1999). A característica marcante desse gênero de bactérias lácticas é resultante do seu metabolismo, que age de forma especial produzindo além do ácido láctico, o ácido acético, através da heterofermentação, em que dependendo da espécie, como a *B. lactis* esta produção é mais intensificada (BOYLSTON et al., 2004; RODRIGUES et al., 2011).

Existem na literatura vários estudos incorporando esses gêneros de bactérias lácticas em vários tipos de queijos, como em queijo minas frescal, adicionado de *L. acidophilus*, queijo de coalho elaborado com *L. acidophilus*, *B. lactis* e *L. casei*, de forma isolada e queijo cremoso adicionado de *L. plantarum*, *L. paracasei*, isoladamente, queijo Scamorza adicionado de co-cultura de probióticos (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) (GOMES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; BURNS et al., 2012; COMAN et al., 2012; ALBENZIO et al., 2013); entretanto, em todos os estudos, ocorre a recomendação da utilização dos probióticos como alternativa para produção de queijos, impactando no seu valor nutricional e qualidade sensorial.

O queijo de coalho caprino apresenta-se como uma excelente alternativa de veículo para bactérias lácticas probióticas, principalmente devido a sua composição físico-química que favorece a viabilidade destes micro-organismos, como o pH e o alto teor de umidade (SANTOS et al., 2012; GARCIA et al., 2012).

A adição de bactérias lácticas probióticas, ao queijo de coalho caprino, que já possui benefícios inerentes a sua composição físico-química, apresenta-se como uma alternativa para elevar a qualidade do produto, tornando-o um alimento funcional, além de provocar alterações físico-químicas no produto final, que pode influenciar positivamente a aceitabilidade do consumidor (OLIVEIRA et al., 2012; VO; KIM, 2013).

## 2.4 PRINCIPAIS VIAS BIOQUÍMICAS EM QUEIJO

Durante o período de processamento e estocagem do queijo, diversos metabolismos bioquímicos ocorrem e conferem alterações predominantes na textura e

no desenvolvimento do *flavour* básico do produto. Estas reações são provenientes da ação enzimática de origem microbiana e animal presente no coalho e/ou no leite. Entre as reações que ocorrem durante o processamento, destacam-se a proteólise, a lipólise e a glicólise (RANDAZZO et al., 2010; STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

#### **2.4.1 Proteólise**

A proteólise constitui-se de um evento bioquímico muito importante encontrado no processo de maturação de queijos, que consiste na degradação da proteína, resultando em peptídeos de médio e baixo peso molecular e aminoácidos livres. Esta degradação envolve a ação de enzimas, presentes no leite e no agente coagulante; e de enzimas microbianas, originadas pelas bactérias lácticas adicionadas no processo do produto, na degradação de proteínas. Como resultado deste conjunto de ação proteolítica, originam-se compostos responsáveis pelo sabor e aroma específicos dos queijos e modificações na textura do produto (WOLF et al., 2010; GARCIA et al., 2012).

As enzimas que atuam no processo de proteólise são as endoproteínases, que hidrolisam nas ligações peptídicas específicas do interior da cadeia polipeptídica e as exopeptidases, que hidrolisam um aminoácido de cada vez, em ambas as extremidades N-terminal (aminopeptidases) e C-terminal (carboxipeptidases) (HAYALOGLU et al., 2013; STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

A atividade proteolítica é executada em duas fases sequenciais: uma no início da maturação, que é denominada como proteólise primária ou em extensão, realizada principalmente pela ação das enzimas resultantes do agente coagulante (coalho) ou endógenas do leite; e outra iniciada durante a maturação. Esta segunda etapa de proteólise, é denominada como proteólise secundária ou o grau de profundidade, em que se realiza principalmente pela ação das enzimas originadas pelas bactérias lácticas adicionadas na elaboração do produto. A proteólise primária resulta principalmente na degradação da caseína e liberação de polipeptídeos e a secundária na degradação dos polipeptídeos à peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (BONTINIS et al., 2012).

Devido à proteólise secundária ser resultante da ação de enzimas originadas pelas bactérias lácticas, a adição de culturas probióticas em queijo poderá influenciar nas características finais do produto, pois os probióticos possuem um amplo espectro de enzimas que poderão proporcionar diante do seu metabolismo, diferentes ações proteolíticas (RANDAZZO et al., 2010; ALBENZIO et al., 2013).

#### **2.4.2 Lipólise**

A lipólise é processo bioquímico responsável pela hidrólise dos lipídios resultando na liberação de ácidos graxos de cadeia média e curta. A liberação desses ácidos graxos de baixo peso molecular, por ação lipolítica desempenha um papel crucial no desenvolvimento do aroma e sabor do queijo (SANTOS et al., 2012; RANDAZZO et al., 2010). A lipólise pode ser influenciada pelo sistema metabólico de bactérias ácido lácticas “starter” e propiônicas, leveduras ou bolores presentes no queijo (MCSWEENEY; SOUSA, 2000).

Este evento bioquímico também pode proporcionar alterações quanto ao aspecto nutricional, porque além de aumentar a liberação de ácidos graxos de cadeias poli-insaturadas, e provocar a redução de triglicerídeos hepáticos (O’SHEA et al., 2012).

Com a liberação de ácido linoleico, também pode ocorrer ação de isomerasas e produção de isômeros de ácido linoleico (CLA- ácido linoleico conjugado). Os CLAs apresentam excelente potencialidade bioativa, originando propriedades anti-inflamatória, anti-câncer, anti-cancerígena, anti-aterogênica e anti-diabetogênica (MARRONE et al., 2014). Segundo Prandini, Sigolo e Piva (2011), já existe um potencial associado à presença de algumas bactérias lácticas, como Bifidobactérias, Propionibactéria, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus*, com a produção de isômeros do ácido linoleico (CLA).

#### **2.4.3 Glicólise**

O processo metabólico glicolítico conduz através de várias reações a degradação da molécula de lactose, a qual é rapidamente convertida em ácido láctico

pela ação das bactérias lácticas. O ácido láctico produzido servirá também como substrato para o desenvolvimento microbiano. O composto intermediário formado durante a conversão de lactose em ácido láctico é o piruvato e este composto também pode ser convertido em várias substâncias aromáticas de cadeia curta, tais como: diacetil, acetona, acetaldeído, etanol e acetato (VOIGT et al., 2010; MOREIRA, 2011).

A produção de ácido láctico é muito importante em queijos, pois acarreta na redução do pH do produto, influenciando a solubilidade e conseqüentemente na textura do mesmo. Além do ácido láctico a via glicolítica pode resultar na produção de outros ácidos orgânicos que proporcionará características específicas ao perfil aromático do produto final, principalmente em queijos fresco (ONG; SHAH, 2009; SOUZA et al., 2014).

## 2.5 VOLÁTEIS EM QUEIJO

O perfil aromático constitui um dos critérios mais importantes da qualidade do queijo para a aceitação do consumidor. Estes compostos compõem o aroma do produto que juntamente com o gosto básico formará o sabor característico do mesmo (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2014).

Segundo Delgado et al. (2011), o desenvolvimento do *flavour* básico do queijo é formado pelo equilíbrio complexo entre um conjunto de substâncias voláteis e não voláteis, provenientes das atividades microbiológicas e bioquímicas, que são sucedidas desde a matéria prima em que a compõe e durante todo o processo de elaboração e maturação.

Dentre as reações que ocorrem durante o processamento e maturação do queijo, destacam-se a glicólise, a proteólise e a lipólise. Estas reações ocasionam a liberação de substâncias de baixo peso molecular, voláteis, responsáveis ou precursores do aroma peculiar do produto (RANDAZZO et al., 2010). Na glicólise, o piruvato é formado através da conversão de lactose em ácido láctico e este composto é precursor da origem de várias substâncias voláteis como, diacetil, acetona, acetaldeído, etanol, acetato e ácido acético (VOIGT et al., 2010; MOREIRA, 2011).

Já os compostos liberados pela proteólise também influenciam o aroma específico do produto. Os peptídeos hidrofóbicos e de baixo peso molecular, resultante

da ação proteolítica são responsáveis pelo sabor amargo em queijos e outros compostos da degradação proteica que passam por um processo de catabolismo formam compostos voláteis como aminas, ácidos (isobutírico, isovalérico e valérico), tióis e ésteres (STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

Entretanto, os ácidos graxos de cadeia curta (C4 - C12) que são liberados pela ação lipolítica, por serem voláteis, afetam também as características do aroma do queijo. Estes podem reagir e produzir outros compostos aromáticos como: metil cetonas, ésteres alifáticos e aromáticos, aldeídos, lactonas, álcoois, dentre outros (SANGALETTI et al., 2009).

Para a realização da análise de compostos voláteis em queijo utiliza-se a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC - MS). Esta técnica permite a separação dos analitos a ser estudado, sua identificação e quantificação à uma sensibilidade muito alta, possibilitando a detecção de traços residuais (MOREIRA et al., 2013). Entretanto, várias técnicas de extração dos compostos voláteis foram estudadas e reportadas na literatura (LIKENS; NICKERSON, 1964; MADRUGA et al., 2009; LORENZO, 2014), como:

- Extração líquido-líquido - É uma técnica que utiliza grande quantidade de solvente orgânico e que se emprega a aplicação de calor à amostra podendo acarretar na formação de artefatos e degradação de compostos;
- Extração em fase sólida - Apresenta limitações como a saturação dos poros do polímero pelos componentes da amostra e utiliza solventes orgânicos para a eluição;
- Destilação-extração simultânea - Realiza em uma única etapa a extração e a concentração dos compostos voláteis, porém necessita-se da aplicação de temperatura elevada;
- *Headspace* dinâmico - É uma técnica que necessita de um sistema específico e muito bem controlado, devido a extração que é realizada à vácuo, por uma captura numa armadilha que é formada por um material poroso;
- Microextração em fase sólida (SPME) que consiste de uma fibra de sílica fundida, de diâmetro muito pequeno, podendo ser revestida com diferentes fases estacionárias. Devido a não utilização de solventes e o fácil manuseio a técnica de SPME é a mais empregada nos estudos recentes.



A extração por SPME é realizada utilizando uma fibra que se encontra no interior de uma agulha, que com o auxílio de um holder pode ser exposta ou não. Existem vários tipos de revestimento da fibra, como o polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano / divinilbenzeno (PDMS-DVB), carboxen / polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), carbowax / divinilbenzeno (CW-DVB) e Polidimetilsiloxano / divinilbenzeno / Carboxen (PDMS-DVB-CAR). O PDMS e o PA extraem analitos baseado no processo de absorção e os demais revestimentos no processo de adsorção (CALDAS et al., 2011).

Para que ocorra a captura dos compostos voláteis pela fibra a amostra analisada é alocada em frasco de vidro hermeticamente fechado e submetido a uma determinada temperatura até que ocorra a formação do *headspace*, durante o tempo de equilíbrio. Depois a fibra é exposta ao *headspace* para que ocorra a dessorção, durante certo tempo de extração (DELGADO et al., 2011).

Esses parâmetros, tempo de equilíbrio, tempo de extração e temperatura de extração devem ser testados de tal forma a se obter as condições ideais de extração para que possibilite a captura de uma maior quantidade de compostos voláteis. Esses fatores são importantes porque influenciam diretamente na captura dos compostos, pois com o aumento da temperatura, tanto o coeficiente de difusão do analito aumenta, quanto o mesmo pode degradar, ou pode ocorrer à formação de compostos que não são específicos do composto analisado e o tempo de equilíbrio e de extração é significativo para que ocorra o aumento da massa extraída (PÉREZ-PALACIOS et al., 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

A elaboração dos queijos de coalho caprino convencional e adicionados de bactérias láticas probióticas ocorreu no Laboratório de Técnica Dietética, pertencente ao Departamento de Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba. As diversas análises químicas foram realizadas no Laboratório de *Flavour*, pertencente ao Departamento de Engenharia de Alimentos, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, no Laboratório de Bioquímica Genética e Radiologia, pertencente ao Departamento de Biologia Molecular, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba e no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL-SP).

#### 3.2 CULTURAS E REAGENTES

Os queijos de coalho caprino foram elaborados utilizando-se culturas liofilizadas comerciais (Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil). Foram adicionadas culturas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R704, lote 3128520) (cultura “starter”); *Lactobacillus acidophilus* (LA-5, lote 3139352); *Lactobacillus paracasei* (L. casei-01, lote 3089189); e *Bifidobacterium lactis* (BB 12, lote 3100870).

Os reagentes e produtos químicos utilizados para as análises deste estudo foram adquiridos por fornecedores laboratoriais (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

#### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os queijos de coalho caprino foram processados em três bateladas, sendo que em cada ensaio foram processadas cinco formulações (Figura 1), denominadas por:

\* **QS** – queijo de coalho caprino convencional, contendo a cultura mesófila convencional (100 mg / Litro de leite) “starter” composta por *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*;

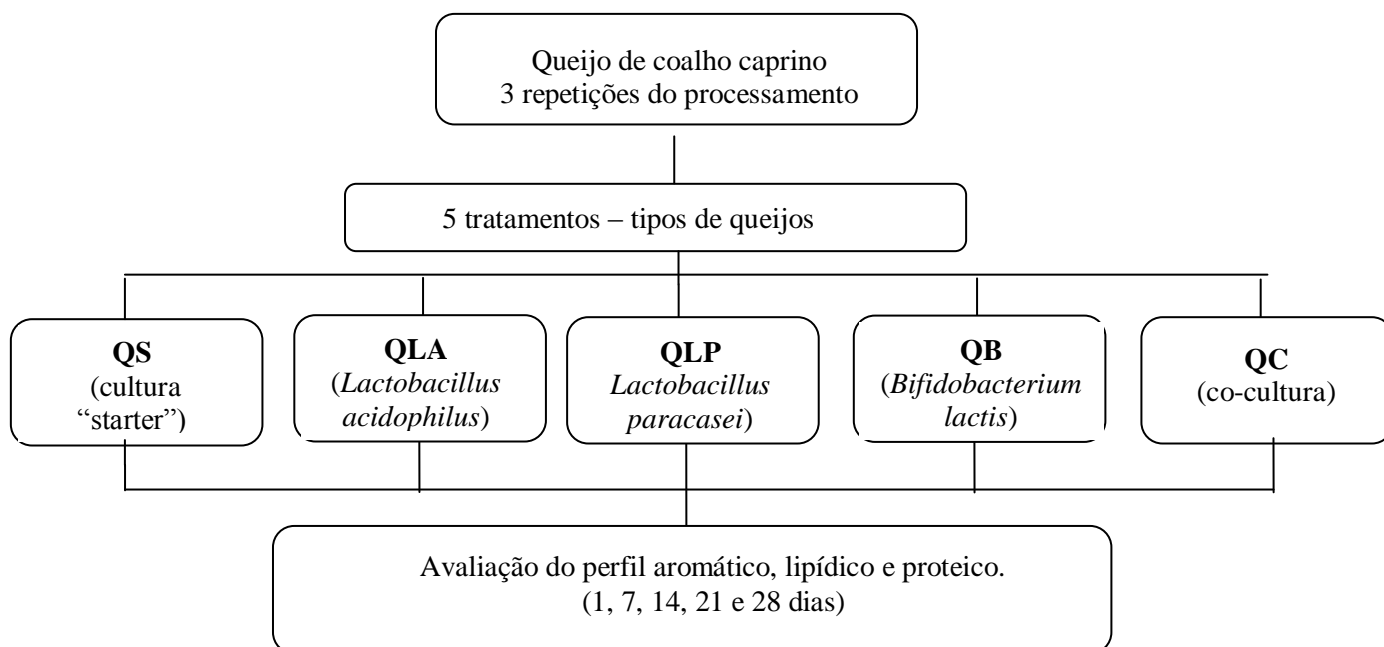
\* **QLA** – queijo de coalho caprino probiótico, contendo a cultura láctica de *L. acidophilus* (100 mg / Litro de leite);

\* **QLP** - queijo de coalho caprino probiótico, contendo a cultura láctica de *L. paracasei* (100 mg / Litro de leite);

\* **QB** - queijo de coalho caprino probiótico, contendo a cultura láctica *B. lactis* (100 mg / Litro de leite);

\* **QC** - queijo de coalho caprino probiótico, contendo uma co-cultura láctica com os três micro-organismos probióticos (*L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis*), na proporção de 1: 1: 1 - em um total de 100 mg / Litro de leite).

Para a avaliação do perfil aromático, lipídico e proteico, os queijos de coalho caprino foram armazenados a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 28 dias. As análises químicas foram efetuadas em cinco intervalos de 7 dias intercalados (1, 7, 14, 21 e 28 dias). Todas as análises propostas neste estudo foram realizadas em triplicata.



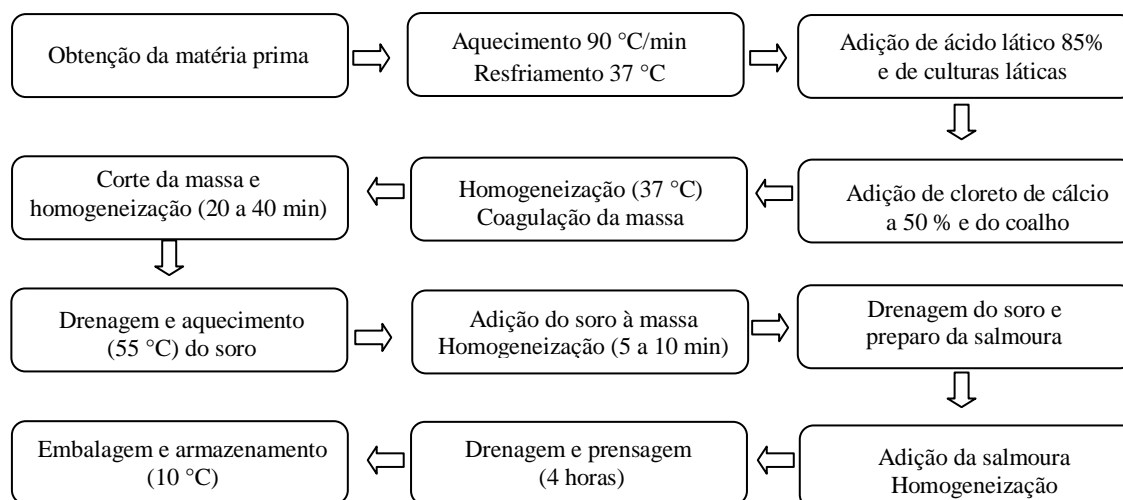
**Figura 1** - Delineamento experimental.

### 3.4 PROCESSAMENTO DOS QUEIJOS DE COALHO CAPRINO

Os queijos de coalho caprino foram produzidos de acordo com a metodologia proposta por Laguna e Landim, (2003), modificado por Oliveira et al. (2012) e Garcia et al. (2012). A elaboração do queijo de coalho caprino seguiu as etapas representadas no Fluxograma (Figura 2).

Para a elaboração de cada tratamento de queijo foram utilizados 10 L de leite de cabra refrigerado e pasteurizado (65 °C por 15 minutos), proveniente de raças nativas, pertencentes a Cooperativa de Produtores Rurais de Monteiro, Paraíba (CAPRIBOM). Inicialmente, o leite foi aquecido a  $45 \pm 1$  °C, e em seguida foi realizada acidificação direta com ácido láctico (0,85 mL 100 mL<sup>-1</sup>) numa quantidade de 0,25 mL L<sup>-1</sup>. As culturas de bactérias lácticas foram adicionadas a uma concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, sendo estas inoculadas diretamente na cuba. O cloreto de cálcio (0,5 mL L<sup>-1</sup>) e o agente coagulante comercial (0,9 mL L<sup>-1</sup>) também foram adicionados a cuba.

As cubas foram mantidas a 36 °C até a obtenção de uma coalhada firme (aproximadamente 40 minutos). O gel obtido foi suavemente cortado em cubos (1,5 a 2,0 cm) e a metade do soro foi retirado para a elaboração da salmoura (12 g L<sup>-1</sup>NaCl). A salmoura foi adicionada à massa carta e em seguida e homogeneizada e logo após realizou-se a drenagem e acondicionamento em formas retangulares perfuradas (capacidade aproximada de 250 g), as quais foram mantidas a 36 °C sob pressão por 4 horas e em seguida os queijos foram embalados a vácuo e armazenados à 10 °C.



**Figura 2** - Fluxograma de obtenção de queijo de coalho caprino.

### 3.5 VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

Consistiu no monitoramento das contagens das culturas lácticas: *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*; *L. acidophilus*; *L. paracasei*; *B. lactis* e a co-cultura, nos queijos de coalho caprino. Inicialmente, 25 g de queijo foi adicionado e homogeneizado em 225 mL de água peptonada ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e submetido a uma série de diluições ( $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ ). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS), adicinado de cisteína à 5% e incubadas a 37 °C por 48 horas, sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). A contagem foi expressa em número de unidades formadoras de colônias por grama de queijo ( $\log \text{CFU g}^{-1}$ ) (FDA, 1992).

### 3.6 AVALIAÇÃO QUÍMICA DOS QUEIJOS DE COALHO CAPRINO

#### 3.6.1 Perfil aromático

##### *Otimização de extração*

Os compostos voláteis das amostras de queijo de coalho caprino foram extraídos pela técnica de HS-SPME, a qual foi otimizada através de um planejamento experimental. A finalidade da realização da otimização foi determinar a condição ótima de extração, na qual fosse alcançada a captura de uma maior quantidade de compostos aromáticos do queijo de coalho caprino. Os parâmetros da etapa de extração (Tabela 1) dos compostos voláteis de queijo de coalho caprino foram testados utilizando valores descritos na literatura (DELGADO et al., 2010; HAYALOGLU et al., 2013; KONDYLI et al., 2013).

Para a realização da otimização foi utilizado um planejamento experimental fatorial (Delineamento Composto Central Rotacional)  $2^3$  com três variáveis independentes (tempo de equilíbrio, temperatura e tempo de extração), totalizando 8

experimentos + 3 repetição do ponto central + configuração estrela (2x3), resultando em 17 experimentos finais (Tabela 2).

**Tabela 1.** Variáveis independentes e níveis do planejamento DCCR, para extração de compostos voláteis em queijo de coalho caprino.

Fatores <sup>a</sup>	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Tempo de equilíbrio (minuto)	4	10	20	30	36
Tempo de extração (minuto)	6	20	40	60	74
Temperatura de extração (°C)	21	30	45	60	69

<sup>a</sup> Variáveis independentes

**Tabela 2.** Planejamento experimental  $2^3 + 3$  repetição do ponto central + configuração estrela (2x3).

Ensaio	Tempo de equilíbrio (min) <sup>a</sup>	Tempo de extração (min) <sup>a</sup>	Temperatura de extração (°C) <sup>a</sup>	Número de picos <sup>b</sup>
1	- (10)	-(20)	-(30)	-
2	+(30)	-(20)	-(30)	-
3	- (10)	+(60)	-(30)	-
4	+(30)	+(60)	-(30)	-
5	-(10)	-(20)	+(60)	-
6	+(30)	-(20)	+(60)	-
7	-(10)	+(60)	+(60)	-
8	+(30)	+(60)	+(60)	-
9	- $\alpha$ (4)	0(40)	0(45)	-
10	+ $\alpha$ (36)	0(40)	0(45)	-
11	0(20)	- $\alpha$ (6)	0(45)	-
12	0(20)	+ $\alpha$ (74)	0(45)	-
13	0(20)	0(40)	- $\alpha$ (21)	-
14	0(20)	0(40)	+ $\alpha$ (69)	-
15	0(20)	0(40)	0(45)	-
16	0(20)	0(40)	0(45)	-
17	0(20)	0(40)	0(45)	-

<sup>a</sup> Valores codificados e reais das variáveis independentes;

<sup>b</sup> Variável dependente.

### *Extração dos compostos voláteis*

Após obtenção dos parâmetros ótimos da extração, foi realizada a extração dos voláteis dos queijos de coalho caprino probióticos e convencional, nas cinco

formulações (QS, QLA, QLP, QB e QC) durante os cinco tempos de estudo (1, 7, 14, 21 e 28 dias) de armazenamento.

