

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE QUÍMICA E DE TOXICIDADE DE
CREME DE SOJA FUNCIONAL, COM ESPECIARIAS, AZEITE DE
OLIVA E PROBIÓTICOS.**

RENATA ALVES MAZUCO

VILA VELHA
JANEIRO / 2023

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE QUÍMICA E DE TOXICIDADE DE
CREME DE SOJA FUNCIONAL, COM ESPECIARIAS, AZEITE DE
OLIVA E PROBIÓTICOS.**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do grau de Doutor (a) em Biotecnologia Vegetal.

RENATA ALVES MAZUCO

VILA VELHA
JANEIRO / 2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M475d

Mazuco, Renata Alves.

Desenvolvimento, análise química e de toxicidade de creme de soja funcional, com especiarias, azeite de oliva e probióticos / Renata Alves Mazuco – 2023.

74 f. : il.

Orientador: Dominik Lenz.

Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Vila Velha, 2023.

Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Probiótico. 3. Soja.
4. Óleos e gorduras. I. Lenz, Dominik. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD: 660.603

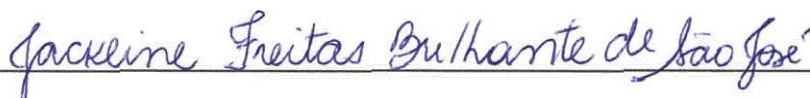
RENATA ALVES MAZUCO

**DESENVOLVIMENTO, ANÁLISE QUÍMICA E DE TOXICIDADE DE CREME
DE SOJA FUNCIONAL COM ESPECIARIAS, AZEITE DE OLIVA E
PROBIÓTICOS.**

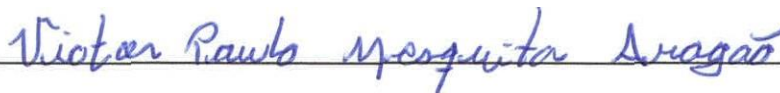
Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do grau de
Doutor (a) em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 31 de janeiro de 2023.

Banca examinadora:



Prof. Dra. Jackeline Freitas Brilhante de São José (UFES)



Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão (UW)



Prof. Dr. Carmelita Zacchi Scolforo (UW)



Prof. Dr. Dominik Lenz (UW)
Orientador

Dedico essa tese a Deus Pai, meus pais e amigos sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é a Deus Pai, que desde o primeiro mês desse curso, foi providencial de diversas formas, tornando tudo possível até aqui. Durante esses 4 anos, eu vivia alguns altos e baixos, principalmente nos últimos 5 meses, onde eu queria ter estado na minha melhor performance de produção, mas não pude, por motivos pessoais. Sem a minha fé e sem a misericórdia Dele, eu não teria conseguido.

Quero registrar a minha honra e gratidão aos meus pais, Roberto e Catarina, que sempre trabalharam muito e à maneira deles, me apoiaram a chegar até aqui. Também agradeço ao meu amor Vinicius, pelo apoio incondicional nos últimos anos.

Ao meu orientador, professor Dominik Lenz, agradeço por toda orientação e suporte durante o curso, sua atenção e paciência, foram primordiais. Obrigada por ter compartilhado comigo sua inteligência e ensinamentos.

Às professoras, Denise Endringer e Christiane Mileib, meus sinceros e imensos agradecimentos, sempre foram muito solícitas comigo, todas as vezes que as procurei para pedir ajuda e resolver dúvidas. As orientações e contribuições de ambas, sempre foram muito válidas.

Agradeço ao professor Tadeu Andrade, por gentilmente ter cedido o seu laboratório para realização dos experimentos, envolvendo o verme *C. elegans*. Também agradeço a todos seus alunos de iniciação científica envolvidos, não irei citar nomes pois foram vários ao longo de várias análises, mas fica meu agradecimento a todos e o desejo de sucesso na caminhada de cada um. Agradeço a mestrande Caroline Regonini, também do mesmo laboratório, pelo apoio, foi um prazer trabalhar com você.

À Iêda, agradeço por ter me auxiliado na organização de experimentos, foi muito bom ter me aproximado e ter conhecido você melhor. De minha professora da faculdade, tornou-se amiga e paciente! Obrigada por todo apoio e que Deus abençoe abundantemente a sua vida!

Ana Carolina Bianco, como foi bom me aproximar de você no último ano, me faltam palavras para agradecer todo seu apoio e contribuição, tanto na pesquisa quanto na minha vida pessoal. Me faltam palavras para falar de sua bondade, em você eu enxergo Cristo. Sua amizade é para vida, e eu desejo que Deus derrame bençãos abundantes sobre tudo o que

você tocar.

Agradeço imensamente à Clarisse Arpini, por sua ajuda impagável no último semestre, você me ajudou tornar possível partes valiosas do meu trabalho e eu desejo muito sucesso em sua jornada como esposa, mãe e pesquisadora, você é luz.

Meus mais sinceros agradecimentos a Ana Cláudia Hertel, por todas as incontáveis vezes que me ajudou, é impossível citá-las. Sempre com um sorriso no rosto e uma gentileza que inspira todos ao seu redor, muito obrigada!

Agradeço também à Débora e Gabrielly, pela amizade de ambas, onde compartilhamos angústias