Vinte gramas de queijo previamente triturado foram transferidas para frasco de vidro de 80 mL, fechado com tampa de rosca contendo um orifício central de 3 mm de raio. O sistema foi submetido a aquecimento de 45 °C em banho-maria por 20 minutos antes da exposição da fibra. Após esse período de aquecimento, a fibra de SPME (DVB/CAR/PDMS 75 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) foi exposta ao *headspace*, fase gasosa acima da amostra, por 40 minutos a 45 °C. Em seguida, a fibra foi retraída para dentro da agulha. Depois do processo concluído, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo gasoso a 270 °C, durante 10 minutos em modo splitless, onde ocorreu a dessorção dos compostos.

#### *Separação e identificação*

Os compostos voláteis das amostras de queijo de coalho caprino foram separados e identificados utilizando um cromatógrafo a gás Varian Saturn 2000R 3800 acoplado a um detector de massas Varian Saturn 2000R 2000 e uma coluna apolar low bleeding DB5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

A programação da temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 40 °C por 10 minutos, seguida de rampa de 5 °C /minuto até atingir 240 °C, mantendo-se nesta temperatura por 11 minutos, concluindo em tempo de corrida equivalente a 61 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL / minuto.

O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons com uma temperatura da fonte de 200 °C, e com energia de ionização de 70 V, variação de scan de m/z 29 a m/z 400 a 3.33 scans/s.

Para a identificação dos compostos voláteis, uma solução padrão de n-alcenos homólogos (C7 - C30) foi analisada antes da injeção da amostra, para a obtenção do cálculo posterior do Índice de Retenção Linear (IRL) dos voláteis. Utilizou-se também para a identificação dos compostos o banco de espectros da própria biblioteca do GC/MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 1.7), comparando-se os espectros e os valores dos IRL dos voláteis dos extratos do queijo de coalho caprino

com os publicados na literatura (ATASOY et al., 2013; HAYALOGLU et al., 2013; MADRUGA et al., 2013). A quantificação dos voláteis foi obtida através da normalização das áreas dos compostos e expressos em percentual de área (%).

### 3.5.2 Perfil de ácidos graxos

A metilação dos ácidos graxos presentes nos extratos lipídicos, obtidos a partir do método descrito por Folch, Less e Stanley (1957) foi realizada seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (Varian 430 - GC, California, EUA), acoplado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica fundida (CP WAX 52 CB, VARIAN, Califórnia, EUA) com dimensões de 60 m x 0,25 mm e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. Foi utilizado o hélio como gás de arraste (vazão de 1 mL / minuto). As condições do CG foram: Temperatura do injetor 250 °C; a temperatura inicial do forno foi de 40 °C por 2 minutos, aumentando-se 10 °C  $\text{min}^{-1}$  até atingir 180 °C, permanecendo-se por 30 minutos, em seguida aumentou-se novamente 10 °C  $\text{min}^{-1}$  e atingindo-se 240 °C e fixou-se por 34 minutos, com um tempo total de corrida de 86 minutos; a temperatura do detector foi de 260 °C. Alíquotas de 1,0  $\mu\text{L}$  do extrato esterificado foram injetadas em injetor tipo Split/Splitless. Os cromatogramas foram registrados em *software* tipo *Galaxie Chromatography Data System*. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões Supelco ME19 - Kit (*Fatty Acid Methyl Esters C4 - C24*).

### 3.5.3 Perfil proteico

#### *Determinação de proteína solúvel*

A dosagem de proteína solúvel foi determinada seguindo o método do reagente de Folin, como descrito por Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.



### *Análise de proteólise*

As determinações dos teores de nitrogênio total (NT) (991.20) e nitrogênio solúvel (NS) em ácido tricloroacético (TCA) (991.21) foram realizadas utilizando o método de Kjeldahl, seguindo a metodologia da AOAC (2000). O teor de nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 foi determinado segundo Andreatta et al. (2007). A proteólise foi avaliada com o índice de proteólise em extensão (IPE) e índice proteólise em profundidade (IPP), utilizando as equações:  $IPE = (NS \text{ a pH } 4,6) / NT \text{ (nitrogênio total)} \times 100$ ; e  $IPP = (NS \text{ em TCA}) / NT \times 100$  (Andreatta et al., 2007).

### *Análise do Perfil Eletroforético*

Este experimento foi realizado utilizando-se a técnica descrita por Laemmli (1970). O gel de aplicação (stacking gel) foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris - HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação foi montado formando um gradiente de 7,5 a 17,5% de poliacrilamida em tampão Tris - HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras oriundas dos extratos protéicos, foram preparadas seguindo a metodologia descrita por Egito et al. (2002). A corrida foi realizada sob amperagem constante (25 mA) e ao final da corrida, o gel foi retirado da placa e fixado em TCA 12,5% por uma hora, sendo então corado com Coomassie brilliant blue R - 250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8 v/v/v). Os pesos moleculares das frações proteicas do queijo, foram comparadas mediante a utilização de marcador de peso molecular de 12 à 225 kDA (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

### *Análise de hidrofobicidade de peptídeos*

A separação dos peptídeos por hidrofobicidade foi realizada utilizando coluna Nova - Pak C18 (4,6 m x 250 mm, 4  $\mu$ m de tamanho de partícula, cartridge, Waters, Irlanda), conectada a um HPLC (Varian, Waters 2690, Califórnia, EUA). O volume de injeção do extrato solúvel (0,2 g/mL) foi 20  $\mu$ L e a fase móvel foi constituída em:

Eluente A (água ultra-pura à 1% de ácido trifluoroacético) e Eluente B (acetonitrila à 1% de ácido trifluoroacético). Um gradiente linear do eluente (A) e eluente (B) foi aplicado durante 60 minutos em fluxo de 1 mL / minuto e a detecção foi realizada a 218 nm.

#### *Análise do Perfil de aminoácidos livres*

Os aminoácidos livres dos queijos avaliados foram extraídos mediante a agitação orbital por 60 minutos, com ácido clorídrico a 0,1 M, seguida de derivação em pré-coluna com fenilisotiocianato (PITC), de acordo com White, Hart e Fry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989). A separação dos derivativos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 - Luna - Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de pH 6,4 e uma solução de acetonitrila a 40%. A injeção da amostra foi efetuada automaticamente (50  $\mu$ L) e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 mL / minuto, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 45 minutos e os resultados foram expressos em mg de aminoácido por 100 g de amostra, onde a quantificação foi realizada mediante a adição do padrão interno ácido  $\alpha$ -aminobutírico.

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A otimização foi conduzida utilizando o Software Statistica, versão 5.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). As respostas foram avaliadas através da Análise de Variância (ANOVA) a 5% de significância. A interpretação estatística dos demais dados do presente estudo foi realizada utilizando Análise Variância (ANOVA), seguindo de análise fatorial até um nível de significância de 1% a 5%. O pacote estatístico utilizado foi do software Assistat, versão 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o Unscrambler<sup>®</sup> X.1 (CAMO S.A.) e foram codificados em Matlab 6.5 (Mathworks, USA).

## REFERÊNCIAS

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: effect on the quality of dairy products. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 33-40, 2011.

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M.; RUGGIERI, D.; NAPOLITANO, F.; SEVI, A. Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. **Journal Dairy of Science**, v. 96, n. 5, p. 2781-2791, 2013.

ANDREATTA, E.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V.; MARQUES, M. C.; GIGANTE, M. L.; OLIVEIRA, C. A. F. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 166-170, 2007.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Gaithersburg, MD, USA, 2000.

ATASOY, A. F.; HAYALOGLU, A. A.; KIRMACI, H.; LEVENT, O.; TÜRKOĞLU, H. Effects of partial substitution of caprine for ovine milk on the volatile compounds of fresh and mature Urfa cheeses. **Small Ruminant Research**, v. 115, n. 1-3, p. 113-123, 2013.

BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; MELO, L. S. S.; MELO, C. B. Características de Produção da Caprinocultura Leiteira na Região do Cariri na Paraíba. **Ciência veterinária nos trópicos**, v. 10, n. 1, p. 29-35, 2007.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 375-387, 2004.

BONTINIS, T. G.; MALLATOU, H.; PAPPAS, E. C.; MASSOURAS, TH.; ALICHANIDIS, E. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 193-201, 2012.

BRAGA LÔBO, R. N.; FACÓ, O.; LÔBO, A. M. B. O.; VILLELA, L. C. V. Brazilian goat breeding programs. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2-3, p. 149-154, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa; queijo de coalho e queijo de manteiga. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 de julho de 2001.

BURNS, P.; CUFFIA, F.; MILESI, M.; VINDEROLA, G.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; HYNES, E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food microbiology**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2012.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

COMAN, M. M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M. C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 3, p. 346-52, 2012.

CRONIN, M.; VENTURA, M.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. V. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 4-18, 2011.

DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; GARCÍA-PARRA, J.; RAMÍREZ, R. Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 182-189, 2010.

DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1156 -1163, 2011.

DU TOIT, M.; ENGELBRECHT, L.; LERM, E.; KRIEGER-WEBER, S. Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures-an Overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 876-906, 2011.

EGITO, A. S.; MICLO, L.; LÓPEZ, C.; ADAM, A.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Separation and characterization of mares' milk alpha(s1)-, beta-, kappa-caseins, gamma-casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 4, p. 697-706, 2002.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 7 ed. AOAC International, Arlington, VA, USA, 1992.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MACHADO, T. A. D.; SOUZA, E. L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947-56, 2012.

GARCÍA-RUIZ, A.; LLANO, D. G.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; REQUENA, T.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, V. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. **Food Microbiology**, v. 44, p. 220-225, 2014.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A.; LOBOS ORTEGA, I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 666-673, 2014.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GOMES, A. A.; BRAGA, S. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; LOLLO, P. C. B.; CARVALHO, C.; AMAYA-FARFÁN, J.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Effect of the inoculation level of Lactobacillus acidophilus in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 10, p. 4777-4786, 2011.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, n.6, p.912-916, 1989.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.

HAYALOGLU, A. A.; TOLU, C.; YASAR, K. Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 187-194, 2013.

KONDYLI, E.; MASSOURAS, T.; KATSIARI, M. C.; VOUSINAS, L. P. Lipolysis and volatile compounds of Galotyri-type cheese made using different procedures. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 2-3, p. 432-436, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LAGUNA, L. E.; LANDIM, F. G. S. **Iniciando um Pequeno Grande Negócio Agroindustrial de Leite Cabra e derivados**. Embrapa Caprinos, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Informação Tecnológica, Brasília, DF, Brasil, 2003.

LIKENS, S. T.; NICKERSON, G. B. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. **Proceedings of the American Society of Brewing Chemists**, v. 5, n. 5, p. 13-34, 1964.

LORENZO, J. M. Influence of the type of fiber coating and extraction time on foal dry-cured loin volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 179-186, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MADRUGA, M. S.; ELMORE, F. S.; DODSON, A. T.; MOTTRAM, D. S. Volatile flavour profile of goat meat extracted by three widely used techniques. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1081-1087, 2009.

MADRUGA, M.; DANTAS, I.; QUEIROZ, A.; BRASIL, L.; ISHIHARA, Y. Volatiles and water- and fat-soluble precursors of Saanen goat and cross Suffolk lamb flavour. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2150-2165, 2013.

MARRONE, R.; BALESTRIERI, A.; PEPE, T.; VOLLANO, L.; MURRU, N.; D'OCCHIO, M. J.; ANASTASIO, A. Physicochemical composition, fatty acid profile and cholesterol content of "Pecorino Carmasciano" cheese, a traditional Italian dairy product. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 36, n. 1-2, p. 85-89, 2014.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening. a review. **Lait**, v.80, n.3, p.293-324, 2000.

MEDEIROS, E.; QUEIROGA, R.; OLIVEIRA, M.; MEDEIROS, A.; SABEDOT, M.; BOMFIM, M.; MADRUGA, M. Fatty acid profile of cheese from dairy goats fed a diet enriched with castor, sesame and faveleira vegetable oils. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 992-1003, 2014.

MIER, M. P.; IBAÑEZ, R.; ORTIZ, I. Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electrodialysis with bipolar membranes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 2, p. 304-3011, 2008.

MOREIRA, C. P. M. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para queijos**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar - Qualidade e Segurança Alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

MOREIRA, N.; MEIRELES, S.; BRANDÃO, T.; PINHO, P. G. Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. **Talanta**, v. 117, p. 523-531, 2013.

OLIVEIRA, E. M. G.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

ONG, L.; SHAH, N. P. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1260-1268, 2009.

O'SHEA, E. F.; COTTER, P. D.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; HILL, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic

mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.

PÉREZ-PALACIOS, T.; PETISCA, C.; MELO, A.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Quantification of furanic compounds in coated deep-fried products simulating normal preparation and consumption: Optimisation of HS-SPME analytical. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1337-1343, 2012.

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

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; PIVA, G. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 55-61, 2011.

QUEIROGA, R. D. C. R. D. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.

RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; RIBBERA, A.; CAGGIA, C. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 363-74, 2010.

RIBEIRO, A. C.; RIBEIRO, S. D. A. Specialty products made from goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2-3, p. 225-233, 2010.

RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424-431, 2014.

RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; PEREIRA FILHO, J. M.; AZEVEDO, S. S. A.; MELO, D. B.; BATISTA, J. A.; MIRANDA NETO, E. G.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 345-352, 2013.

ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R.; O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M.; MALCATA, X.; FREITAS, A. C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DEA, R. C. D.; SILVA, M. V. Study of Minas cheese shelf life. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTOS, K. M. O.; BOMFIM, M. A. D.; VIEIRA, A. D. S.; BENEVIDES, S. D.; SAAD, S. M. I.; BURITI, F. C. A.; EGITO, A. S. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2012.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691-697, 2010.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal components analysis in the software Assistat - Statistical attendance World Congress on Computers in Agriculture7, **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Reno-NV-USA, 2009.

SILVA, H. W.; GUIMARÃES, C. R. B.; OLIVEIRA, T. S. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 121-125, 2012.

SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1533-1538, 2012.

SOUZA, A. B.; COSTA JÚNIOR, L. G.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; ALMEIDA, D. F. Parâmetros de textura em queijos processados: influência da utilização de concentrados proteicos de leite e de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 181-192, 2014.

STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 8.0. Tulsa, OK, EUA.

STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 135-41, 2013.

TRIPATHI, M. K., GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225-241, 2014.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VO, T. S.; KIM, S. K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 16-17, 2013.



VOIGT, D. D.; CHEVALIER, F.; QIAN, M. C.; KELLY, A. L. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 68-77, 2010.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WOLF, I. V.; PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; ZALAZAR, C. A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. **Food Research International**, v. 43, n.4, p. 1204-1211, 2010.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **ARTIGO 1**

#### **OPTIMIZATION OF THE HS-SPME-GC/MS TECHNIQUE FOR THE ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IN CAPRINE COALHO CHEESE USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY**

---

## **OPTIMIZATION OF THE HS-SPME-GC/MS TECHNIQUE FOR THE ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IN CAPRINE COALHO CHEESE USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY**

### **Abstract:**

Caprine Coalho cheese presents great potential for a typical protected designation of origin, considering that this traditional Brazilian cheese presents a slightly salty and acid flavour, combined with a unique texture. This study optimized the SPME-GC-MS methodology for volatile analysis of Coalho cheese, which can be used as a tool of the to help in the identification of the distinctive aroma profile of this cheese. The conditions of equilibrium time, extraction temperature and time were optimized using the statistical tool factorial experimental design in the type central composite rotational delineation (CCRD)  $2^3$ , and applying the desirability function. After the evaluation, it was concluded that the optimum extraction conditions comprised equilibrium and extraction time of 20 and 40 minutes, respectively; and ideal extraction temperature of 45 °C. The optimum extraction of volatile compounds in goat Coalho cheese captured 28 volatile compounds: two alcohols, five esters, one ketone, four acids, three aldehydes, three terpenes and ten hydrocarbons. The model was validated with the same data set.

**Keywords:** dairy product, cheese, volatiles, HS-SPME-GC/MS, optimization, Response Surface Methodology.

### **1 Introduction**

Caprine cheese is a product consumed worldwide, due to the growing demand for goat dairy products. Coalho cheese is a traditional, partially-cooked or cooked curd cheese which has been traditionally produced and consumed in Northeastern Brazil [1] for over 150 years.

Caprine Coalho cheese is a very sought after product thanks to its slightly salty and acid flavour, alongside its "rubberized" texture. This unique texture is the result of its resistance to heat, which prevents it from melting when cooked. This allows the preparation of the popular "roasted Coalho cheese", with its own distinctive volatile profile [1,2]. In addition, caprine Coalho cheese is a product of great commercial value for a number of reasons: its simple low-cost production process, the high process yield, its low allergenic potential and high digestibility, as well as its excellent nutritional value [3, 4].

On the other hand, caprine Coalho cheese presents great potential for a typical protected designation of origin (PDO), since the PDO label implies that the product has distinctive characteristics that are connected to traditional production methods. The PDO could be used as a tool of the to contribute to the economical sustainability of the Northeast region, especially the rural areas. It must be mentioned that even though it has been produced for over one century, Coalho cheese is still manufactured using non-standardized processes, which causes variability mainly in sensory properties [1], and consequently in its aroma profile.

It is well known that the volatile profile is very important for the organoleptic quality of cheeses. It can be considered a finger print since the flavour of a cheese variety is the result of a specific balance between the volatile compounds produced during the manufacture process. According to Delgado et al [5], the basic flavor of any cheese is formed by the complex balance involving non-volatile and volatile substances from the microbiological and biochemical activities, which range from the raw material, the process and maturation. The volatile compounds are among the most important criteria of cheese quality for consumer acceptance. These compounds comprise the flavor characteristic of the same [6].

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) has been extensively employed to identify and quantify aroma/flavor components in several types of foodstuffs, including cheeses. Traditional extraction methods for cheese volatiles, such as steam or vacuum distillation, are hardly used anymore [7, 8], mainly due to their poor recovery rate of highly volatile compounds and the disappearance of thermally sensitive compounds associated with the formation of artifacts [9].

Headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) is a technique currently used for a great variety of cheeses, as it provides many advantages: it is an easy-to-use, relatively fast and sufficiently sensitive technique which does not require organic solvents. The results obtained with this technique are very promising and a considerable number of compounds have already been described in a great variety of cheeses [9, 10, 11, 12]; however, information regarding the volatile fraction and the use of SPME extraction of volatiles from caprine Coalho cheese (known to have a unique sensory profile) is not yet present in literature.

In order to have capture of volatile compounds by the fibre sample analyzed is allocated in a tightly closed glass bottle and subjected to a given temperature until the formation of the headspace to occur during equilibration. After the fibre is exposed to the headspace for desorption to occur during a certain time of extraction [5].

The extraction parameters equilibrium time, extraction time and extraction temperature should be tested so as to obtain the optimum conditions for that permits the capture of a greater amount of the compounds, since these factors are the most frequently reported in the literature as factors that influence the performance of the analysis [13].

Having said that, this study, through the use of response surface methodology (RSM), aimed to develop and optimize the Solid Phase Micro Extraction technique (SPME), so that it may be used to characterize the volatile fraction of Coalho cheese. The optimization of HS-SPME-GC/MS methodology could be used as a tool to help the identification of the distinctive aroma profile of Coalho cheese, and will be used in further studies on the aroma profile of raw and cooked caprine Coalho cheese.

## **2 Results and Discussion**

### *2.1 Optimization of SPME parameters for volatiles in caprine Coalho cheese using the response surface methodology*

The experimental results of the CCRD shown in Table 1 and in the Pareto chart (Figure 1) expose the importance of the variables analyzed and their interactions. The

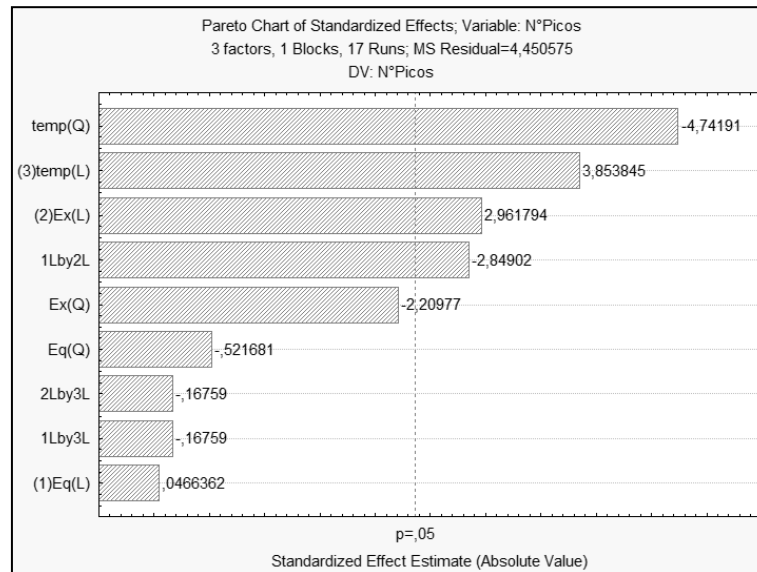
number of peaks is a very important variable for determining the optimization parameters of chromatographic analysis, the greater the amount of detected peaks, the greater the quantity of compounds trapped by the fibre and detected by gas chromatography. The resulting  $R^2$  in the model was 0.884, and, according to the F test, this was a significant regression, bearing in mind that the  $F_{\text{calculated}} > F_{\text{tabled}}$  and showed no lack of fit ( $F_{\text{calculated}} < F_{\text{tabled}}$ ). Therefore, the following equation for the dependent variable “number of peaks” was obtained:

$$y = 26,47 + 1,69 (\text{Ex}) + 2,20(\text{T}) - 1,29 (\text{Ex}^2) - 2,88(\text{T}^2) - 2,13 (\text{Eq} \cdot \text{Ex}) \quad (1)$$

Where  $y$  (dependent variable) is the response value predicted by the model. In this model  $\text{Ex}$  (extraction time),  $\text{Eq}$  (equilibrium time) and  $\text{T}$  (extraction temperature) are the independent variables. The dependent variable in this study is the number of peaks in the chromatograms.

Table 1. Central composite rotatable design ( $2^3$ ) with the independent variables, levels and experimental responses ( $y$  = number of peaks) of the SPME extraction of volatiles in Coalho cheese.

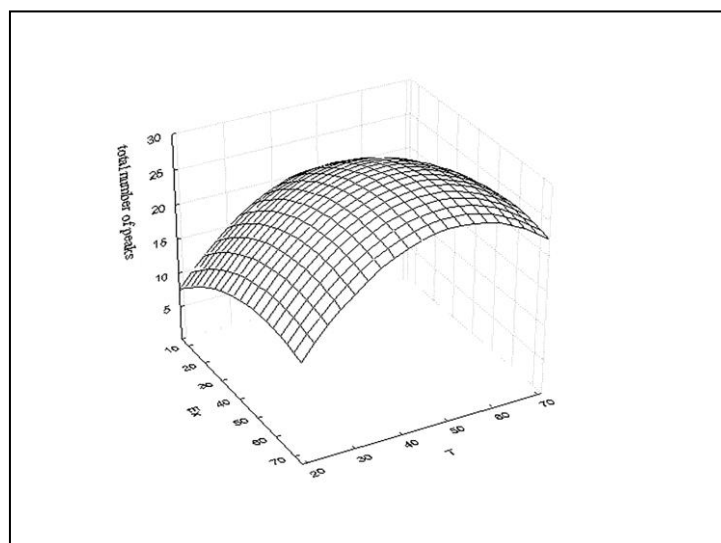
Assay	Independent variables			Response function
	Equilibrium time (min)	Extraction time (min)	Extraction temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Number of peaks
1	-(10)	-(20)	-(30)	16
2	+(30)	-(20)	-(30)	20
3	-(10)	+(60)	-(30)	24
4	+(30)	+(60)	-(30)	19
5	-(10)	-(20)	+(60)	23
6	+(30)	-(20)	+(60)	26
7	-(10)	+(60)	+(60)	30
8	+(30)	+(60)	+(60)	25
9	$-\alpha(3)$	0(40)	0(45)	24
10	$+\alpha(37)$	0(40)	0(45)	26
11	0(20)	$-\alpha(6)$	0(45)	19
12	0(20)	$+\alpha(74)$	0(45)	25
13	0(20)	0(40)	$-\alpha(20)$	16
14	0(20)	0(40)	$+\alpha(70)$	19
15	0(20)	0(40)	0(45)	29
16	0(20)	0(40)	0(45)	30
17	0(20)	0(40)	0(45)	28



Ex (extraction time), Eq (equilibrium time) and temp (extraction temperature).  
Figure 1. Pareto graph of the dependent variable 'number of peaks'.

After analyzing the data, a response surface was obtained with the purpose of finding the optimal region and thus verify which combination of the independent variable values produced the best response.

From the Pareto Chart (Figure 1), it can be observed that equilibrium time and the interactions between 1 and 3, and between 2 and 3 were not significant. Therefore, when creating the response surface, equilibrium time was fixed at the center point (20 minutes).



Ex (extraction time) and T (extraction temperature).

Figure 2. Response surface for the dependent variable 'number of peaks'. Equilibrium time (Eq) was fixed at the center point.

Based on the response surface (Figure 2), it can be observed that the region with the best response values is located between the marks of 40 minutes and 74 minutes of extraction time (Ex), and between the temperatures (Temp) of 38 °C and 70 °C. However, it is in the central region of the surface, where the central points of extraction time and temperature can be found, that the maximum response value can be seen.

According to Pérez-Palacio et al [14], an increase in extraction temperature leads to the release of a greater quantity of volatile compounds into the headspace, since the rise in temperature is proportional to the increase in the analyte diffusion coefficient. The diffusion rate is proportional to the temperature rise, because this increase leads to increased thermal energy of the product. However, high temperatures can also lead to the formation of aromatic compounds derived from the Maillard reaction or from caramelization. It may also cause the degradation of some of the compounds from the product.

Longer exposure of the fibre to the headspace enables greater capture of the compounds until polymer saturation. Therefore, it is usually necessary to have longer extraction times during analysis before balance between the headspace and the fibre polymer is reached [15, 16].

## *2.2 Desirability parameter*

Figure 3 shows that the optimal values of the parameters investigated in this study were located in the exact region of the center point. The desirability parameter indicates the optimal region, taking into account all the variables at the same time. The optimization desirability value was 0.748 which is considered a good, acceptable value, according to the values reported by [17].

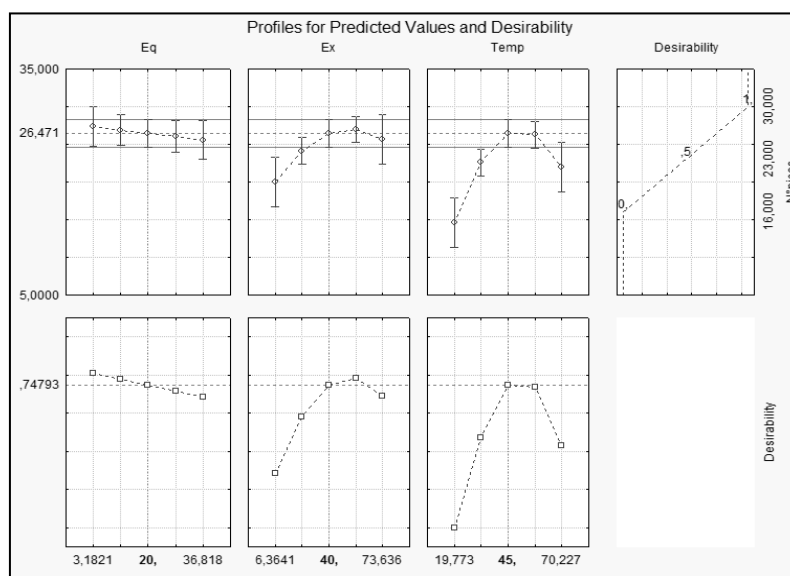
Trujillo-Rodríguez et al [15], who studied the type of polymer used in extraction via HS-SPME-GC/MS, reported that the optimal conditions for cheese extraction are obtained with a temperature of 45 °C and extraction time of 40 minutes. The desirability values (extraction time of 40 minutes and the extraction temperature 45 °C) that these authors have obtained are the same as the ones obtained in this study.

In their research on Gokceada cheese, a traditional type of goat cheese, Hayaloglu et al [18] reported that the ideal conditions for volatile compound extraction



were obtained at 40 °C with extraction time of 30 minutes. These conditions differ from those found in this study. Bontinis et al [19] also reported a desirability value different from the one obtained in this study(extraction time of 40 minutes and the extraction temperature 45 °C); they performed the extraction of volatiles from Xinotyri cheese, a traditional Greek goat cheese, at the temperature of 65 °C with extraction time of 20 minutes.

Times of 30 and 20 minutes obtained for the extraction of GokceadaXinotyri and cheeses, respectively, were not sufficient to effectively capture a large number of volatile compounds in cheese, especially a fresh product that does not have intense flavour (Table 1). However, the temperature used for extraction of volatile compounds was smaller compared with that indicated by Bontini et al [19] for extracting cheese Xinotyri (65 °C) because the author at said elevated temperature, may result in the production of compounds resulting from the Maillard reaction and hence to influence the identification of compounds which are not characteristic of the product.



Eq (equilibrium time), Ex (extraction time) and temp (extraction temperature).

Figure 3. Profile of Predicted Values and Desirability for the number of peaks captured by HS-SPME-GC-MS in Coalho cheese.

### 2.3 Model validation

Applying the desirable value of each dependent variable to the equation of number of peaks (Equation 1), the result obtained was 26 peaks. With the central points reproduced in triplicate the mean of the experimental data was 30 and the standard deviation was 1. When submitted to ANOVA and to a t-test ( $p < 0.05$ ), both predicted and experimental values showed no significant difference. This indicates that the proposed model was adjusted to the experimental data. Besides, the experimental values obtained were all within the 95 % confidence interval.

### 2.4 Characterization of the volatile compounds found in caprine Coalho cheese

A total of 32 volatile compounds were detected after being extracted (through SPME) from caprine Coalho cheese: 5 alcohols, 5 esters, 3 ketones, 6 acids, 3 aldehydes, 3 terpenes, and 7 hydrocarbons (Table 2). Among these compounds, the most abundant were decane and hexanoic acid with the latter responsible for the characteristic smell of goat dairy products.

The alcoholic compounds found in cheeses can be formed in a number of metabolic reactions: through fermentation, ketone reduction, amino acid and fatty acid degradation, all performed by microbiological and biochemical activities [19, 20]. Most of these compounds are usually formed during storage but are quickly dispersed due to their high volatility [18].

The most abundant alcoholic compound found in the Coalho cheese samples was ethanol. Delgado et al [21] also reported its presence in ovine cheese. The esters detected in the caprine Coalho cheese samples were ethyl acetate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate. According to Bontini et al [19], esters are originated in the esterification reaction between short chain fatty acids and ethanol. Among the esters found in the samples, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, and ethyl octanoate were the most common. All three compounds are originated from acids which possess the typical smell of caprine cheese. In their research, Delgado et al [5] also found high proportions of these three esters.

Table 2. Volatile compounds in the headspace of in caprine Coalho cheese.

Number	Compounds	Q <sub>1</sub> <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup>	Q <sub>2</sub> <sup>c</sup>	CV	Q <sub>3</sub> <sup>d</sup>	CV	LRI <sup>e</sup>	ID <sup>f</sup>
Acohol									
1	Ethanol	4,42	73	3,73	20	1,13	43	<600	A
3	2-Butanol	ND <sup>g</sup>	-	21,16	1	ND	-	<600	A
8	3-methyl-1-Butanol	0,35	3	3,67	12	1,07	10	760	A/B
11	1-Pentanol	ND	-	0,16	104	0,55	87	<600	A
26	2-methyl-1-Decanol	1,78	18	ND	-	ND	-	1160	A/B
Esters									
4	Ethyl Acetate	0,87	63	1,77	99	2,01	70	<600	A
12	Ethyl Butanoato	3,38	14	8,99	1	4,82	54	808	A/B
19	Ethyl Hexanoato	4,48	13	6,32	1	10,24	8	1007	A/B
28	Ethyl Octanoato	5,50	6	2,11	14	4,86	34	1198	A/B
30	Ethyl Decanoato	3,10	15	ND	-	ND	-	1404	A/B
Ketones									
2	2-pentanone	3,64	18	3,4	18	1,70	53	<600	A
7	3-hydroxy-2-Butanone	3,91	99	8,73	14	ND	-	722	A/B
15	2-Heptanone	2,32	7	4,2	12	1,53	11	899	A/B
Acids									
5	Acetic acid	ND	-	0,89	5	15,20	3	<600	A
13	Butanoic acid	2,96	10	4,02	32	3,10	20	823	A/B
14	Pentanoic acid	ND	-	3,09	6	0,73	23	880	A/B
20	Hexanoic acid	16,00	20	7,6	71	13,76	60	1016	A/B
27	Octanoic acid	1,47	50	0,02	2	4,17	34	1198	A/B
29	Decanoic acid	0,27	3	ND	-	ND	-	1401	A/B
Aldehydes									
6	3-methylbutanal	0,61	54	0,95	38	0,26	7	<600	A
17	Benzaldehyde	5,86	117	ND	-	ND	-	986	A/B
21	2-octenal	ND	-	ND	-	1,85	45	1033	A/B
Terpenes									
16	$\alpha$ -Pinene	2,21	3	5,51	19	5,11	3	945	A/B
31	copaene	0,83	141	1,32	14	2,56	65	1406	A/B
32	Caryophyllene	2,95	141	6,64	11	7,50	8	1460	A/B
Hydrocarbons									
9	3-ethyl-2-methyl Pentane	0,29	73	0,12	39	0,91	67	765	A/B
10	Tolueno	0,18	21	0,66	33	0,59	30	789	A/B
18	Decane	14,14	8	1,38	10	5,60	1	1003	A/B
22	3-methyldecane	1,15	5	ND	-	1,78	7	1059	A/B
23	4-methyl-1-Decene	2,10	2	ND	-	ND	-	1069	A/B
24	Undecane	9,16	0	3,56	9	8,97	11	1104	A/B
25	4-methydecane	5,02	23	ND	-	ND	-	1118	A/B

<sup>a</sup> Artisanal caprine cheese; <sup>b</sup> % CV, percentage of coefficient of variation; <sup>c</sup> caprine cheese - 1; <sup>d</sup> caprine cheese - 2; <sup>e</sup> Linear retention indices; <sup>f</sup> A, mass spectrum and LRI agree with those of an authentic compound ran on VF-5ms column; B, mass spectrum agrees with reference spectrum in the NIST/EPA/NIH mass spectral database and LRI agree with those in the literature [25, 26, 27]; <sup>g</sup> nd, not detected.

Three ketones were found in the caprine Coalho cheese samples: 2-pentanone, 2-butanone-3-hidroxy and 2-heptanone. 2-heptanone can be found in other types of cheese and has an herbaceous aroma. It is the product of  $\beta$ -oxidation of free fatty acids, which are released during lipolysis [8, 19]. Atasoy et al [22], who studied ovine, caprine and mixed Urfa cheese, reported the detection of this compound in both fresh and matured samples. Hayaloglu et al [18] also found 2-heptanone in caprine Gokceada cheese.

Acids are compounds that can be formed through lipolysis, proteolysis and lactose fermentation. It is the presence of acids such as hexanoic acid, octanoic acid and decanoic acid that gives goat dairy products their distinctive smell. These three acids are also known as caproic acid, caprylic acid and capric acid, respectively [18, 19]. The acids found in caprine Coalho cheese were butanoic acid, hexanoic acid, octanoic acid, and decanoic acid; hexanoic acid was the most abundant of these four. Butanoic acid is known in literature for its rancid, unpleasant smell, and its presence in cheese samples is therefore undesirable [5].

The aldehydes found in the Coalho cheese sample were 3-methylbutanal, heptanal, and benzaldehyde, the last being the most abundant. Benzaldehyde has a typical almond-like aroma and was also detected by various authors in their researches [21, 23]. Aldehydes are known as transitory volatile compounds, because they are quickly converted into acids or alcohols. Some are formed through the Strecker reaction, such as 2-methylbutanal [22, 24].

Three types of terpenes were detected in the cheese samples:  $\alpha$ -pinene, copaene, and caryophyllene. According to Wolf et al [23], terpenes are compounds produced by plants and therefore their presence in milk or in dairy products is due to whatever vegetables the animal has eaten. This way, the presence of these compounds may help in determining the geographical origin of the cheese. The other aromatic compounds found in the caprine Coalho cheese samples were 7 hydrocarbons, of which decane was the most common.

### 3 Material and Methods

#### 3.1 Standards

The homologous series of n-alkanes C8 - C25, used for calculating the linear retention index of volatiles, was supplied by Fluka (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

#### 3.2 Extraction of Coalho cheese volatile compounds by HS-SPME

Samples were prepared by weighing 20 g of grated Coalho cheese in 60 mL vials sealed with apolytetrafluoroethylene silicone septum (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The system was submitted to an extraction temperature (T) of 20, 30, 45, 60, and 70 °C in a water bath and an equilibrium time (Eq) of 3, 10, 20, 30, and 37 minutes before fibre exposure. Prior to extractions, the fibre was conditioned to the gas chromatograph injector at the temperature of 270°C for 60 minutes. Afterwards, the SPME fibre was exposed to the headspace, above the Coalho cheese sample for an extraction time (Ex), of 6, 20, 40, 60, and 74 minutes. Then the fibre was retracted into the needle and transferred to the gas chromatograph injector where analytes were desorbed. The values tested were all obtained from previous studies, in which they had yielded satisfactory results for SPME extraction in cheeses [18, 21, 24].

Prior to the optimization of the SPME conditions for the analysis of volatile components, a screening was performed to select the appropriate fibre. Fibres were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Four fibres were tested and compared: divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 µm; polydimethylsiloxane (PDMS) 100 µm; Carbowax/divinylbenzene (CW/DVB) 65 µm and polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), 65 µm. Before extraction began, each extraction fibre was conditioned according to the manufacturer's prescription.

Of the four fibres evaluated, the divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane 50/30 µm (DVB/CAR/PDMS) fibre presented the best performance, with a higher

number of volatiles in the cheese samples, and was therefore selected to be used in the HS-SPME volatiles analysis in Coalho cheese.

### 3.3 Optimal conditions for the extraction of Coalho cheese volatiles

To optimize extraction by HS-SPME, a central composite rotational design (CCRD) was used, in which three independent variables were analyzed: equilibrium time (Eq), extraction time (Ex) and extraction temperature (T): The design included seventeen trials which comprised eight factorial points, six axial points and three replicates of the central point for knowing the experimental error associated with measurements. The response surface model was elaborated using the following equation:

$$y = \beta_0 + \beta_1Eq + \beta_2Ex + \beta_3T + \beta_4Eq^2 + \beta_5Ex^2 + \beta_6T^2 + \beta_7Eq.Ex + \beta_8Eq.T + \beta_9Ex.T \quad (2)$$

Where y is the response value predicted by the model;  $\beta_0$  is the mean coefficient (or the constant)  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  are the linear,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$  and  $\beta_6$  the quadratic and  $\beta_7$ ,  $\beta_8$  and  $\beta_9$  the interaction coefficients. In this model Ex (extraction time), Eq (equilibrium time) and T (extraction temperature) are the independent variables. The dependent variable in this study is the number of peaks in the chromatograms.

### 3.4 Statistical analysis

The response function (y) was used to perform regression analyses and analyses of variance (ANOVA) for the regression. The equation model was fitted to experimental data to yield the proposed model. Response surface graph and desirability parameters were generated for the response function (y), i.e. total number of peaks. The executed analyses, desirability and response surface were performed with STATISTICA 8.0 software [28]. After response surface analysis and graphing of the desirability for the maximum number of volatiles extracted, the proposed model was validated by

performing new assays in triplicate. The results were compared with the estimated response ( $y$ ) by Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

### *3.5 Gas chromatography-mass spectrometry conditions*

For separation and identification of compounds extracted from Coalho cheese, a Varian 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Saturn 2000R mass detector (Varian Inc., Palo Alto, California) and VF-5ms column (60 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m) was used (Agilent, Santa Clara, California).

The temperature programming of the gas chromatograph oven started at 40°C for 10 minutes, followed by a 5°C/min ramp increase up to 240°C, maintaining this temperature for 11 minutes, with a total running time of 61 minutes. This temperature programming was proposed after preliminary tests. The injector used was the split type with manual injection, maintained at a temperature of 250 °C. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.0 mL/min.

The mass spectrometer was operated by electron impact at a source temperature of 200°C and ionization energy of 70 eV and a scan range from  $m/z$  29 to  $m/z$  400 at 3.33 scan/s. The identification of volatile compounds was based on the comparison of their mass spectra with those of compounds previously analyzed, with NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 2008), or spectra published in journals. To confirm the identity of each component, the linear retention index (LRI) was calculated using the retention times of a homologous series of  $n$ -alkanes C8 - C25 and also by comparing the LRI of authentic compounds analyzed under similar conditions [18, 22, 25].

## **4 Conclusions**

The optimal conditions for SPME extraction of volatile compounds from caprine Coalho cheese were obtained with equilibrium time of 20 minutes, extraction time of 40 minutes, and extraction temperature of 45 °C. Optimization was confirmed by the desirability parameter, which attained a value considered good and acceptable by

literature. Therefore, the model obtained was validated. In the optimal conditions 28 volatile compounds from caprine Coalho cheese were detected.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and the Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for the financial support and the scholarship granted to the first author.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **References**

- [1] Queiroga, R.C.R.E.; Santos, B.M.;Gomes, A.M.P.;Monteiro, M.J.;Teixeira, S.M.;Souza, E.L.;Pereira, C.J.D.;Pintado, M.M.E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Sci. Technol.* 2013, 50, 538-544.
- [2] Silva, R.A.; Lima, M.S.F; Viana, J.B.M.; Bezerra, V.S.; Pimentel, M.C.B; Porto, A.L.F.; Cavalcanti, M.T.H.; Lima Filho, J.L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chem.* 2012, 135, 1533-1538.
- [3]Santos, K.M.O.; Bomfim, M.A.D.; Vieira, A.D.S.; Selene D. Benevides, S.D.; Saad, S.M.I.; Buriti, F.C.A.; Egito, A.S. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acids as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. *Int. Dairy J.* 2012, 24, 107-112.
- [4] Oliveira, E.M.G.; Garcia, E.F.; Queiroga, R.C.R.E.; Souza, E.L. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Sci. Agric.* 2012, 69, 370-379.
- [5] Delgado, F.J.; González-crespo, J.; Cava, R.;Ramírez, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chem.* 2011, 129, 1153-1163.



- [6] González-martín, I.; Hernández-hierro, J.M.; González-pérez, C.; Revilla, I.;Vivar-quintana, A.; Lobos Ortega, I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.*2014, 55, 666-673.
- [7] Moio, L.; Addeo, F. Grana Padano cheese aroma. *J. Dairy Res.*, 1998, 65, 317-333.
- [8] Vandeweghe, P.; Reineccius, G. A. Comparison of flavor isolation techniques applied to Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 1549-1552.
- [9] Concurso, C.; Verzera, A.; Romeo, V.; Ziino, M.; Conte, F. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. *Int. Dairy J.* 2008, 18, 819-825.
- [10] Januszkiewicz, J.; Sabik, H.; Azarnia, S.; Lee, B. Optimization of headspace solid-phase microextraction for the analysis of specific flavors in enzyme modified and natural Cheddar cheese using factorial design and response surface methodology. *J Chromatogr A.* 2008, 1195, 16-24.
- [11] Mallia, S.; Fernández-García, E.; Bosset, J. (2005). Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aromacompounds of three European PDO hard cheeses. *Int. Dairy J.* 2005, 15, 741-758.
- [12] Pinho, O.; Pérès, C.; Ferreira, I.M. Solid-phase microextraction of volatile compounds in “Terrincho”ewe cheese. Comparison of different fibers. *J Chromatogr A.* 2003, 1011, 1-9.
- [13] Ma, Q.L.; Hamid, N.; Bekhit, A.E.D.; Robertson, J.; Law, T.F. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. *Microchem. J.* 2013, 111, 16-24.
- [14] Pérez-Palacios, T.; Petisca, C.; Melo, A.; Ferreira, I.M.P.L.V.O. Quantification of furanic compounds in coated deep-fried products simulating normal preparation and consumption: Optimisation of HS-SPME analytical. *Food Chem.*2012, 135, 1337-1343.
- [15] Trujillo-Rodríguez, M.J.; Yu, H.; Cole, W.T.S.; Ho, T.D.; Pino, V.; Anderson J.L.; Afonso A.N. Polymeric ionic liquid coatings versus commercial solid-phase microextraction coatings for the determination of volatile compounds in cheeses. *Talanta*2014, 121,153-162.
- [16] Barros, E.P.; Moreira, N.; Pereira, G.E.; Leite, S.G.F.; Rezende, C.M.; Pinho, P.G. Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines. *Talanta* 2012, 101, 177-186.
- [17] Akhanazarova, S.; Kafarov, V. *Experiment optimization in chemistry and chemical engineering.* Mir Publishers, Moscow, 1982.

- [18] Hayaloglu, A.A.;Yasar, K.;Tolu, C.;Sahingil, D.Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. *Small Rumin.Res.* 2013, 113, 187-194.
- [19] Bontinis, T.G.;Mallatou, H.;Pappa, E.C.;Massouras, T.;Alichanidis, E. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greekgoat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Rumin.Res.*2012, 105, 193-201.
- [20] Karminarides, S.;Stamou, P.;Massouras, T. Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. *Food Chem.*2007, 100, 219-225.
- [21] Delgado, F.; González-crespo, J.; Cava, R.;García-Parra, J.;Ramírez, R. Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chem.*2010, 118, 182-189.
- [22] Atasoy, A.F.;Hayaloglu, A.A.;Kirmaci, H.;Levent, O.;Türkoğlu, H. Effects of partial substitution of caprine for ovine milk on the volatile compounds of fresh and mature Urfa cheeses. *Small Rumin. Res.*2013, 115,113-123.
- [23] Wolf, I.V.;Perotti, M.C.; Bernal, S.M.;Zalazar, C.A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial ReggianitoArgentino cheese: Characterization of ReggianitoArgentino cheese. *Food Res. Int.*2010, 43, 1204-1211.
- [24] Kondyli, E.;Massouras, T.;Katsiari, M.C.;Voutsinas, L.P. Lipolysis and volatile compounds of Galotyri-type cheese made using different procedures. *Small Rumin.Res.* 2013, 113, 432-436.
- [25] Madruga, M.S.; Guerra, I.C.D.;Queiroz, A.L.M.;Brasil, L M.S.;Ishihara, Y. M.A volatiles and water- and fat-soluble precursors of Saanen goat and cross suffolk lamb flavour. *Molecules* 2013, 18, 2150-2165.
- [26] Adams, R.P. *Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy*. 4.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007; pp. 804.
- [27] LRI & Odour Database.Available online: <http://www.odour.org.uk/>(acessado em 03/12/2014).
- [28] StatSoft, Inc. Statistica (data analysis software system), version 8.0. Tulsa, OK, EUA.

**ARTIGO 2**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS NO  
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E VOLÁTEIS DE QUEIJO DE COALHO  
CAPRINO**

---

## INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E VOLÁTEIS DE QUEIJO COALHO CAPRINO

### Resumo

Neste estudo a lipólise e o perfil de voláteis de queijos coalho caprino tradicional e probióticos foram determinados até 28 dias de armazenamento. Os queijos foram denominados QS, queijo de coalho controle elaborado com cultura “starter” de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; QLA, queijo de coalho com *Lactobacillus acidophilus*; QLP, queijo de coalho elaborado com *Lactobacillus paracasei*; QB, queijo de coalho processado com uma cultura de *Bifidobacterium lactis* e QC, queijo de coalho feito usando a co-cultura, com os 3 micro-organismos probióticos. O uso das diferentes culturas lácticas probióticas afetou o perfil lipídico e aromático dos queijos de coalho caprinos, com a concentração dos teores de gordura e colesterol durante o armazenamento. Observou-se efeito positivo da adição da cultura de *B. lactis* e da co-cultura de probióticos, no perfil de ácidos graxos e maior produção de voláteis, que resultou em maiores concentrações durante o período de estocagem do CLA (0,74 e 0,54 g/100g de ácidos graxos), comparando com os outros queijos, ótimos valores das relações AGPI/AGS (0,23 e 0,065) e DFA (50,23 e 45,08), associados à redução dos índices de aterogenicidade (2,15 e 2,38) e trombogenicidade (1,69 e 1,82). Vinte e cinco compostos voláteis foram identificados no queijo de coalho caprino, sendo eles 6 álcoois, 4 hidrocarbonetos, 4 terpenos, 3 ácidos, 3 cetonas, 3 aldeídos e 2 ésteres. Nos cinco queijos avaliados observou-se produção de ésteres ao longo do armazenamento e redução de aldeídos. Os queijos probióticos fabricados a partir de leite de cabra, adicionados do *Bifidobacterium lactis* e da co-cultura de probióticos resultaram em queijo de coalho com melhor qualidade no perfil lipídico e aromático.

**Palavras-chaves:** queijo caprino, lipólise, voláteis, ácidos graxos, produtos lácteos.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos queijos o sabor ou “flavour” constitui um dos critérios mais importantes para a sua aceitação e o consumo. O sabor/“flavour” resultam em um conjunto complexo de substâncias voláteis e não voláteis provenientes das atividades microbiológicas e bioquímicas, que ocorrem durante o processo de elaboração e maturação (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2014).

No Nordeste do Brasil, o queijo de coalho se sobressai, com produção de mais de 150 anos, como um queijo tradicional, de sabor levemente salgado e ácido, aroma suave, textura compacta e macia, sendo muito apreciado pela população local e de outras regiões do Brasil. Este queijo tem forte participação na economia da região, principalmente como fonte de renda dos fornecedores de leite, especialmente aqueles que não têm acesso a instalações de processamento de leite (OLIVEIRA et al., 2012; QUEIROGA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

A região Nordeste do Brasil se sobressai com 75% da produção de leite caprino com destaque para o estado da Paraíba, com uma produção de 18.000 mil litros de leite por dia (RIET-CORREA et al., 2013) e sua valorização em produtos lácteos diferenciados, a exemplo do queijo de coalho caprino, que poderá contribuir para a sustentabilidade econômica da região, principalmente das áreas rurais. O queijo de coalho caprino probiótico, poderia favorecer a comercialização do leite de cabra, por seu apelo nutricional, com efeitos benéficos à saúde do consumidor, e, conseqüentemente, serviria de incentivo a atividade da caprinocultura desta região. Além disso, o queijo apresenta-se como uma excelente alternativa de veículo para bactérias lácticas probióticas, principalmente devido ao seu pH, que se encontra próximo a neutralidade e ao seu alto teor de umidade (SANTOS et al., 2012; GARCIA et al., 2012).

As bactérias lácticas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são frequentemente adicionadas na produção de queijos. Estudos reportam a adição de bactérias lácticas probióticas em diferentes queijos tradicionais produzidos no Brasil, como em queijo minas frescal, adicionado de *Lactobacillus acidophilus* (COMAN et al., 2012), queijo de coalho elaborado com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*

*lactis* e *Lactobacillus casei* (RODRIGUES et al., 2011) e queijo cremoso adicionado de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* (BURNS et al., 2012).

Durante o processamento de queijo, diversas reações químicas e bioquímicas ocorrem simultaneamente. Entre elas a lipólise desempenha um papel crucial no desenvolvimento do sabor (RANDAZZO et al., 2010; SANTOS et al., 2012) e de outros compostos (VAN NIEUWENHOVE; OLISZEWSKI; GONZÁLEZ, 2009; PRANDINI; SIGOLO; PIVA, 2011; BONANNO et al., 2013; PAJOR et al., 2013). A lipólise pode ser influenciada devido ao sistema metabólico de bactérias ácido lácticas, leveduras ou bolores (MCSWEENEY; SOUSA, 2000).

Quando associados à presença e ação de bactérias com efeitos probióticos à queijos, essas modificações bioquímicas podem acarretar na liberação e síntese de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) que são considerados promovedores da saúde. Além de aumentar, produzindo ou liberando AGPI, o metabolismo lipídico pode provocar a redução de triglicerídeos hepáticos (O'SHEA et al., 2012). Segundo Prandini, Sigolo e Pivo (2011), já existe um potencial associado à presença de algumas bactérias lácticas, como Bifidobactérias, Propianobacteria, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus*, com a produção de isômeros do ácido linoleico (CLA). Dentre os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), os CLAs apresentam excelente potencialidade bioativa, originando propriedades anti-inflamatória, anti-câncer, anti-cancerígena, anti-aterogênica, anti-diabetogênica, dentre outras (O'SHEA et al., 2012; MARRONE et al., 2014).

Considerando os benefícios tecnológicos ocasionados pela utilização de bactérias lácticas probióticas em queijos, além da sua ação positiva na saúde do consumidor, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da adição de bactérias lácticas probióticas - *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis* - na sua forma isolada e combinada, sobre a lipólise e o perfil aromático do queijo de coalho caprino comparando-o com o queijo de coalho caprino elaborado com cultura mesófila convencional "starter" composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CULTURAS E REAGENTES

Cinco formulações de queijo de coalho caprino foram processadas em triplicata, utilizando-se culturas liofilizadas comerciais (Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil). As culturas foram inseridas (100 mg de cada cultura para 1 litro de leite) nas diferentes formulações: QS (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* - R704, lote 3128520); QLA (*Lactobacillus acidophilus* - LA-5, lote 3139352); QPL (*Lactobacillus paracasei* - L. casei-01, lote 3089189); QB (*Bifidobacterium lactis* - BB 12, lote 3100870); QC (*L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis*, na proporção - 1: 1: 1). A cultura “starter” foi adicionada apenas no queijo denominado de QS.

Os reagentes e produtos químicos utilizados para as análises deste estudo foram adquiridos por fornecedores laboratoriais (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

### 2.2 PROTOCOLO DE FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS

Para a elaboração de cada tratamento de queijo foram utilizados 10 L de leite de cabra refrigerado e pasteurizado (65 °C por 15 minutos), proveniente de raças nativas, pertencentes a Cooperativa de Produtores Rurais de Monteiro, Paraíba (CAPRIBOM). Inicialmente, o leite foi aquecido a  $45 \pm 1$  °C, e em seguida foi realizada acidificação direta com ácido láctico ( $0,85 \text{ mL } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) numa quantidade de  $0,25 \text{ mL L}^{-1}$ . As culturas de bactérias lácticas foram adicionadas a uma concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo estas inoculadas diretamente na cuba. O cloreto de cálcio ( $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e o agente coagulante comercial ( $0,9 \text{ mL L}^{-1}$ ) também foram adicionados às cubas.

As cubas foram mantidas a 36 °C até a obtenção de uma coalhada firme (aproximadamente 40 minutos). O gel obtido foi suavemente cortado em cubos (1,5 a 2,0 cm) e a metade do soro foi retirado para a elaboração da salmoura ( $12 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ). A

salmora foi adicionada à massa carta e em seguida e homogeneizada e logo após realizou-se a drenagem e acondicionamento em fôrmas retangulares perfuradas (capacidade aproximada de 250 g), as quais foram mantidas a 36 °C sob pressão, por 4 horas e em seguida os queijos foram embalados a vácuo.

Os queijos de coalho caprino foram armazenados a 10 °C ± 2 °C durante 28 dias. As análises foram realizadas em dois intervalos (1 e 28 dias) e todas as análises propostas neste estudo foram realizadas em triplicata.

### 2.3 VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

Consistiu no monitoramento das contagens das culturas lácticas: *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*; *L. acidophilus*; *L. paracasei*; *B. lactis* e a co-cultura, nos queijos de coalho caprino. Inicialmente, 25 g de queijo foram adicionados e homogeneizados em 225 mL de água peptonada (1 g L<sup>-1</sup>) e submetido a uma série de diluições (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-5</sup>). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS), adicinado de cisteína à 5% e incubadas a 37 °C por 48 horas, sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). A contagem foi expressa em número de unidades formadoras de colônias por grama de queijo (log CFU g<sup>-1</sup>) (FDA, 1992).

### 2.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A metilação dos ácidos graxos presentes nos extratos lipídicos, obtidos a partir do método descrito por Folch, Less e Stanley, (1957) foi realizada seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago, (1973). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foram realizadas por cromatografia gasosa (Varian 430-GC, California, EUA), cujo cromatógrafo foi acoplado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica fundida (CP WAX 52 CB, Varian, Califórnia, EUA) com dimensões de 60 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme. Foi utilizado o hélio como gás de arraste (vazão de 1 mL / minuto). As condições do CG foram: Temperatura



do injetor 250 °C; a temperatura inicial do forno foi de 40 °C por 2 minutos, aumentando-se 10 °C min<sup>-1</sup> até atingir 180 °C, permanecendo-se por 30 minutos, em seguida aumentou-se novamente 10 °C min<sup>-1</sup> e atingindo-se 240 °C e fixou-se por 34 minutos, com um tempo total de corrida de 86 minutos; a temperatura do detector foi de 260 °C. Alíquotas de 1,0 µL do extrato esterificado foram injetadas em injetor tipo Split/Splitless. Os cromatogramas foram registrados em *software* tipo *Galaxie Chromatography Data System*. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões Supelco ME19 - Kit (*Fatty Acid Methyl Esters C4 - C24*).

## 2.5 PERFIL DE VOLÁTEIS

Aproximadamente 20 ± 0,1 g de queijo de coalho caprino foi colocado em frasco de vidro de 60 mL, com tampa rosqueada contendo um orifício central com raio de 3 mm e um septo forrado de Teflon. As extrações foram realizadas com um sistema SPME (Supelco, Bellefonte, PA, USA) que contém uma fibra de sílica fundida revestida com uma camada de Divinilbenzeno / Carboxen / Polidimetilsiloxano 50 / 30 µm. A agulha de aço inoxidável, alojando a fibra, penetrou o septo, e após equilíbrio à 45 °C, durante 20 minutos; a fibra foi exposta ao headspace, fase gasosa acima da amostra de queijo coalho, por 40 minutos. Após a extração, a fibra foi recolhida para dentro da agulha e transferida para o injetor do CG-EM, onde os analitos foram desorvidos.

Os valores dos parâmetros utilizados foram todos obtidos a partir de estudos anteriores, em que apresentaram resultados satisfatórios para a extração por SPME em queijos (DELGADO et al., 2010; HAYALOGLU et al., 2013; KONDYLI et al., 2013).

A análise dos voláteis do queijo coalho caprino foi realizada em cromatógrafo gasoso Varian Saturn 3800 2000R, acoplado a um detector de massa Varian Saturn 2000R 2000, acoplado com coluna VF-5ms (60 m x 0,25 mm x 0,25 mm). A programação de temperatura do forno do cromatógrafo de gasoso foi de 40 °C durante 10 minutos, seguido por um aumento de uma rampa de 5 °C / min até 240 °C, mantendo esta temperatura durante 11 minutos, com um tempo total de corrida de 61 minutos. A

temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. Utilizou-se o hélio como gás de arraste em fluxo constante de 1,0 mL / minuto.

O espectrômetro de massa foi operado por impacto eletrônico e temperatura da fonte de 200 °C, energia de ionização de 70V e faixa de varredura de m/z 29 a m/z 400 a 3,33 scan/s. A identificação dos compostos voláteis foi baseada utilizando o banco de espectros da própria biblioteca do GC/MS, NIST/EPA/NIH Mass SpectralDatabase (Versão 2008) e também comparando-se os espectros e os valores dos IRL dos voláteis dos extratos do queijo com os da literatura (ATASOY et al., 2013; HAYALOGLU et al., 2013; MADRUGA et al., 2013).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A interpretação estatística dos dados foi realizada utilizando Análise Variância (ANOVA), seguindo de análise fatorial até um nível de significância de 1% a 5%. O pacote estatístico utilizado foi do software Assistat, versão 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o Unscrambler<sup>®</sup> X.1 (CAMO S.A.) e foram codificados em Matlab 6.5 (Mathworks, USA).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Na Figura 1 pode-se observar que, durante a estocagem, os queijos analisados exibiram redução ( $p < 0,01$ ) dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), variando de 77,05 a 73,70 mg/100g de ácidos graxos, e aumento ( $p < 0,01$ ) dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), obtendo alteração de 0,21 a 1,87 mg/100g de ácidos graxos. O queijo elaborado com a *B. lactis* apresentou maior redução ( $p < 0,01$ ) da concentração de AGCL (76,95 a 73,70 mg/100g de ácidos graxos) e, conseqüentemente, um

acréscimo ( $p < 0,01$ ) de AGCC (0,24 a 1,79 mg/100g de ácidos graxos), comparando com os demais queijos de coalho caprino (QS, QLA, QLP, QC).

As bactérias lácticas possuem ação lipolítica, levando à liberação de ácidos graxos de cadeia curta e média (RODRIGUES et al., 2012). Dentre as bactérias lácticas analisadas, o *B. lactis* e o *L. paracasei* apresentaram maior atividade lipolítica, e, conseqüentemente, maior produção de AGCC. É notável que, em geral, o queijo de cabra apresenta-se como excelente fonte de ácidos graxos de cadeia curta (C4 a C8) em comparação ao queijo de leite de vaca (CHILLIARD; ROUEL; LEROUX, 2006), este fato também foi observado no presente estudo. Os AGCC são responsáveis pela intensificação do aroma característico de queijo, principalmente de cabra, que possuem como marcadores do aroma os ácidos caprónico, caprílico e cáprico (BONTINIS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2014).

Todos os queijos avaliados não exibiram alterações ( $p > 0,01$ ) no somatório de ácidos graxos saturados (AGS) ao longo do armazenamento, com concentrações de 67,02 a 70,92 mg/100g de ácidos graxos. A maior proporção dos AGS foi detectada para os ácidos - palmítico (23,24 a 31,84 mg/100g de ácidos graxos), esteárico (14,16 a 18,61 mg/100g de ácidos graxos), mirístico (9,80 a 11,55 mg/100g de ácidos graxos) e láurico (3,46 a 4,21 mg/100g de ácidos graxos). O consumo de AGS está relacionado com o possível aumento do teor de colesterol de baixa densidade (LDL) no sangue. Entretanto, sabe-se que o ácido palmítico na presença de ácido linoleico, não apresenta efeitos negativos que possam afetar a saúde do consumidor, enquanto o ácido esteárico é considerado neutro nesta questão de saúde (CABIDDU et al., 2006).

Analisando a Figura 2 pode-se observar que o somatório dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) destacaram-se ( $p < 0,01$ ) nos queijos elaborados com *B. lactis* e cultura “starter” durante os 28 dias de armazenamento, cujos percentuais de aumento foram de 7% (QB) e 8% (QS), respectivamente. Paralelamente, o tratamento com a co-cultura e com o controle tiveram variações ( $p < 0,01$ ) no somatório dos AGPI durante o armazenamento de 28 dias. Observou-se um aumento nos AGPI dos queijos elaborados com a co-cultura (de 5,12 a 6,04 mg/100g de ácidos graxos), e uma redução nos AGPI dos queijos produzidos com a cultura “starter” (de 5,12 a 4,44 mg/100g de ácidos graxos). O comportamento apresentado no queijo elaborado com co-cultura é desejável,

uma vez que existe uma relação entre o consumo de ácidos graxos poli-insaturados, em destaque para os CLAs, com os efeitos positivos à saúde humana (JOY et al., 2014).

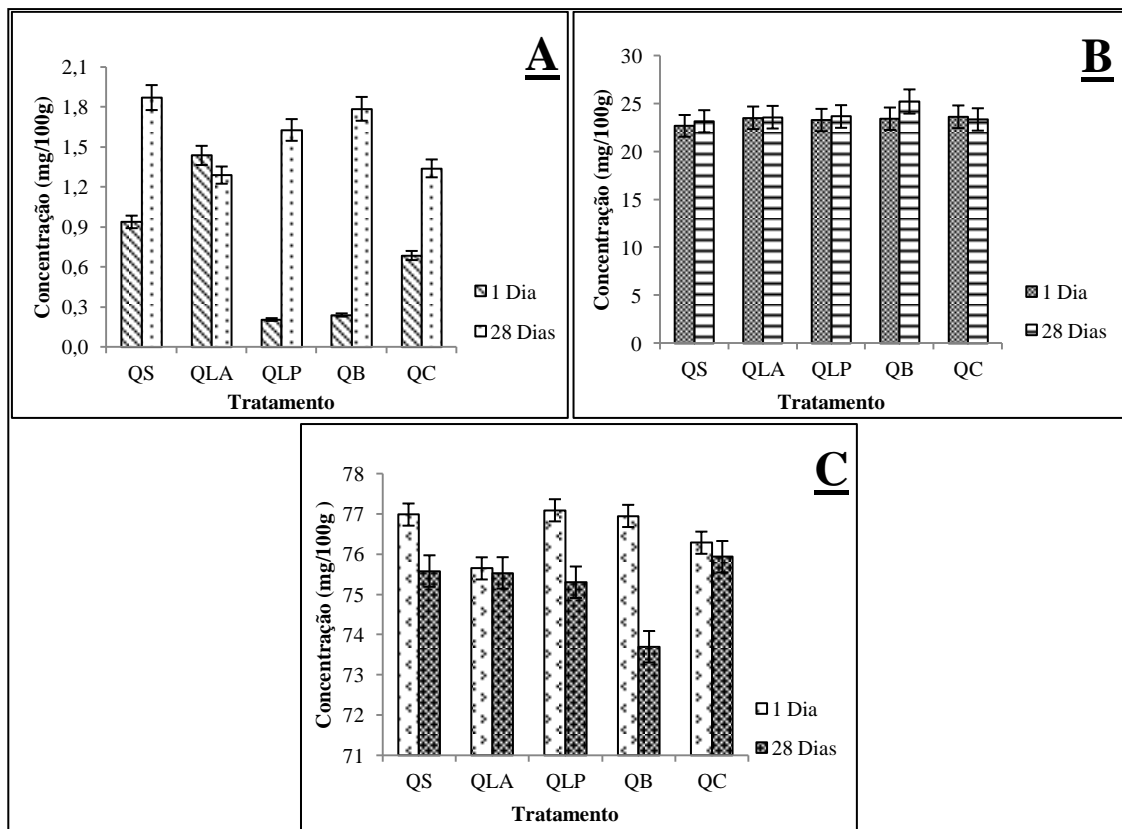


Figura 1. Perfil de ácidos graxos: **(A)** - Somatório de ácidos graxos de cadeia curta - AGCC; **(B)** - Somatório de ácidos graxos de cadeia média - AGCM; **(C)** - Somatório de ácidos graxos de cadeia longa - AGCL, de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.

Alguns probióticos possuem a capacidade de sintetizar ácidos graxos poli-insaturados, destacando-se os CLAs, porém essa síntese é mediante a presença de ácido linoleico em sua forma livre. Dentre os probióticos destacados na literatura as Bifidobactérias apresentam maior potencial de síntese destes ácidos (SANTOS et al., 2012; O’SHEA et al., 2012). Entretanto, o efeito sinérgico das culturas probióticas

compostas na co-cultura foi responsável pelo aumento ( $p < 0,01$ ) da produção de ácidos graxos poli-insaturados no queijo QC.

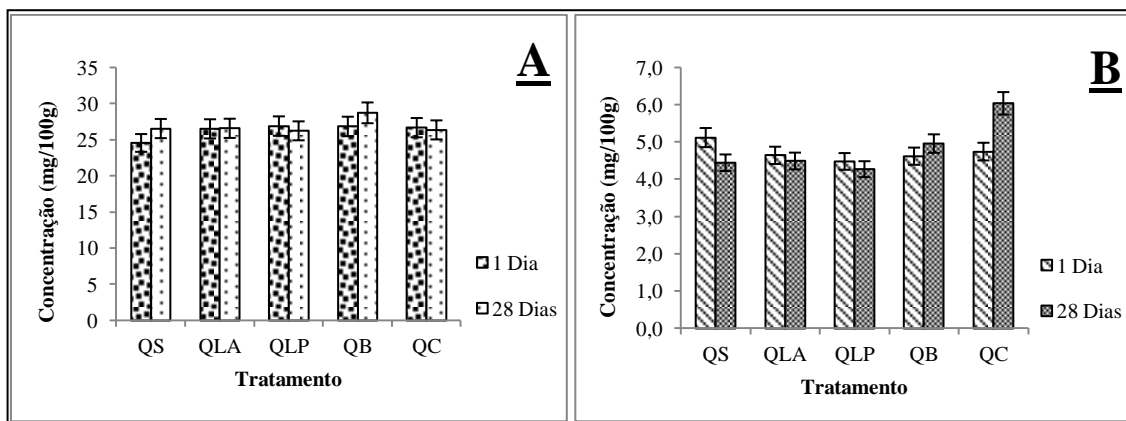


Figura 2. Perfil de ácidos graxos: (A) - Somatório de ácidos graxos monoinsaturados - AGMI; (B) - Somatório de ácidos graxos poli-insaturados - AGPI de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento à  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.

Para avaliar a contribuição de CLA ao consumo humano, valores foram expressos em  $\text{g } 100\text{ g}^{-1}$  de produto (Tabela 1). Neste estudo os queijos de cabra resultaram em excelente fonte de CLA para os consumidores, oferecendo entre  $0,54\text{--}0,74\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$  de queijo em um dia, valores estes semelhante aos determinados por Van Nieuwenhoeve et al. (2009) para queijos de cabra.

Os isômeros do CLA - ácido linoleico conjugado ( $\text{C}_{18:2\text{ n}6}$ ) apresentaram aumento ( $p < 0,01$ ) nas amostras QS e QB, expondo concentrações iniciais de  $0,54$  e  $0,69\text{ mg}/100\text{g}$  de ácidos graxos, respectivamente no 1º dia de armazenamento; e de  $0,66$  e  $0,76\text{ mg}/100\text{g}$  aos 28 dias de armazenamento, com aumento de 22% e 10%, respectivamente.

O queijo elaborado com a co-cultura de probióticos apresentou elevado valor de CLA ( $0,74\text{ mg}/100\text{g}$  de ácidos graxos), quando comparado com as demais amostras de queijo analisadas ( $0,54$  a  $0,71\text{ mg}/100\text{g}$  de ácidos graxos). Esta concentração manteve-

se estável (0,74 mg/100g de ácidos graxos) e alta durante todos os dias de estocagem. Este efeito é desejável no produto, pois o produto apresentará um elevado conteúdo CLA durante os 28 dias.

As concentrações iniciais de CLA estão em acordo com outros autores que relataram valores de 0,56 a 1,07 g 100 g<sup>-1</sup> para o isômero cis9, trans11 de CLA (OSMARI et al., 2011; PRANDINI; SIGOLO; PIVA, 2011; MEDEIROS et al., 2014). As cabras apresentam-se como animais capazes de produzir CLA como produtos intermediários da biohidrogenação ruminal na forma de trans10, cis12. Sabe-se que o processo tecnológico de produção do queijo pode influenciar o teor de CLA do produto, onde parâmetros como temperatura, acesso ao ar, e o tipo de cultura “starter” e de culturas adjuntas usadas no processo de fabricação são apontados como os principais agentes (COLLOMB et al., 2006; VAN NIEUWENHOVEET al., 2009; DOMAGAŁA et al., 2010). No presente trabalho, todas as condições de produção foram mantidas, exceto as bactérias utilizadas como culturas. Assim, o incremento de CLA observado ao longo do tempo de maturação pode está associado com a inclusão das diferentes culturas utilizadas.

Os isômeros dos ácidos linoleicos conjugado são importantes, porque atuam na constituição de tecidos do sistema nervoso central, na prevenção de doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e doenças inflamatórias (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2013).

A relação AGMI/AGS sofreu acréscimo ao longo da estocagem, apenas no queijo elaborado com *B. lactis*, indicando uma maior ação desta bactéria láctica na produção dos monoinsaturados e/ou redução dos saturados. Entretanto, os valores da relação AGPI/AGS variaram inicialmente de 0,06-0,07 a 0,16-0,23 aos 28 dias de armazenamento (Tabela 1). Todos os tratamentos dos queijos de coalho, em destaque o produzido com a co-cultura (aumento de 228%), expuseram elevação na relação AGPI/AGS ao longo do armazenamento.

Segundo a World Health Organization (WHO, 2003) os alimentos que apresentam relação AGPI/AGS inferiores a 0,4 são indesejáveis à dieta, devido ao seu poder hipercolesterêmico. Os ácidos graxos monoinsaturados induzem efeitos hipocolesterêmico no organismo, portanto os mesmos deveriam ser introduzidos melhor avaliação do perfil lipídico de alimentos (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2013).

Os valores da relação AGPI/AGS encontrados neste estudo foram superiores (0,07 à 0,23) ao detectados por Marrone et al. (2014) (0,08), em queijo italiano “Pecorino Carmasciano”, não probiótico. O acréscimo do valor desta relação ao longo do armazenamento pode ser justificado devido ao efeito das bactérias lácticas probióticas no queijo.

Os ácidos graxos desejáveis (AGMI+AGPI+C18:0), denominados como DFA, apresentaram aumento ( $p < 0,01$ ) nos queijos QB e QS, sobressaindo-se o QB, indicando melhor atividade da bactéria láctica *B. lactis* para a produção de um melhor perfil lipídico, comparando com os demais queijos analisados. Os valores detectados nos queijos de coalho caprino (de 45,08 à 50,23 mg/100g de ácidos graxos) foram semelhantes aos reportados por Medeiros et al. (2014) também, em queijo de coalho caprino (de 42,43 a 51,51 mg/100g de ácidos graxos).

Com exceção do queijo elaborado com *L. acidophilus* que não sofreu alteração, todos os demais queijos apresentaram redução ( $p < 0,01$ ) do índice de aterogenicidade (IA) ao longo do armazenamento (28 dias). Os IA reduziram de 2,29-2,38 para 2,15-2,34, com maior redução (>7%) para o queijo elaborado com a co-cultura. Enfatiza-se que esta redução é desejável, pois o valor do AI é diretamente proporcional aos valores de ácidos graxos (C12:0, C14:0 e C16:0) que são considerados prejudiciais a saúde.

O índice de trombosidade (IT) possui a mesma coerência, sendo desejável em valores inferiores. Apenas o queijo elaborado com *B. lactis* obteve decréscimo ( $p < 0,01$ ) (4%) no IT ao longo do armazenamento. Segundo Marrone et al. (2014), quanto menor os valores dos índices de aterogenicidade e trombosidade, maior será a prevenção de doenças que estão relacionadas com o aumento do teor de colesterol (LDL) no sangue e com acúmulo de placas de gordura nas artérias.

Outra relação que avalia a qualidade do perfil lipídico dos queijos é a relação [(C18:0+C18:1)/C16:0], cujo valor esperado deve ser maior para indicar efeito positivo dos ácidos graxos no alimento. Nos cinco queijos analisados não foram detectadas diferenças ( $p > 0,01$ ) para esta relação, nem tão pouco foram observadas variações significativas ao longo do armazenamento. Paralelamente, avaliou-se o efeito colesterêmico dos ácidos graxos predominantes no queijo, através do índice hipocolesterêmico/hipercolesterêmico (h/H). Os valores de h/H obtiveram variação ( $p <$

0,01) de 0,68 a 0,72, observando-se também que as bactérias probióticas não influenciaram esta relação ao longo da estocagem do produto ( $p > 0,01$ ).

Tabela 1. Relações e índices de ácidos graxos de cinco amostras de queijo de coalho caprino.

Relações e Índices	Tempo (Dias)	Tratamentos					p
		QS	QLA	QLP	QB	QC	
CLA	1	0,54 <sup>bB</sup>	0,71 <sup>A</sup>	0,59 <sup>B</sup>	0,69 <sup>bA</sup>	0,74 <sup>A</sup>	**
	28	0,66 <sup>aB</sup>	0,67 <sup>B</sup>	0,58 <sup>C</sup>	0,76 <sup>aA</sup>	0,74 <sup>A</sup>	**
	p	**	NS	NS	**	NS	
AGMI/AGS	1	0,35 <sup>B</sup>	0,38 <sup>AB</sup>	0,39 <sup>A</sup>	0,39 <sup>bA</sup>	0,39 <sup>AB</sup>	**
	28	0,38 <sup>B</sup>	0,38 <sup>B</sup>	0,37 <sup>B</sup>	0,43 <sup>aA</sup>	0,39 <sup>AB</sup>	**
	p	NS	NS	NS	**	NS	
AGPI/AGS	1	0,07 <sup>bA</sup>	0,07 <sup>bA</sup>	0,06 <sup>bB</sup>	0,07 <sup>bA</sup>	0,07 <sup>bA</sup>	**
	28	0,17 <sup>aB</sup>	0,17 <sup>aB</sup>	0,16 <sup>aC</sup>	0,17 <sup>aB</sup>	0,23 <sup>aA</sup>	**
	p	**	**	**	**	**	
DFA	1	45,08 <sup>bA</sup>	47,59 <sup>A</sup>	48,18 <sup>A</sup>	48,16 <sup>bA</sup>	48,12 <sup>A</sup>	**
	28	47,37 <sup>aB</sup>	47,46 <sup>B</sup>	47,15 <sup>B</sup>	50,23 <sup>aA</sup>	48,75 <sup>B</sup>	**
	p	**	NS	NS	**	NS	
IA	1	2,35 <sup>aA</sup>	2,29 <sup>B</sup>	2,38 <sup>aA</sup>	2,37 <sup>aA</sup>	2,30 <sup>aB</sup>	**
	28	2,28 <sup>bB</sup>	2,30 <sup>B</sup>	2,34 <sup>bA</sup>	2,28 <sup>bB</sup>	2,15 <sup>bC</sup>	**
	p	**	NS	**	**	**	
IT	1	1,79	1,75	1,82	1,79 <sup>a</sup>	1,74	NS
	28	1,76 <sup>A</sup>	1,76 <sup>A</sup>	1,81 <sup>A</sup>	1,52 <sup>bB</sup>	1,69 <sup>A</sup>	**
	p	NS	NS	NS	**	NS	

Os resultados são médias de três repetições de queijos fabricados em diferentes momentos; as seguintes abreviaturas foram utilizadas: QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura; \*\*Para cada análise, letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey; NS = Não significativo; CLA- Ácido linoleico conjugado; AGMI/AGS- Somatório de ácidos graxos monoinsaturados/Somatório de ácidos graxos saturados; AGPI/AGS- Somatório de ácidos graxos Poli-insaturados/Somatório de ácidos graxos saturados; DFA- Ácidos graxos desejáveis; IA- Índice de aterogeneidade; IT- Índice de trombosidade.

A análise de componentes principais foi aplicada para avaliar o comportamento das culturas lácticas probióticas e controle, frente ao perfil de ácidos graxos ao longo do armazenamento (28 dias) de queijo coalho caprino (Figura 4). Os dois componentes principais CP1 e CP2 apresentaram variância de 41% e 27%, respectivamente.



Analisando a Figura 3 pode-se observar que, com excessão do queijo controle (QS), todos os queijos elaborados com culturas láticas probióticas encontram-se na região positiva do PC1 e negativa do PC2. Os queijos presentes nesta região apresentam maior influência nos valores dos ácidos graxos desejáveis, mostrando-se a aplicação positiva das culturas láticas probióticas utilizadas neste estudo. O queijo produzido com o *B. lactis*, que encontra-se na região negativa das PC1 e PC2, apresentou maior influência na produção de CLA e ácidos graxos monoinsaturados, durante 28 dias de armazenamento, indicando o melhor tratamento dentre os queijos, uma vez que o consumo dos isômeros do ácido graxo linoleico (CLA) induz efeitos benéficos à saúde humana (JOY et al., 2014).

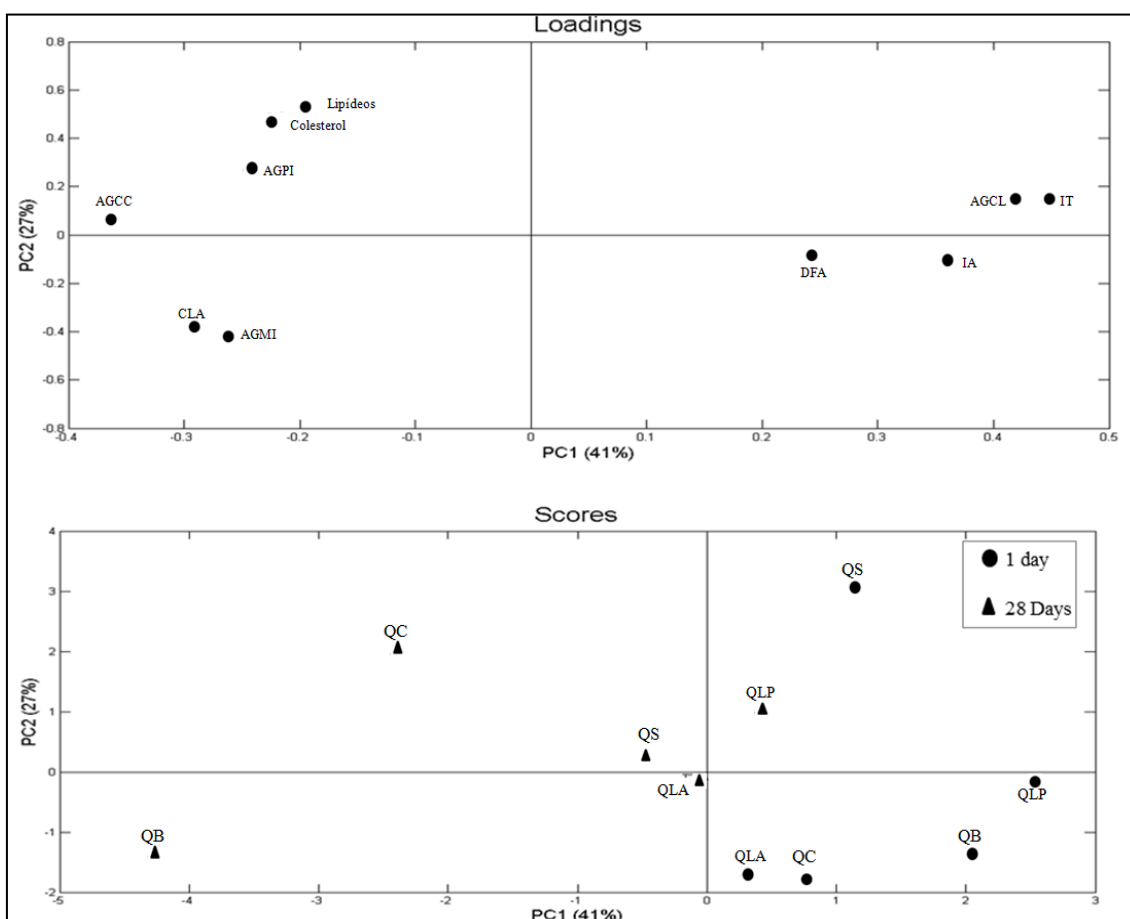


Figura 3. Análise de componentes principais de variáveis definidas em dois componentes principais.

### 3.2 PERFIL AROMÁTICO

Vinte e cinco compostos aromáticos foram identificados nos queijos de coalho caprino probióticos e tradicional (QLA, QLP, QB, QC e QS). Dentre os compostos voláteis identificados, seis eram álcoois, quatro hidrocarbonetos, quatro terpenos, três ácidos, três cetonas, três aldeídos e dois ésteres. Ressalta-se que o número de compostos voláteis identificados nos queijos de coalho caprino foi menor quando comparado com queijos maturados reportados na literatura (IRIGOYEN et al., 2007; ATASOY et al., 2013; HAYALOGLU et al., 2013), justificando-se que o queijo de coalho caprino é um produto lácteo não maturado, com baixo impacto aromático, e por ter apenas 28 dias de armazenamento, é considerado um queijo fresco.

No período de estocagem (28 dias), alguns voláteis apresentaram aumento ( $p < 0,01$ ) em seus percentuais de área, enquanto que outros decresceram ( $p < 0,01$ ) (Figura 4). Os ésteres foram os voláteis que apresentaram acréscimo ( $p < 0,01$ ) em todos os tratamentos, enquanto que os aldeídos, com exceção nos queijos QLP e QC, tiveram comportamento inverso ( $p < 0,01$ ). As demais classes apresentam comportamento de acréscimo ou decréscimo ( $p < 0,01$ ) que variaram em função do tratamento. O queijo de coalho caprino elaborado com *L. acidophilus* obteve comportamento similar ao queijo elaborado com cultura “starter”, com decréscimo ( $p < 0,01$ ) na produção de ácidos e aldeídos.

As variações são justificadas considerando-se que os compostos voláteis produzidos ao longo do armazenamento são formados através de reações proteolíticas, lipolíticas e glicolíticas (STEELE; BROADBENT; KOK, 2013), pela ação das enzimáticas bacterianas utilizadas na elaboração dos mesmos (IRIGOYEN et al., 2007).

Juntamente com os ésteres, os ácidos são os compostos aromáticos de maior impacto no aroma de queijos. A formação dos ácidos resulta da lipólise e do metabolismo da lactose, que originam principalmente o ácido acético (HAYALOGLU et al., 2013).

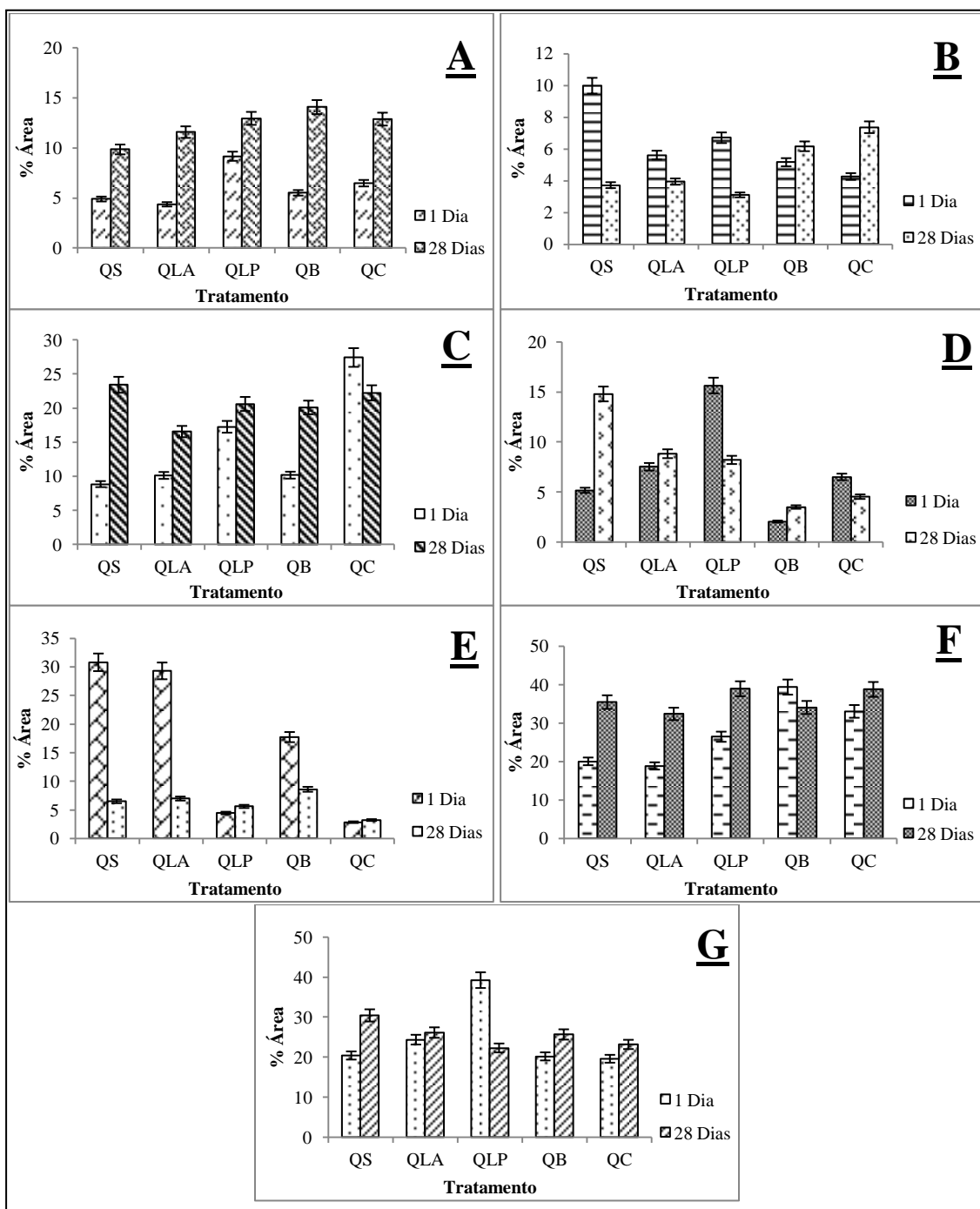


Figura 4. Classes químicas de compostos voláteis: (A) - Ésteres; (B) - Ácidos; (C) - Álcoois; (D) - Cetonas; (E) - Aldeídos; (F) - hidrocarbonetos; (G) - Terpenos de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento a  $10\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.

Três ácidos foram detectados nos queijos caprinos probióticos (C2, C8, C10), observando-se maiores proporções de ácido acético, nos queijos avaliados, com excessão para o QLP, em relação aos ácidos octanóico e decanóico. Paralelamente, o ácido acético apresentou concentrações decrescentes ao longo dos 28 dias de armazenamento, exceto para o queijo produzido com a *B. lactis*.

O decréscimo do ácido acético, provavelmente resultou de sua utilização subsequente na formação de outros compostos aromáticos, como cetonas, álcoois, aldeídos, lactonas e ésteres (DELGADO et al., 2010).

Vale ressaltar que o ácido octanóico exibiu acréscimo ( $p < 0,01$ ) durante os 28 dias nos queijos produzidos com a cultura convencional (QS) e a co-cultura (QC). Entretanto, esse aumento foi destacado pela ação da co-cultura, que pode ser consequência do efeito sinérgico das culturas probióticas adicionadas a esta formulação. A produção de ácido decanóico sofreu efeito apenas da cultura “stater” durante a estocagem. Reforça-se que a presença dos ácidos C8 e C10 contribui para o aroma característico “caprino” deste queijo (BONTINIS et al., 2012).

Dentre os voláteis dos queijos, os ésteres são em geral desejáveis, pela sua alta volatilidade, limiar de percepção muito baixo (IRIGOYEN et al., 2007), e seu aroma frutado, o qual suaviza aromas indesejáveis e característicos de alguns ácidos e aldeídos (HAYALOGLU et al., 2013). Os ésteres podem ser formados a partir da esterificação de ácidos ou álcoois primários e secundários ou através do metabolismo dos aminoácidos.

Entre meio aos ésteres, os etílicos são os de maior impacto em queijos, pois sua presença impõe a característica marcante do queijo. Dois ésteres etílicos foram identificados no queijo de coalho caprino (Butanoato de etila e decanoato de etila) e esses compostos são reportados na literatura em diferentes tipos de queijos: caprino maturado (DELGADO et al., 2011); caprino e ovino tipo Urfa (ATASOY et al., 2013); queijo tipo Reggianito Argentino (WOLF et al., 2010), dentre outros.

O butanoato de etila apresentou aumento ( $p < 0,01$ ) durante o armazenamento nas cinco amostras de queijo de coalho. Os queijos probióticos (QLA, QLP, QB e QC) apresentaram elevado aumento quando comparado com o queijo coalho tradicional (QS). No entanto, o decanoato de etila não apresentou diferença ( $p > 0,01$ ) nos queijos probióticos QB e QC.

Tabela 2. Porcentagem de ácidos e ésteres em queijos de coalho caprino adicionado com culturas lácticas probióticas e tradicional.

Ácidos e Ésteres	Tempo (Dias)	Tratamentos					p
		Q <sub>S</sub>	Q <sub>LA</sub>	Q <sub>LP</sub>	Q <sub>B</sub>	Q <sub>C</sub>	
Ácido acético	1	9,05 <sup>aA</sup>	3,91 <sup>aB</sup>	1,80 <sup>aC</sup>	3,51 <sup>B</sup>	1,47 <sup>aBC</sup>	**
	28	0,45 <sup>bC</sup>	2,18 <sup>bB</sup>	0,74 <sup>bBC</sup>	3,90 <sup>A</sup>	1,33 <sup>bBC</sup>	**
	p	**	**	**	NS	**	
Ácido octanóico	1	0,36 <sup>bB</sup>	0,86 <sup>B</sup>	2,62 <sup>aA</sup>	0,73 <sup>B</sup>	0,95 <sup>bB</sup>	**
	28	1,58 <sup>aB</sup>	0,90 <sup>B</sup>	1,17 <sup>bB</sup>	1,16 <sup>B</sup>	4,95 <sup>aA</sup>	**
	P	**	NS	**	NS	**	
Ácido Decanóico	1	0,56 <sup>bB</sup>	0,82 <sup>AB</sup>	2,03 <sup>A</sup>	0,91 <sup>AB</sup>	0,83 <sup>AB</sup>	**
	28	1,68 <sup>a</sup>	0,85	1,18	1,09	1,08	NS
	P	**	NS	NS	NS	NS	
Butanoato de etila	1	0,92 <sup>bB</sup>	1,09 <sup>bB</sup>	1,13 <sup>bB</sup>	1,56 <sup>bAB</sup>	3,00 <sup>bA</sup>	**
	28	2,79 <sup>aC</sup>	5,62 <sup>aB</sup>	9,31 <sup>aA</sup>	9,62 <sup>aA</sup>	9,24 <sup>aA</sup>	**
	P	**	**	**	**	**	
Decanoato de etila	1	3,96 <sup>bB</sup>	3,26 <sup>bB</sup>	7,86 <sup>aA</sup>	3,94 <sup>B</sup>	3,46 <sup>B</sup>	**
	28	7,04 <sup>aA</sup>	5,94 <sup>aA</sup>	3,62 <sup>bB</sup>	4,44 <sup>B</sup>	3,62 <sup>B</sup>	**
	p	**	**	**	NS	NS	

Os resultados são médias de três repetições de queijos fabricados em diferentes momentos; as seguintes abreviaturas foram utilizadas: Q<sub>S</sub> - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; Q<sub>LA</sub> - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; Q<sub>LP</sub> - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; Q<sub>B</sub> - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; Q<sub>C</sub> - Queijo de coalho caprino com co-cultura; \*\*Para cada análise, letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey; NS = Não significativo.

Os alcoólicos detectados nos queijos de coalho caprinos foram: etanol, 2-pentenol, hexanol, octanol, nonanol e decanol, os quais se destacaram com maiores percentuais em todos os tratamentos (Tabela 3). Os álcoois são formados a partir de diferentes vias metabólicas - metabolismo da lactose com redução de cetonas, metabolismo de aminoácidos e degradação de ácidos graxos insaturados (KAMINARIDES; STAMOU; MASSOURAS, 2007; DELGADO et al., 2010; ATASOY et al., 2013).

Maiores proporções de álcoois, em todos os tratamentos, foram detectadas foi de etanol, destacando-se o queijo elaborado com a co-cultura probiótica. O álcool secundário, 2-pentenol apresentou acréscimo nos cinco tratamentos, em decorrência da redução enzimática de metil cetonas correspondentes (DELGADO et al., 2010).

Tabela 3. Porcentagem de álcoois em queijos de coalho caprino adicionado com culturas lácticas probióticas e tradicional.

Alcoóis	Tempo (Dias)	Tratamentos					P
		QS	QLA	QLP	QB	QC	
Etanol	1	3,83 <sup>bB</sup>	5,68 <sup>B</sup>	4,13 <sup>B</sup>	4,66 <sup>B</sup>	16,01 <sup>aA</sup>	**
	28	9,68 <sup>aA</sup>	5,61 <sup>BC</sup>	3,90 <sup>C</sup>	6,81 <sup>ABC</sup>	8,63 <sup>bAB</sup>	**
	p	**	NS	NS	NS	**	
2-Penten-1-ol	1	0,73 <sup>b</sup>	0,70 <sup>b</sup>	1,68 <sup>b</sup>	0,70 <sup>b</sup>	1,30 <sup>b</sup>	NS
	28	3,33 <sup>a</sup>	4,28 <sup>a</sup>	4,77 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	3,88 <sup>a</sup>	NS
	p	**	**	**	**	**	
Hexanol	1	0,20 <sup>b</sup>	0,80	1,16	1,22	1,23	NS
	28	3,83 <sup>aA</sup>	1,44 <sup>B</sup>	1,83 <sup>B</sup>	1,71 <sup>B</sup>	1,48 <sup>B</sup>	**
	p	**	NS	NS	NS	NS	
Octanol	1	0,83 <sup>bB</sup>	1,18 <sup>B</sup>	2,74 <sup>aA</sup>	0,95 <sup>B</sup>	1,78 <sup>AB</sup>	**
	28	1,91 <sup>a</sup>	1,35	1,75 <sup>b</sup>	1,60	1,81	NS
	p	**	NS	**	NS	NS	
Nonanol	1	1,23 <sup>AB</sup>	0,25 <sup>bB</sup>	1,48 <sup>bAB</sup>	0,13 <sup>bB</sup>	2,78 <sup>A</sup>	**
	28	1,30 <sup>B</sup>	1,46 <sup>aB</sup>	5,64 <sup>aA</sup>	2,34 <sup>aB</sup>	2,91 <sup>B</sup>	**
	p	NS	**	**	**	NS	
Decanol	1	1,40 <sup>bB</sup>	1,52 <sup>B</sup>	5,59 <sup>aA</sup>	2,50 <sup>B</sup>	4,34 <sup>A</sup>	**
	28	3,38 <sup>a</sup>	2,41	2,72 <sup>b</sup>	3,00	3,52	NS
	p	**	NS	**	NS	NS	

Os resultados são médias de três repetições de queijos fabricados em diferentes momentos; as seguintes abreviaturas foram utilizadas: QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC - Queijo de coalho caprino com co-cultura; \*\*Para cada análise, letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey; NS = Não significativo.

Nos queijos coalho caprino foram identificadas três cetonas (C5, C7, C9) e três aldeídos (2-pentenal, 2-metil-2-butenal e heptanal) (Tabela 4). Em geral, as cetonas são voláteis que apresentam tendência de aumento ao longo da vida de prateleira de queijos. Dentre essa classe, as metil cetonas são detectadas em queijos e são produzidas a partir de ácidos graxos livres (resultantes da lipólise) por uma via alternativa de  $\beta$ -oxidação (WOLF et al., 2010; HAYALOGLU et al., 2013). Por possuírem aroma herbáceo, frutal e floral, sua presença é desejável em queijos, proporcionando um aroma mais agradável ao produto (DELGADO et al., 2011).

Os aldeídos também exercem efeitos na formação do aroma de queijo, pois possuem limiar baixo de percepção. São formados por reações com aminoácidos ou através da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos insaturados (IRIGOYEN et al., 2007).

Os queijos de coalho caprinos elaborados com diferentes culturas apresentaram diferenças ( $p < 0,01$ ) nas concentrações de cetonas produzidas (Tabela 4). Uma maior produção de 2-pentanona foi constatada ao longo do armazenamento nos tratamentos QS, QLA, QLP e QB. Dentre os cinco tipos de queijo coalho caprino, apenas aquele elaborado com a cultura “starter” apresentou aumento da 2-heptanona, entretanto, os demais tipos queijos (probióticos) reduziram durante 28 dias. As cetonas são compostos intermediários, que podem ser reduzidos aos álcoois secundários (BONTINIS et al., 2012).

O queijo tradicional também expôs similaridade de comportamento para a produção da cetona 2-nonanona, obtendo acréscimo ( $p < 0,01$ ) durante 28 dias de armazenamento. De forma contraditória o queijo produzido com *L. paracasei* obteve redução ( $p < 0,01$ ) deste composto.

Os aldeídos possuem a tendência de apresentar alta concentração apenas no início da maturação de queijos, porque estes são rapidamente convertidos em seus álcoois ou ácidos correspondentes (KONDYLI et al., 2013; BONTINIS et al., 2012). Segundo Delgado et al. (2010) em queijos maturados, a baixa concentração de aldeídos indica resultado positivo da maturação, porque esses compostos provocam sabores desagradáveis ao produto.

O heptanal e o 2-pentanal apresentaram aumento significativo ao longo dos 28 dias de armazenamento. Este aumento é devido ao queijo do estudo ser considerado fresco, pois foi exposto a poucos dias de cura (28 dias). Durante este período apenas o 2-metil-2-butenal, que é um composto de baixo peso molecular, foi convertido rapidamente, levando ao seu decréscimo. Este composto exibiu alta proporção nos queijos QS, QLA e QB quando comparadas com as demais. Entretanto, segundo Atasoy et al. (2013) os aldeídos ramificados podem ser produzidos a partir do catabolismo dos aminoácidos ramificados.

Tabela 4. Porcentagem de cetonas e aldeídos em queijos de coalho caprino adicionado com culturas lácticas probióticas e tradicional.

Cetanos e Aldeídos	Tempo (Dias)	Tratamentos					p
		QS	QLA	QLP	QB	QC	
2-Pentanona	1	0,33 <sup>bC</sup>	0,58 <sup>bC</sup>	5,15 <sup>aA</sup>	0,36 <sup>aC</sup>	2,05 <sup>B</sup>	**
	28	2,56 <sup>aB</sup>	2,37 <sup>aB</sup>	7,16 <sup>bA</sup>	2,31 <sup>bB</sup>	2,78 <sup>B</sup>	**
	p	**	**	**	**	NS	
2-heptanona	1	3,91 <sup>bBC</sup>	6,24 <sup>aAB</sup>	7,79 <sup>aA</sup>	1,33 <sup>aC</sup>	3,27 <sup>aBC</sup>	**
	28	9,35 <sup>aA</sup>	5,62 <sup>bB</sup>	0,00 <sup>bC</sup>	0,00 <sup>bC</sup>	0,50 <sup>bC</sup>	**
	p	**	**	**	**	**	
2-nonanona	1	0,93 <sup>bB</sup>	0,70 <sup>B</sup>	2,46 <sup>aA</sup>	0,36 <sup>B</sup>	1,18 <sup>AB</sup>	**
	28	2,88 <sup>aA</sup>	0,84 <sup>B</sup>	1,05 <sup>bB</sup>	1,19 <sup>B</sup>	1,26 <sup>B</sup>	**
	p	**	NS	**	NS	NS	
Heptanal	1	0,49 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,89 <sup>b</sup>	NS
	28	3,12 <sup>aA</sup>	1,12 <sup>aB</sup>	2,15 <sup>aAB</sup>	1,83 <sup>aB</sup>	1,41 <sup>aB</sup>	**
	p	**	**	**	**	**	
2-metil-2-butenal	1	30,06 <sup>aA</sup>	28,61 <sup>aA</sup>	1,92 <sup>aC</sup>	17,08 <sup>aB</sup>	1,60 <sup>aC</sup>	**
	28	1,24 <sup>b</sup>	3,85 <sup>b</sup>	0,93 <sup>b</sup>	4,59 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	NS
	p	**	**	**	**	**	
2-pentenal	1	0,21 <sup>b</sup>	0,19 <sup>b</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>	NS
	28	2,09 <sup>a</sup>	1,97 <sup>a</sup>	2,48 <sup>a</sup>	2,15 <sup>a</sup>	1,77 <sup>a</sup>	NS
	p	**	**	**	**	**	

Os resultados são médias de três repetições de queijos fabricados em diferentes momentos; as seguintes abreviaturas foram utilizadas: QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura. \*\*Para cada análise, letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey; NS = Não significativo.

Os hidrocarbonetos (2,2-dimetilbutano, octano, decano, tolueno) constituíram a classe de voláteis em maior abundância nos queijos coalho caprino, no entanto, por possuírem alto limiar de detecção, estes compostos não influenciam diretamente no aroma característico dos queijos, mas, são precursores para a formação de outros compostos voláteis (BONTINIS et al., 2012). A origem dos hidrocarbonetos detectados nos queijos de coalho provem, provavelmente, da alimentação das cabras ou podem ser originados através da auto-oxidação dos lipídeos (MILOSAVLJEVIĆ et al., 2012). O tolueno é um composto proveniente do leite com o qual foram elaborados os queijos, ou pode ser formado como resultante da degradação de Strecker originada pela presença dos aminoácidos, fenilalanina e tirosina (IRIGOYEN et al., 2007).



Os terpenos ( $\alpha$ -copaene,  $\alpha$ -limonene,  $\alpha$ -pinene, cariofileno) são voláteis aromáticos que são provenientes da alimentação das cabras (plantas), que por sua vez são transferidos para o leite e assim finalmente são exportados para o queijo durante sua produção (DELGADO et al., 2011). Diante deste fato, a importância da presença destes compostos está diretamente relacionada com origem geográfica do tipo de queijo produzido. Estes compostos por serem específicos da alimentação dos animais, poderão servir como marcadores para auxiliar na denominação de origem do queijo (HAYALOGLU et al., 2013).

A análise de componentes principais foi aplicada para avaliar o comportamento das culturas lácticas probióticas, mediante a produção de compostos voláteis ao longo do armazenamento de queijo de coalho caprino (Figura 5). Os dois componentes principais CP1 e CP2, apresentaram variância de 47% e 23%, respectivamente.

Analisando a Figura 5 pode-se observar que a produção dos compostos voláteis em queijos é intensificada no 28º dia de armazenamento. Com exceção para o queijo elaborado com a *L. paracasei*, que apresentou um produção mais elevada de ácido decanoico, decanoato de etila, 2-nonanona e 2-heptanona, desde o primeiro de armazenamento.

Os queijos de coalho caprinos produzidos com culturas lácticas probióticas encontram-se na região negativa das PC1 e PC2, indicando influências semelhantes na produção dos compostos que também se encontram nesta região (heptanal, 2-pentanona, 2-pentanal, 2-pentenol, ácido octanóico, nonanol e butanoato de etila). Entretanto, analisando a região onde se localiza o queijo coalho caprino tradicional, pode-se concluir sua influência na produção dos compostos ocatanol, decanol, hexanol, ácido decanoico, decanoato de etila e 2-nonanona.

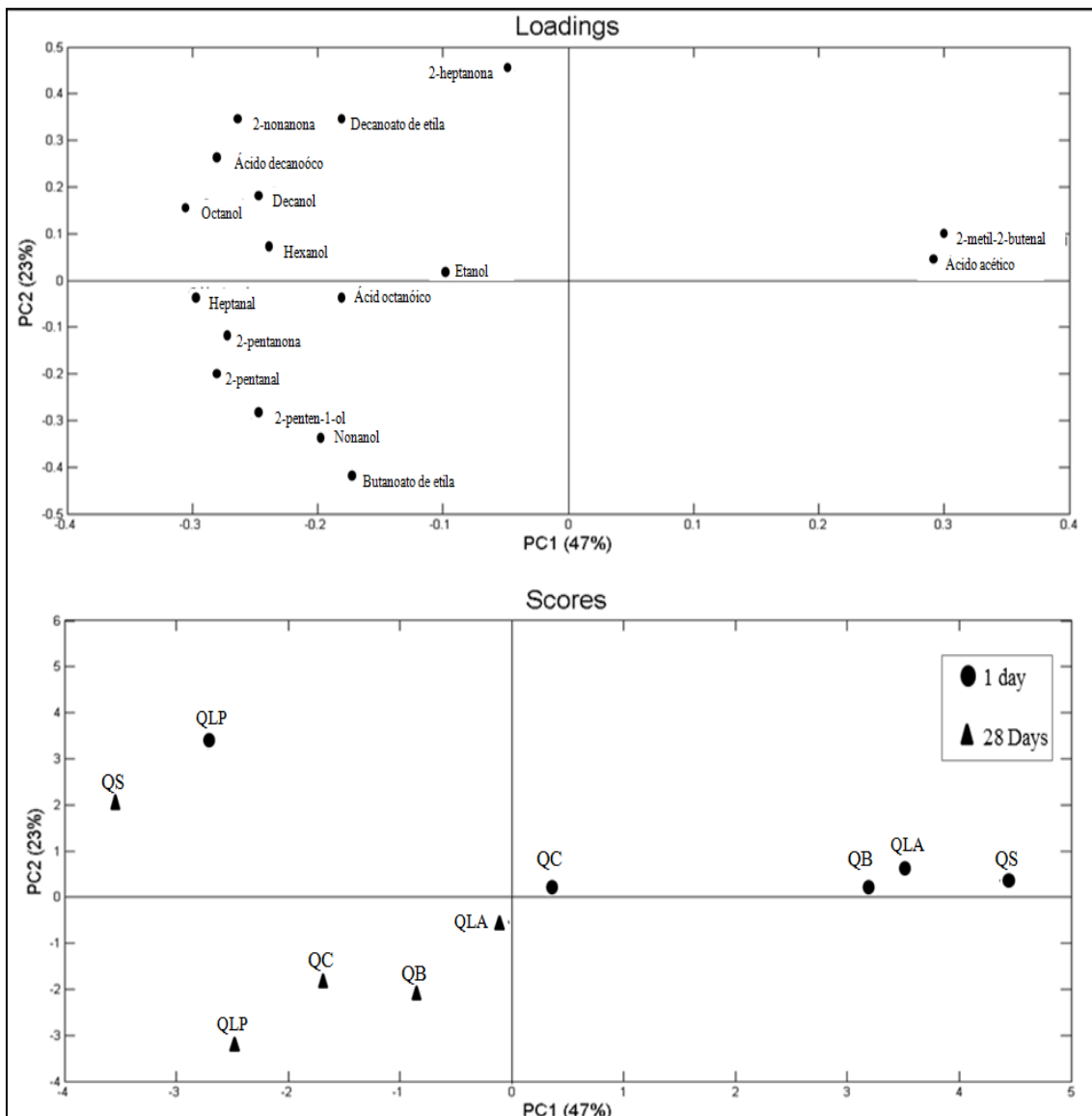


Figura 5. Análise de componentes principais de variáveis definidas em dois componentes principais.

#### 4 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta a primeira caracterização de lipólise e perfil de voláteis de queijo de coalho caprino adicionado de bactérias probióticas durante o armazenamento. Com base nos estudos comparativos realizados, conclui-se que o uso das diferentes culturas lácticas probióticas afeta o perfil lipídico e aromático de queijo de

coalho caprino, com aumento nos teores de gordura e colesterol durante o armazenamento por 28 dias à 10 °C. Queijos de coalho caprinos elaborados com *Bifidobacterium lactis* e a co-cultura sobressaíram-se nas concentrações de CLA, com melhores índices de AGPI/AGS, DFA, IA, IT e maior produção de voláteis. Consequentemente, ressalta-se que os queijos probióticos fabricados a partir de leite de cabra adicionados do *Bifidobacterium lactis* e da co-cultura de probióticos resultaram em queijo de coalho com maior qualidade nutricional e aromática.

## REFERÊNCIAS

- ATASOY, A. F.; HAYALOGLU, A. A.; KIRMACI, H.; LEVENT, O.; TÜRKÖĞLU, H. Effects of partial substitution of caprine for ovine milk on the volatile compounds of fresh and mature Urfa cheeses. **Small Ruminant Research**, v. 115, n. 1-3, p. 113-123, 2013.
- BONANNO, A.; TORNAMBÉ, G.; BELLINA, V.; DE PASQUALE, C.; MAZZA, F.; MANIACI, G.; DI GRIGOLI, A. Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 710–24, 2013.
- BONTINIS, T. G.; MALLATOU, H.; PAPPA, E. C.; MASSOURAS, TH.; ALICHANIDIS, E. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 193-201, 2012.
- BURNS, P.; CUFFIA, F.; MILESI, M.; VINDEROLA, G.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; HYNES, E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food microbiology**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2012.
- CABIDDU, A.; ADDIS, M.; PINNA, G.; DECANDIA, M.; SITZIA, M.; PIREDDA, G.; PIRISI, A.; MOLLE, G. Effect of corn and beet pulp based concentrates on sheep milk and cheese fatty acid composition when fed Mediterranean fresh forages with particular reference to conjugated linoleic acid cis-9, trans-11. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, n. 3-4, p. 292-311, 2006.
- CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; LEROUX, C. Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, n. 3-4, p. 474-487, 2006.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHÄNEN, E. L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1347–1361, 2006.

COMAN, M. M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M. C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO<sup>®</sup>, a probiotic bacteria combination. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 3, p. 346-52, 2012.

DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; GARCÍA-PARRA, J.; RAMÍREZ, R. Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 182-189, 2010.

DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1156 -1163, 2011.

DOMAGALA, J.; SADY, M.; GREGA, T.; PUSTKOWIAK, H.; FLORKIEWICZ, A. The influence of cheese type and fat extraction method on the content of conjugated linoleic acid. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.23, n.3, p.238-243, 2010.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 7 ed. AOAC International, Arlington, VA, USA, 1992.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MACHADO, T. A. D.; SOUZA, E. L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947-56, 2012.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A.; LOBOS ORTEGA, I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 666-673, 2014.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.

HAYALOGLU, A. A.; TOLU, C.; YASAR, K. Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 187-194, 2013.

IRIGOYEN, A.; ORTIGOSA, M.; JUANSARAS, I.; ONECA, M.; TORRE, P. Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe's-milk cheese. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 71-80, 2007.

JOY, M.; RIPOLL-BOSCH, R.; SANZ, A.; MOLINO, F.; BLASCO, I.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, J. Effects of concentrate supplementation on forage intake, metabolic profile and milk fatty acid composition of unselected ewes raising lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 187, n. 1, p. 19-29, 2014.

KAMINARIDES, S.; STAMOU, P.; MASSOURAS, T. Changes of organic acids , volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 219-225, 2007.

KONDYLI, E.; MASSOURAS, T.; KATSIARI, M. C.; VOUTSINAS, L. P. Lipolysis and volatile compounds of Galotyri-type cheese made using different procedures. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 2-3, p. 432-436, 2013.

MADRUGA, M.; DANTAS, I.; QUEIROZ, A.; BRASIL, L.; ISHIHARA, Y. Volatiles and water- and fat-soluble precursors of Saanen goat and cross Suffolk lamb flavour. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2150-2165, 2013.

M MARRONE, R.; BALESTRIERI, A.; PEPE, T.; VOLLANO, L.; MURRU, N.; D'OCCHIO, M. J.; ANASTASIO, A. Physicochemical composition, fatty acid profile and cholesterol content of "Pecorino Carmasciano" cheese, a traditional Italian dairy product. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 36, n. 1-2, p. 85-89, 2014.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening.a review. **Lait**, v. 80, n. 3, p. 293-324, 2000.

MEDEIROS, E.; QUEIROGA, R.; OLIVEIRA, M.; MEDEIROS, A.; SABEDOT, M.; BOMFIM, M.; MADRUGA, M. Fatty acid profile of cheese from dairy goats fed a diet enriched with castor, sesame and faveleira vegetable oils. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 992-1003, 2014.

MILOSAVLJEVIĆ, N. P.; BLAGOJEVIĆ, P. D.; SAVIĆ, D. S.; RADULOVIĆ, N. S. Application of HS-SPME–GC-MS-derived variables for monitoring ripening-induced changes in cheese volatile compounds. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 4, p. 321-333, 2012.

OLIVEIRA, E. M. G.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Technological , physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

O'SHEA, E. F.; COTTER, P. D.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; HILL, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.

OSMARI, E. K.; CECATO, U.; MACEDO, F. A. F.; SOUZA, N. E. Nutritional quality indices of milk fat from goats on diets supplemented with different roughages. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 128-132, 2011.

PAJOR, F.; STEIBER, O.; TASI, J. Influence of extensive grazing on cheese composition, yield and fatty acids content of goats. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 18, n. 4, p. 487-492, 2012.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; PIVA, G. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 55-61, 2011.

QUEIROGA, R. D. C. R. D. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' , cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.

RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; RIBBERA, A.; CAGGIA, C. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 363-74, 2010.

RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; PEREIRA FILHO, J. M.; AZEVEDO, S. S. A.; MELO, D. B.; BATISTA, J. A.; MIRANDA NETO, E. G.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 345-352, 2013.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; GOMES, A. M.; GOODFELLOW, B. J.; FREITAS, A. C. Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1414-1421, 2012.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M.; MALCATA, X.; FREITAS, A. C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.

RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; FONTECHA, J.; HOZ, L. L.; SILVA, V. S. N.; CARVALHO, J. E.; PACHECO, M. T. B. CLA-enriched milk powder reverses hypercholesterolemic risk factors in hamsters. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 244-249, 2013.

SANTOS, K. M. O.; BOMFIM, M. A. D.; VIEIRA, A. D. S.; BENEVIDES, S. D.; SAAD, S. M. I.; BURITI, F. C. A.; EGITO, A. S. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2012.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal components analysis in the software Assistat - Statistical attendance World Congress on Computers in Agriculture7, **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Reno-NV-USA, 2009.

SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1533-1538, 2012.

STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 135-41, 2013.

VAN NIEUWENHOVE, C. P.; OLISZEWSKI, R.; GONZÁLEZ, S. N. Fatty Acid Composition and Conjugated Linoleic Acid Content of Cow and Goat Cheeses From Northwest Argentina. **Journal of Food Quality**, v. 32, n. 3, p. 303-314, 2009.

WOLF, I. V.; PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; ZALAZAR, C. A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1204-1211, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. In **Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation**, Geneva, 160, 2003.

**ARTIGO 3**

**AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE EM QUEIJO DE COALHO CAPRINO  
ADICIONADO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS**



## AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE EM QUEIJO DE COALHO CAPRINO ADICIONANDO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS

### Resumo

O presente estudo objetivou produzir queijo de coalho funcional a partir de leite de cabra, incorporando cepas probióticas na matriz de queijo e avaliando os efeitos proteolíticos resultantes da adição de culturas láticas probióticas na sua forma isolada e combinada. Os queijos de coalhos caprinos foram denominados QS, queijo com cultura “starter” de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, QLA, queijo com *Lactobacillus acidophilus*, QLP, queijo com *Lactobacillus paracasei*, QB, queijo com *Bifidobacterium lactis*; QC, queijo com co-cultura, dos 3 micro-organismo probióticos. Os queijos foram analisados após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A contagem das células probióticas foi superior a  $6,5\text{ log UFC g}^{-1}$  de queijo e  $7\text{ log UFC g}^{-1}$  de queijo, respectivamente, no 1° e 28° dia de armazenamento. A utilização da combinação das culturas probióticas (co-cultura) influenciou ( $p < 0,01$ ) a proteólise do queijo de coalho caprino, ocasionando maior teor de proteína solúvel, índice proteolítico de profundidade e liberação de aminoácidos no 1° dia após o processamento. O índice de proteólise em extensão foi máximo após 7 dias de estocagem (em torno de 11%), sendo as frações de  $\alpha_2$  e k-caseína as que apresentaram maior grau de hidrólise ao longo do armazenamento destes queijos. Dentre os queijos elaborados com bactérias probióticas isoladas, enfatiza-se que a *B. lactis* exibiu ação proteolítica mais intensa, exibindo elevado teor de proteína solúvel e maior degradação da fração de  $\alpha_2$  caseína ao longo do armazenamento.

**Palavras-chaves:** queijo, proteólise, coalho, caprinos, aminoácidos livres.

## 1 INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um produto muito apreciado devido suas características sensoriais, apresentando sabor levemente salgado e ácido, aroma suave, textura compacta e macia. É um queijo tradicional, produzido e consumido há mais de 150 anos no Nordeste do Brasil e outras regiões. Este queijo tem forte participação na economia da região nordeste, principalmente como fonte de renda dos fornecedores de leite, especialmente pequenos produtores que não têm acesso a instalações industriais para processamento do leite (OLIVEIRA et al., 2012; QUEIROGA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Devido às especificidades do leite de cabra, o queijo de coalho caprino apresenta propriedades químicas que o torna um produto destacável aos olhos dos consumidores. O perfil proteico deste queijo exhibe características específicas, como a redução ou ausência da  $\alpha_{s1}$ -caseína e diferenças estruturais da  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactalbumina. Conseqüentemente, apresenta baixo poder alergênico, que possibilita seu consumo por indivíduos que possuem alergia a proteína de produtos lácteos (ALBENZIO; SANTILLO, 2011).

Pesquisadores têm dedicado atenção especial ao queijo de coalho caprino devido ao seu reconhecimento como um alimento com potencial funcional, baseado principalmente no perfil peptídico e atividade antioxidante (SILVA et al., 2012). Adicionalmente, a sua composição é tido como um potencial “carredor” de bactérias ácido lácticas (GARCIA et al., 2012); como um “veículo” para transportar adequadamente os micro-organismos probióticos e de ácidos graxos linoleico conjugados-CLAs (SANTOS et al, 2012)

A adição de bactérias lácticas probióticas, ao queijo de coalho caprino, que já possui benefícios inerentes a sua composição proteica, se apresenta como uma alternativa para elevar a qualidade do produto. Uma vez que os probióticos são comprovadamente considerados micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor, quando ingeridos na proporção adequada (OLIVEIRA et al., 2012; VO; KIM, 2013). Os gêneros probióticos mais utilizados em diferentes queijos tradicionais do Brasil, tais

como: o queijo minas, queijo de coalho, queijo cremoso, - são o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus* (GOMES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; BURNS et al., 2012).

Os ganhos nutricionais e sensoriais dos queijos probióticos resultam do fato de que os probióticos possuem um amplo espectro de enzimas que reações bioquímicas durante o período de estocagem do queijo, resultando na produção e liberação de diferentes compostos, que impactam na qualidade do produto final, principalmente na textura e sabor (RANDAZZO, et al., 2010; ALBENZIO et al., 2013).

Dentre as reações bioquímicas, se destaca um conjunto de eventos de natureza proteica, denominado de proteólise. O processo envolve a ação de enzimas naturalmente presentes no leite, no agente coagulante e ainda nas enzimas microbianas, originadas pelas bactérias lácticas intencionalmente adicionadas na elaboração do queijo. A proteólise envolve a desestabilização da micela de caseína, com liberação de peptídeos e aminoácidos, que sofrem um processo de catabolismo formando outros compostos voláteis como aminas, ácidos (isobutírico, isovalérico e valérico), tióis, ésteres, e outros (WOLF et al., 2010; GARCIA et al., 2012; STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

O potencial do queijo de coalho caprino como um alimento funcional, especialmente como uma matriz alimentar fonte de diferentes bactérias probióticas (por exemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis*) foi reportado na literatura (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012; SANTOS et al., 2012). No entanto, estudos detalhado sobre as alterações proteolíticas resultantes da ação das bactérias probióticas adicionadas durante o processamento, e armazenamento de queijos de coalho caprino (convencional e probióticos) não foram descritos. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos da ação proteolítica resultantes da adição de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, na sua forma isolada e combinada, em queijo de coalho caprino. As bactérias com efeitos probióticos foram selecionadas de acordo com a melhor viabilidade na matriz, segundo a literatura (OLIVEIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CULTURAS E REAGENTES

Cinco formulações de queijo de coalho caprino foram processadas em bateladas distintas, em triplicata, utilizando-se culturas liofilizadas comerciais (Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil). As culturas foram inseridas (100 mg de cada cultura para 1 litro de leite) nas diferentes formulações: QS (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* - R704, lote 3128520); QLA (*Lactobacillus acidophilus* - LA-5, lote 3139352); QLP (*Lactobacillus paracasei* - L. casei-01, lote 3089189); QB (*Bifidobacterium lactis* - BB 12, lote 3100870); QC (*L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis*, na proporção - 1: 1: 1). A cultura “starter” foi adicionada apenas no queijo denominado de QS.

Os reagentes e produtos químicos utilizados para as análises deste estudo foram adquiridos por fornecedores laboratoriais (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

### 2.2 PROTOCOLO DE FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS

Para a elaboração de cada tratamento de queijo foram utilizados 10 L de leite de cabra refrigerado e pasteurizado (65 °C por 15 minutos), proveniente de raças nativas, pertencentes a Cooperativa de Produtores Rurais de Monteiro, Paraíba (CAPRIBOM). Inicialmente, o leite foi aquecido a  $45 \pm 1$  °C, e em seguida foi realizada acidificação direta com ácido láctico (0,85 mL 100 mL<sup>-1</sup>) numa quantidade de 0,25 mL L<sup>-1</sup>. As culturas de bactérias lácticas foram adicionadas a uma concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, sendo estas inoculadas diretamente na cuba. O cloreto de cálcio (0,5 mL L<sup>-1</sup>) e o agente coagulante comercial (0,9 mL L<sup>-1</sup>) também foram adicionados a cuba.

As cubas foram mantidas a 36 °C até a obtenção de uma coalhada firme (aproximadamente 40 minutos). O gel obtido foi suavemente cortado em cubos (1,5 a 2,0 cm) e a metade do soro foi retirado para a elaboração da salmoura (12 g L<sup>-1</sup>NaCl). A salmoura foi adicionada à massa carta e em seguida e homogeneizada e logo após

realizou-se a drenagem e acondicionamento em formas retangulares perfuradas (capacidade aproximada de 250 g), as quais foram mantidas a 36 °C sob pressão por 4 horas e em seguida os queijos foram embalados a vácuo e armazenados à 10 °C.

As análises proteolíticas foram realizadas em cinco intervalos de 7 dias intercalados (1, 7, 14, 21 e 28 dias). Todas as análises propostas neste estudo foram realizadas em triplicata.

### 2.3 VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

Consistiu no monitoramento das contagens das culturas lácticas: *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*; *L. acidophilus*; *L. paracasei*; *B. lactis* e a co-cultura, nos queijos de coalho caprino. Inicialmente, 25 g de queijo foi adicionado e homogeneizado em 225 mL de água peptonada (1 g L<sup>-1</sup>) e submetido a uma série de diluições (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-5</sup>). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS), adicinado de cisteína à 5% e incubadas a 37 °C por 48 horas, sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). A contagem foi expressa em número de unidades formadoras de colônias por grama de queijo (log CFU g<sup>-1</sup>) (FDA, 1992).

### 2.4 ANÁLISE DE PROTEÍNA SOLÚVEL E DAS FRAÇÕES NITROGENADAS

Os queijos foram analisados quanto ao teor de proteína não solúvel, nitrogênio total, nitrogênio não proteico e nitrogênio não caseico. A concentração de proteína não solúvel foi determinada pelo método do reagente de Folin, utilizando albumina de soro bovino como padrão (LOWRY et al., 1951).

As determinações dos teores de nitrogênio total (NT) (991.20) e nitrogênio solúvel (NS) em ácido tricloroacético (TCA) (991.21) foram realizadas utilizando o método de Kjeldahl, seguindo a metodologia da AOAC (2000). O teor de nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 foi determinado segundo Andreatta et al. (2007). A proteólise foi avaliada com o índice de proteólise em extensão (IPE) e índice proteólise em

profundidade (IPP), utilizando as equações:  $IPE = (NS \text{ a pH } 4,6) / NT \text{ (nitrogênio total)} \times 100$ ; e  $IPP = (NS \text{ em TCA}) / NT \times 100$  (Andreatta et al., 2007).

## 2.5 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO

Este experimento foi realizado utilizando-se a técnica descrita por Laemmli (1970). O gel de aplicação (stacking gel) foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris - HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação foi montado formando um gradiente de 7,5 a 17,5% de poliacrilamida em tampão Tris - HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras oriundas dos extratos protéicos, foram preparadas seguindo a metodologia descrita por Egito et al. (2002). A corrida foi realizada sob amperagem constante (25 mA) e ao final da corrida, o gel foi retirado da placa e fixado em TCA 12,5% por uma hora, sendo então corado com Coomassie brilliant blue R - 250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8 v/v/v). Os pesos moleculares das frações proteicas do queijo, foram comparadas mediante a utilização de marcador de peso molecular de 12 à 225 kDA (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

## 2.6 ANÁLISE DE HIDROFIBICIDADE DE PEPTÍDEOS

A separação dos peptídeos por hidrofobicidade foi realizada utilizando coluna Nova - Pak C18 (4,6m x 250 mm, 4  $\mu$ m de tamanho de partícula, cartridge, Waters, Irlanda), conectada a um HPLC (Varian, Waters 2690, Califórnia, EUA). O volume de injeção do extrato solúvel (0,2 g/mL) foi 20  $\mu$ L e a fase móvel foi constituída em: Eluente A (água ultra-pura à 1% de ácido trifluoroacético) e Eluente B (acetonitrila à 1% de ácido trifluoroacético). Um gradiente linear do eluente (A) e eluente (B) foi aplicado durante 60 minutos em fluxo de 1 mL / minuto e a detecção foi realizada a 218 nm.

## 2.7 PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES

Os aminoácidos livres dos queijos avaliados foram extraídos mediante a agitação orbital por 60 minutos, com ácido clorídrico 0,1 M ( $\text{g mL}^{-1}$ ) seguida de derivação em pré-coluna com fenilisotiocianato (PTIC), de acordo com White, Hart e Fry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 - Luna - Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de pH 6,4 e uma solução de acetonitrila a 40 %. A injeção da amostra foi efetuada automaticamente (50  $\mu\text{L}$ ) e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 45 minutos e os resultados foram expressos em mg de aminoácido por 100 g de queijo de coalho, em que a quantificação foi realizada mediante a adição do padrão interno ácido  $\alpha$ -aminobutírico.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A interpretação estatística dos dados foi realizada utilizando análise variância (ANOVA), seguindo de análise fatorial até um nível de significância de 1% a 5%. O pacote estatístico utilizado foi do software Assistat, versão 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o Unscrambler<sup>®</sup> X.1 (CAMO S.A.) e foram codificados em Matlab 6.5 (Mathworks, USA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS

Não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre na contagem das bactérias lácticas no queijo de coalho caprino controle e nos queijos de coalho caprinos probióticos ao longo dos 28 dias de armazenamento. As contagens das bactérias lácticas nos queijos foram superiores a superior a  $6,5 \log \text{ UFC g}^{-1}$  de queijo e  $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$  de queijo, respectivamente, no 1º e 28º dia de armazenamento. Observou-se também que os cinco queijos apresentaram contagem de bactérias lácticas acima de  $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$  após 7 dias de estocagem. A contagem mínima das bactérias probióticas para ser favorável ao efeito positivo a saúde é de  $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$  (DE VUYST, 2000; TALWALKAR et al., 2004).

#### 3.2 PROTEÍNA SOLÚVEL E ANÁLISE DE PROTEÓLISE

Os queijos produzidos com as culturas probióticas e com a cultura “starter” exibiram aumento ( $p < 0,01$ ) do teor de proteínas solúveis ao longo dos 28 dias de estocagem (Figura 1 - A). Os queijos de coalho processados com adição da cultura “starter” e do *B. lactis* apresentaram concentrações mais elevadas ( $p < 0,01$ ) de proteínas solúveis ao longo dos 28 dias de estocagem, quando comparadas com os demais queijos.

O aumento do teor de proteína solúvel está diretamente relacionado com o grau de proteólise alcançado pelos queijos, resultando na liberação de peptídeos e aminoácidos. Queijos maturados, relatados na literatura, a exemplo do queijo Xinotyri - caprino grego (BONTINIS et al., 2012); do queijo argentino Reggianito (WOLF et al., 2010); do queijo caprino Gokcead (HAYALOGLU et al., 2013); queijo ovino Urfa (KIRMACI et al., 2014), apresentam comportamento similar ao obtido no presente estudo.

Dentre as bactérias lácticas probióticas analisadas, a *B. lactis* apresentou ação proteolítica mais intensa e, conseqüentemente, liberou ao longo do armazenamento uma



maior quantidade de aminoácidos e peptídeos hidrofílicos, intensificando assim a concentração de proteínas solúveis (ALBENZIO et al., 2013).

Os quatro queijos de coalho probióticos indicaram índice de proteólise em extensão máxima a partir do 7º dia de estocagem, tornando-se constante até o 28º dia. Porém a amostra controle apresentou um comportamento diferenciado. O queijo elaborado com a cultura “starter” apresentou o pico máximo da proteólise no 14º dia após o processamento, reduzindo o mesmo ao longo dos 21 dias, com estabilização do processo até o final (Figura 1 - B).

As enzimas presentes no agente coagulante adicionados para a elaboração de queijos atuam de forma mais importante no resultado da proteólise em extensão, mas além do coalho, as enzimas de origem microbiana também exercem efeitos nesta proteólise inicial. Dentre as enzimas microbianas, as de origem probióticas possuem ação proteolítica maior quando comparadas com as enzimas originadas de cultura “starter” (RODRIGUES et al., 2011).

A avaliação do índice de proteólise em profundidade nos queijos demonstrou diferença ( $p < 0,01$ ) entre o comportamento das culturas utilizadas e entre os tempos analisados (Figura 1- C). O queijo elaborado com a co-cultura de probióticos apresentou maior índice para todos os tempos avaliados. Este desempenho pode ser relacionado ao efeito sinérgico que as culturas probióticas exerceram no poder proteolítico. Enquanto que, o processado com a cultura “starter” expôs menor índice proteolítico de profundidade, comparado aos queijos probióticos. As estirpes probióticas possuem atividade proteolítica mais intensa que as convencionais, utilizadas na produção de queijos (ALBENZIO et al., 2013).

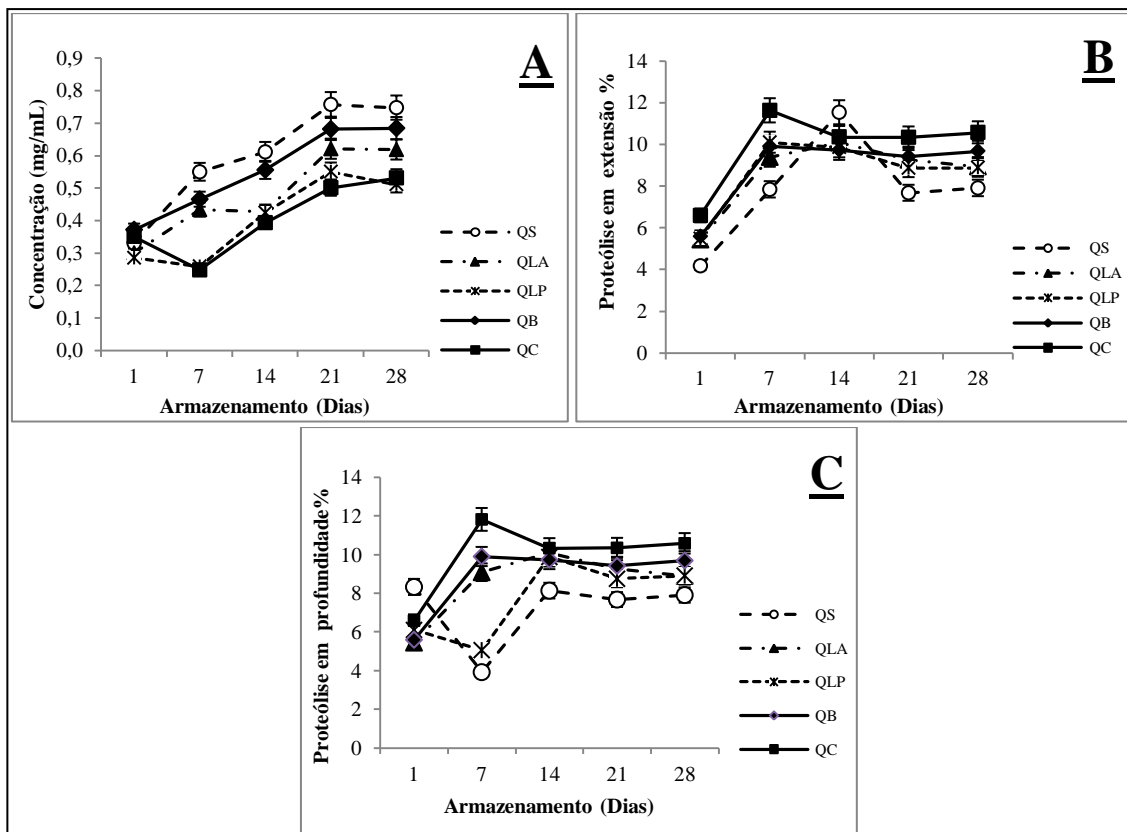


Figura 1. (A) - Proteína solúvel (mg/mL); (B) - Índice de proteólise em extensão (%); (C) - profundidade (%) de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.

### 3.3 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO

A Figura 2 apresenta as frações proteicas dos cinco queijos de coalho caprino analisadas durante 28 dias de armazenamento. As frações de caseínas detectadas em maior abundância nos queijos foram as  $\alpha_{s2}$  e  $\beta$ -caseína, que quando hidrolisadas liberam peptídeos de alto, médio e baixo peso molecular e aminoácidos (RANDAZZO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012). Em leite caprino, a  $\beta$ -caseína é encontrada em

predominância e esta fração é muito importante para a formação da coalhada em menor tempo e consistência mais firme (STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

A  $\alpha_{s2}$ -caseína é encontrada em leite de mamíferos, porém em maior concentração em caprinos (SELVAGGI et al., 2014). Já a  $\alpha_{s1}$ -caseína, pode ser detectada ou não em leite caprino, onde este diferencial de presença, ausência ou quantidade, está relacionado com a genética das cabras (OLALLA et al., 2009). O baixo nível desta fração é desejável pois desta forma tornará o leite menos alergênico. A proporção da  $\alpha_{s1}$ -caseína nos leites caprinos e bovinos é a maior diferença relacionada no perfil proteico dos mesmos. Durante o processamento e armazenamento de queijos ocorre a liberação de peptídeos, decorrente da ação proteolítica de enzimas. Entretanto, a característica dos peptídeos liberados são decorrentes da composição proteica do leite e das enzimas envolvidas nesta reação. Os peptídeos liberados podem ser capazes de realizar atividades biológicas como, antioxidantes e antimicrobianos (COSTA et al., 2014).

A proporção de  $\alpha_{s1}$ -caseína detectada nos queijos avaliados, exibiram concentrações reduzidas ao longo da estocagem, indicando assim que estes queijos podem ser consumidos por pessoas portadoras de alergia a proteína de produtos lácteos (ALBENZIO; SANTILLO, 2011). As frações de  $\alpha_{s2}$  e k-caseína apresentaram maior grau de hidrólise ao longo do armazenamento, comparando com as demais frações detectadas em bandas, para os queijos de coalho caprino.

A k-caseína é uma fração proteica muito importante porque fica localizada na região externa das micelas de caseína, a qual será responsável pela estabilidade da estrutura (SELVAGGI et al., 2014). A k-caseína desde o 1º dia após o processamento exibiu redução brusca nos queijos produzidos com o *B. lactis* e a co-cultura, entretanto, nos demais queijos, com destaque para o queijo adicionado de *L. acidophilus*, observou-se degradação desta fração proteica a partir do 7º dia. Provavelmente, esta redução precoce indica a intensa ação proteolítica da *B. lactis* e conseqüentemente da co-cultura devido a sua presença da mesma.

Avaliando a redução da tonalidade da banda da fração de  $\alpha_{s2}$ -caseína, pode-se verificar maior ação proteolítica da *B. lactis*, dentre as bactérias lácticas avaliadas. Albenzio et al. (2013) ao analisar o perfil eletroforético de queijo ovino Scamorza,

também destacaram elevado grau de hidrólise da  $\alpha$ -caseína pela *B. lactis*, em comparação com queijo elaborado com cultura convencional.

Devido à resistência de degradação da  $\beta$ -caseína, nenhuma diferença no grau de hidrólise desta fração foi detectada entre os queijos processados. Esta resistência é considerada desejável do aspecto sensorial, porque os hidrolisados resultantes desta fração caseica possuem sabor amargo (KIRMACI et al., 2014). A  $\alpha$ -caseína possui maior facilidade de degradação em relação a  $\beta$ -caseína, comportamento esse que também foi detectado em outros estudos realizados em queijos (BONTINIS et al., 2012; HAYALOGLU et al., 2013).

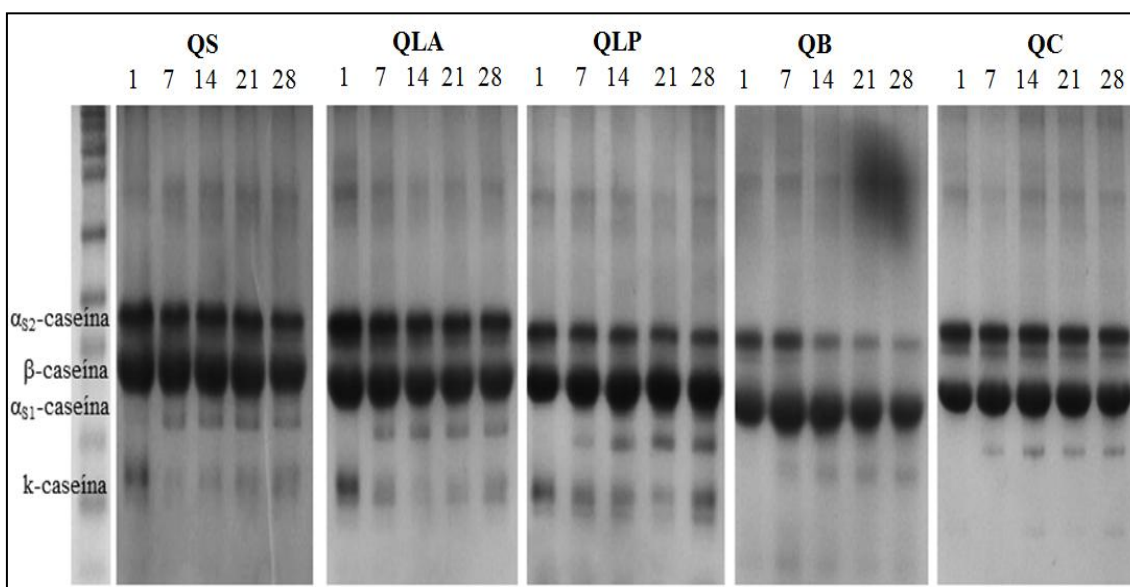


Figura 2. Frações proteicas de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.

### 3.4 ANÁLISE DE HIDROFIBICIDADE DE PEPTÍDEOS

A ação das enzimas proteolíticas resulta na liberação e degradação de peptídeos presentes na cadeia proteica. O comportamento da hidrofobicidade dos peptídeos

extraídos dos cinco queijos analisados está apresentado na Figura 3. A separação dos peptídeos foi realizada utilizando um gradiente linear (100 a 0%) de água durante 60 minutos, desta forma os peptídeos eluídos do 0 aos 30 minutos de análise possuíam propriedade hidrofílica e dos 30 aos 60 minutos caráter hidrofóbicos. Desta forma, observa-se que os queijos de coalho caprino possuem perfil peptídico de característica hidrofílica.

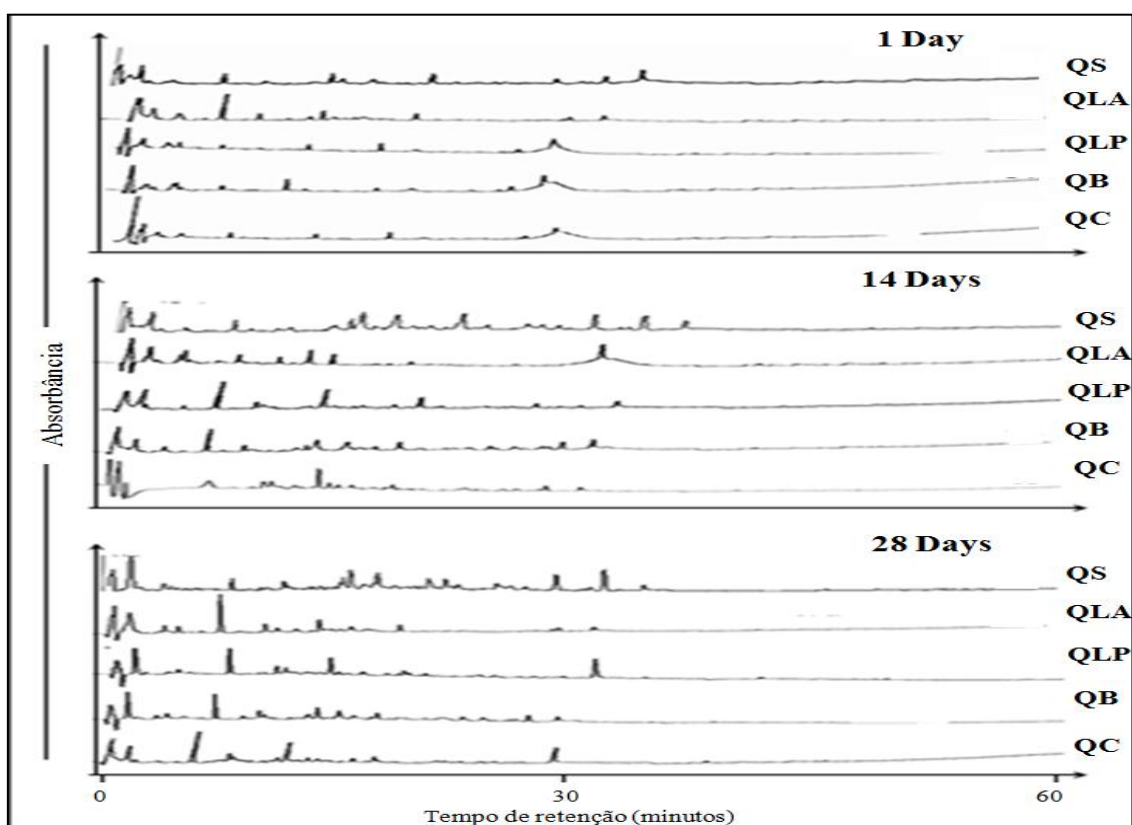


Figura 3. HPLC-fase reversa de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento a  $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.

Analisando a área total dos cromatogramas do perfil de peptídeos, com exceção do queijo adicionado com co-cultura, os demais apresentaram aumento ( $p < 0,01$ )

durante os 28 dias de armazenamento (Figura 4). Ressaltando que o acréscimo obtido ao longo da estocagem foi de 90% no queijo controle, 194% no processado com *L. acidophilus*, 52% com *L. paracasei* e 41% no queijo produzido com *B. lactis*.

Avaliando as Figuras 3 e 4 se observa que o queijo elaborado com *L. acidophilus* apresentou ao término do armazenamento maior ( $p < 0,01$ ) proporção de peptídeos liberados, quando comparado aos demais queijos. A maior intensidade de produção de peptídeos pelo *L. acidophilus*, provavelmente, resultou da maior existência e ação de endopeptidases produzidas por estes presentes micro-organismo probiótico (ALBENZIL et al., 2013).

Diferentemente do queijo de coalho caprino do tratamento QLA, os queijos elaborados com *L. paracasei*, *B. lactis* e com a co-cultura exibiram aumento ( $p < 0,01$ ) até o 14º dia do estudo, e redução ao atingir o 28º dia. Este decréscimo provavelmente resultou da proteólise mais intensa destes queijos, causada pela ação das culturas lácticas utilizadas na sua elaboração. Sabe-se que as bactérias lácticas em questão – *L. paracasei*, *B. lactis* e co-cultura - apresentam exopeptidases, que atuam nas regiões N ou C terminal das cadeias peptídicas, e liberam um único resíduo de aminoácido (HAYALOGLU et al., 2013).

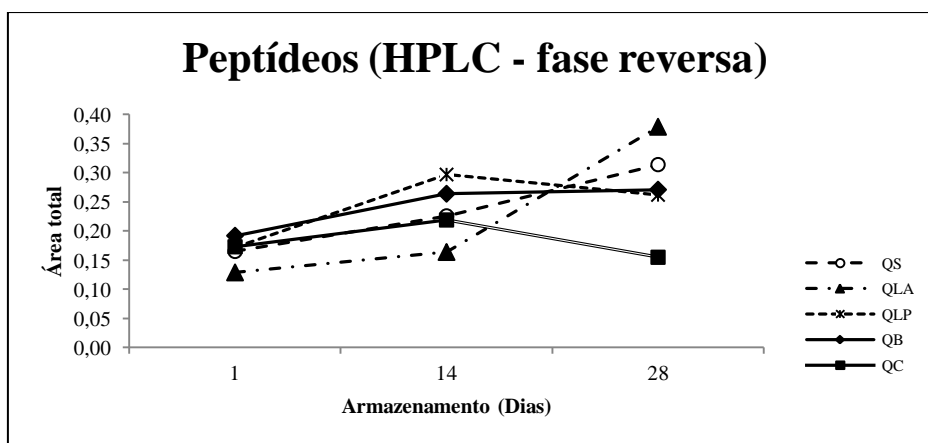


Figura 4. Área total de HPLC-fase reversa de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao longo de 28 dias de armazenamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.

### 3.5 ANÁLISE DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES

A adição de bactérias lácticas probióticas e o tempo de estocagem influenciaram NA liberação de aminoácidos nos queijos de coalho caprino avaliados (Figura 5). No primeiro dia após o processamento a co-cultura promoveu elevada ação proteolítica, aumentando a concentração de aminoácidos livres. Entretanto, ao longo do tempo esta liberação foi mais intensificada pela ação das bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus*. Michaelidou et al. (2003) verificaram que bactérias desse gênero ocasionam elevada atividade proteolítica em decorrência da atuação de suas peptidases.

Dentre os 18 aminoácidos quantificados, 7 aminoácidos essenciais (isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina, triptofano, valina e tirosina) e 2 não essenciais (prolina e arginina) se destacaram no perfil dos aminoácidos livres dos queijos de coalho caprino. Destaca-se que a produção de aminoácidos livres contribui para o sabor característico dos queijos, além de contribuir como precursores para outras reações catabólicas que originam cetoácidos, amônia, aminas, aldeídos, ácidos e álcoois, que são colaboradores essenciais para o gosto e aroma do queijo (ILICIC et al., 2012). A fenilalanina e a tirosina são uns dos principais aminoácidos que participam da reação de degradação de Streck, a qual também leva a formação de compostos aromáticos impactantes no aroma do queijo (IRIGOYEN et al., 2007).

Vale citar que aos 28 dias de armazenamento, a concentração de arginina se destacou pela ação da co-cultura, fato importante uma vez que este aminoácido quando convertido a óxido nítrico, desempenha papel de vasodilatador, que pode atuar no controle da hipertensão arterial (POTJE et al., 2014).

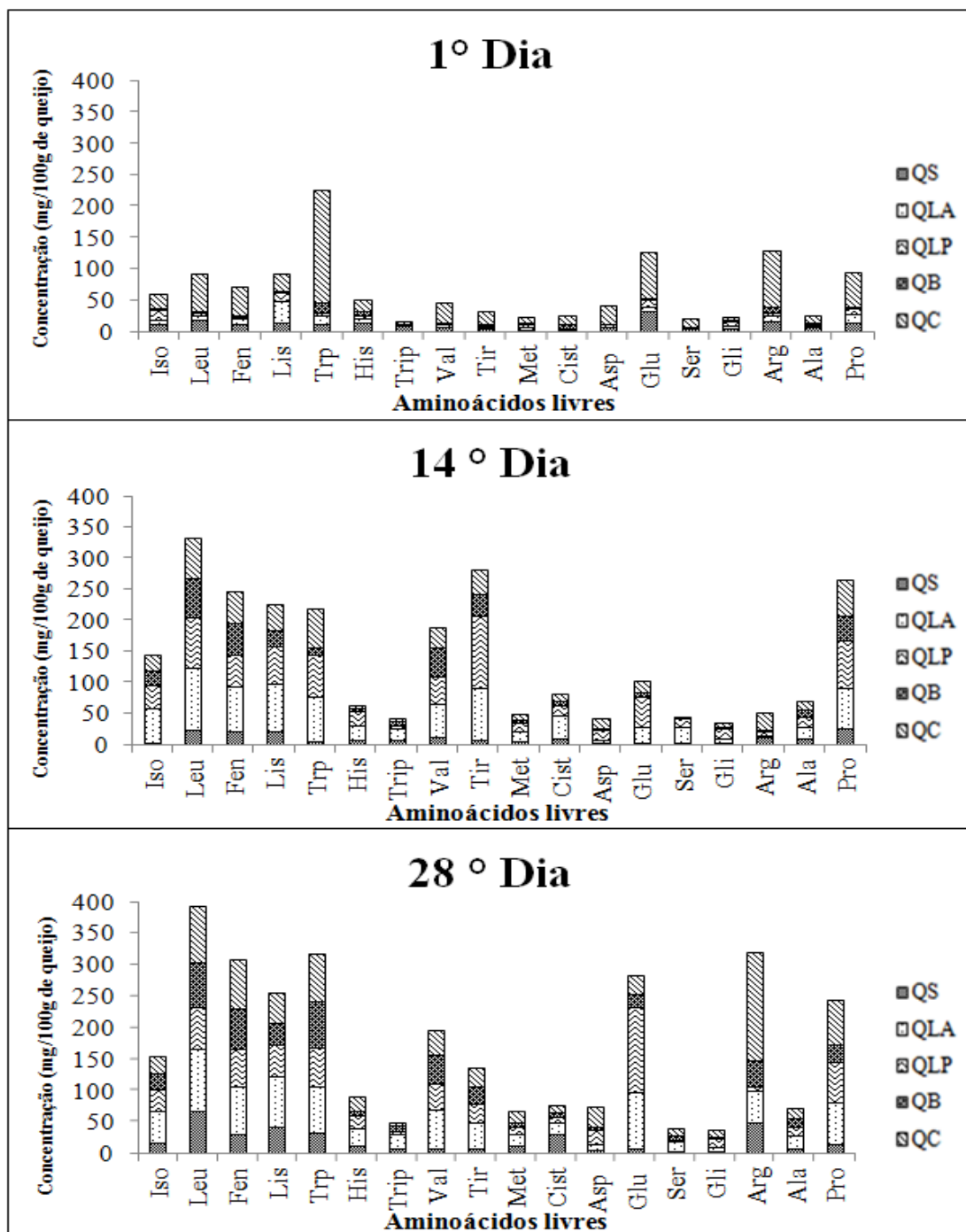


Figura 5. Perfil de aminoácidos livres de queijos de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas e de cultura “starter” ao 1º, 14º e 28º dia de armazenamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . QS - Queijo de coalho caprino com cultura “starter”; QLA - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus acidophilus*; QLP - Queijo de coalho caprino com *Lactobacillus paracasei*; QB - Queijo de coalho caprino com *Bifidobacterium lactis*; QC- Queijo de coalho caprino com co-cultura.



A análise de componentes principais foi aplicada para avaliar o comportamento das culturas lácticas probióticas, de acordo com a liberação de aminoácidos livres ao longo do armazenamento do queijo de coalho caprino (Figura 6). Os dois componentes principais CP1 e CP2, apresentaram variância de 61% e 15%, respectivamente.

Analisando a Figura 6 observa-se que com excessão do queijo produzido com a co-cultura, todos apresentaram correlação no 1º dia de armazenamento. A co-cultura, devido ao seu efeito sinérgico ocasionou elevada liberação de aminoácidos logo no 1º dia de estocagem, efeito que pode ser visualizado principalmente, pela presença dos aminoácidos arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico e glicina, situados no eixo positivo de PC1 e PC2. A quantidade desses aminoácidos apresentaram redução ao longo do armazenamento no queijo QC, provavelmente devido a utilização destes aminoácidos livres, como substrato para co-cultura.

É importante enfatizar que os aminoácidos liberados pelas enzimas proteolíticas podem passar por processo de conversão (desaminação, descarboxilação e desidrogenação) e em seguida serem catabolisados pelas culturas bacterianas (SINZ; SCHWAB, 2012).

Avaliando o eixo positivo do PC1, visualiza-se que o queijo elaborado com *L. acidophilus*, expôs maior influência na liberação de aminoácidos livres ao longo de todo o armazenamento, quando comparado com os demais queijos avaliados. Os queijos que apresentaram maiores correlações entre si foram QS com QB e QLP com QC, porém esses queijos exibiram menor produção de aminoácidos livres.

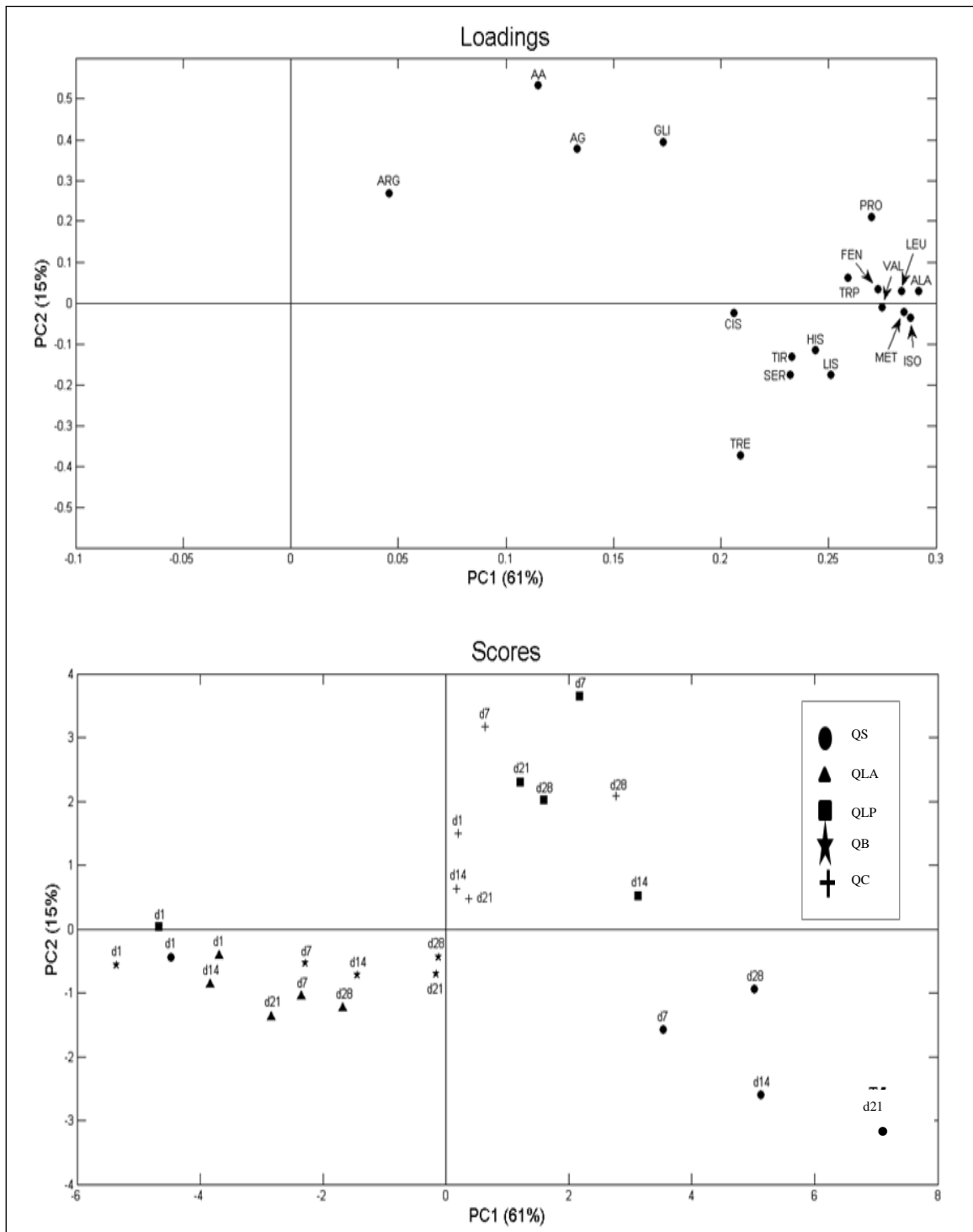


Figura 6. Análise de componentes principais de variáveis definidas em dois componentes principais.

## 4 CONCLUSÃO

Diferentes culturas probióticas utilizadas na elaboração de queijo de coalho caprino oferecem algumas vantagens em comparação ao elaborado com cultura “starter”, em relação ao desenvolvimento da proteólise. O uso combinado das culturas probióticas foi mais eficiente em elevar o teor de proteína solúvel, e conseqüentemente aumentar o índice proteolítico de profundidade, com maior liberação de aminoácidos logo no 1º dias após o processamento. Os queijos de coalho caprino probióticos exibiram o índice de proteólise em extensão máxima após 7 dias de estocagem, onde as frações de  $\alpha_2$  e k-caseína mostraram maior grau de hidrólise ao longo do armazenamento. Dentre os queijos elaborados com bactérias probióticas isoladas, enfatiza-se que a *B. lactis* exibiu ação proteolítica intensificada, exibindo elevado teor de proteína solúvel e maior degradação da fração de  $\alpha_2$  caseína ao longo do armazenamento. Estudos futuros devem focar a atuação destes probióticos na formação do flavour/aroma de queijos de coalho caprino probióticos.

## REFERÊNCIA

ANDREATTA, E.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V.; MARQUES, M. C.; GIGANTE, M. L.; OLIVEIRA, C. A. F. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 166-170, 2007.

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: effect on the quality of dairy products. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 33-40, 2011.

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M.; RUGGIERI, D.; NAPOLITANO, F.; SEVI, A. Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. **Journal Dairy of Science**, v. 96, n. 5, p. 2781-2791, 2013.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Gaithersburg, MD, USA, 2010.

BONTINIS, T. G.; MALLATOU, H.; PAPPA, E. C.; MASSOURAS, T. H.; ALICHANIDIS, E. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 193-201, 2012.

BURNS, P.; CUFFIA, F.; MILESI, M.; VINDEROLA, G.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; HYNES, E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food microbiology**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2012.

COSTA, W. K. A.; SOUZA, E. L.; BELTRÃO-FILHO, E. M.; VASCONCELOS, G. K. V.; GADELHA, T. S.; GADELHA, C. A. A.; FRANCO, O. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MAGNANI, M. Comparative Protein Composition Analysis of Goat Milk Produced by the Alpine and Saanen Breeds in Northeastern Brazil and Related Antibacterial Activities. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1-9, 2014.

DE VUYST, L. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. **Food Technology and Biotechnology** v. 38, n. 2, p. 105-112, 2000.

EGITO, A S.; MICLO, L.; LÓPEZ, C.; ADAM, A.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Separation and characterization of mares' milk alpha(s1)-, beta-, kappa-caseins, gamma-casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 4, p. 697-706, 2002.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 7ed. AOAC International, Arlington, VA, USA, 1992.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MACHADO, T. A. D.; SOUZA, E. L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947-56, 2012.

GOMES, A. A.; BRAGA, S. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; LOLLO, P. C. B.; CARVALHO, C.; AMAYA-FARFÁN, J.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H.M.A. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 10, p. 4777-4786, 2011.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

HAYALOGLU, A. A.; TOLU, C.; YASAR, K. Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 187-194, 2013.

ILIČIĆ, M. D.; MILANOVIĆ, S. D.; CARIĆ, M. D.; KANURIĆ, K. G.; VUKIĆ, V. R.; HRNJEZ, D. V.; RANOGAJEC, M. I. Volatile compounds of functional dairy products. **Acta Periodica Technologica**, v. 43, p. 11-19, 2012.

- IRIGOYEN, A.; ORTIGOSA, M.; JUANSARAS, I.; ONECA, M.; TORRE, P. Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe's-milk cheese. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 71-80, 2007.
- KIRMACI, H. A.; HAYALOGLU, A. A.; OZER, H. B.; ATASOY, A. F.; TURKOGLU, H. Evolution of proteolysis in Urfa cheese made from ewe's milk by wild type starter culture systems. **Small Ruminant Research**, v. 119, n. 1-3, p. 120-129, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MICHAELIDOU, A.; KATSIARI, M. C.; VOUTSINAS, L. P.; KONDYLI, E.; ALICHANIDIS, E. Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 9, p. 743-753, 2003.
- OLALLA M.; RUIZ-LOPEZ M. D.; NAVARRO M.; ARTACHO R.; CABRERA C.; GIMÉNEZ, R.; RODRIGUEZ, C.; MINGORANCE, R. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. **Food Chemistry**, v. 113, n. 3, p. 835-838, 2009.
- OLIVEIRA, E. M. G.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.
- POTJE, S. R.; MUNHOZ, F. C.; PERASSA, L. A.; GRATON, M. E.; PEREIRA, A. A. F.; NAKAMUNE, A. C. M. S.; SILVA, R. S.; BENDHACK, M. L.; SUMIDA, D. H.; ANTONIALI, C. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO<sup>3+</sup>, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 222-229, 2014.
- QUEIROGA, R. D. C. R. D. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.
- RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; RIBBERA, A.; CAGGIA, C. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 363-74, 2010.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M.; MALCATA, X.; FREITAS, A. C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.

SELVAGGI, M.; LAUDADIO, V.; DARIO, C.; TUFARELLI, V. Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 2, p. 1035-1048, 2014.

SANTOS, K. M. O.; BOMFIM, M. A. D.; VIEIRA, A. D. S.; BENEVIDES, S. D.; SAAD, S. M. I.; BURITI, F. C. A.; EGITO, A. S. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2012.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal components analysis in the software Assistat - Statistical attendance World Congress on Computers in Agriculture7, **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Reno-NV-USA, 2009.

SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1533-1538, 2012.

SINZ, Q.; SCHWAB, W. Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. **Food microbiology**, v. 29, n. 2, p. 215-223, 2012.

STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 135-41, 2013.

TALWALKAR, A. MILLER, C.W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M.H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International Journal of Food Science and Technology** v. 39, n. 6, p. 605-611, 2004.

VO, T. S.; KIM, S. K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 16-17, 2013.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WOLF, I. V.; PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; ZALAZAR, C. A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggiano Argentino cheese: Characterization of Reggiano Argentino cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1204-1211, 2010.

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta a primeira caracterização de lipólise, proteólise e perfil de voláteis de queijo de coalho caprino adicionado de bactérias probióticas durante o armazenamento.

O estudo de otimização da técnica de HS/SPME/GC/MS indicaram que as condições ótimas para a extração de compostos voláteis SPME de queijo de coalho caprino foram obtidos com o tempo de equilíbrio de 20 minutos, tempo de extração de 40 minutos e a temperatura de extração de 45 °C, onde nestas condições foram detectados 28 compostos voláteis no queijo de coalho caprino comercial.

O uso das diferentes culturas lácticas probióticas afetou o perfil químico de queijo de coalho caprino, alterando seu perfil lipídico, aromático e protéico.

Queijos probióticos apresentaram aumento nos teores de gordura e colesterol durante 28 dias de armazenamento a 10 °C. Queijos caprinos elaborados com *Bifidobacterium lactis* e a co-cultura sobressaíram-se nas concentrações de CLA, com melhores índices de AGPI/AGS, DFA, IA e IT.

Vinte e cinco compostos voláteis foram identificados nos queijos de coalho caprino adicionado de bactérias probiótica e queijo de coalho tradicional, sendo 6 álcoois, 4 hidrocarbonetos, 4 terpenos, 3 ácidos, 3 cetonas, 3 aldeídos e 2 ésteres. Nos cinco queijos coalho caprinos avaliados observou-se aumento na produção de ésteres ao longo do armazenamento e redução de aldeídos. Os ésteres, compostos com origem lipolítica, tem importância na qualidade aromática de queijos.

O uso da combinação das culturas probióticas (co-cultura) foi mais eficiente, elevando o teor de proteína solúvel e, conseqüentemente, apresentou aumento do índice proteolítico de profundidade, com maior liberação de aminoácidos no 1º dias após o processamento. Os queijos de coalho caprino probióticos apresentaram índice de proteólise em extensão máxima após 7 dias de estocagem e as frações de  $\alpha_2$  e k-caseína foram as que obtiveram maior grau de hidrólise ao longo do armazenamento destes queijos.

O queijo elaborado com *B. lactis* exibiu ação proteolítica mais intensa, apresentando elevado teor de proteína solúvel e maior degradação da fração de  $\alpha_2$  caseína ao longo do armazenamento.

Consequentemente, ressalta-se que os queijos probióticos fabricados a partir de leite de cabra adicionados do *Bifidobacterium lactis* e da co-cultura de probióticos resultaram em queijo de coalho com maior qualidade no perfil proteico.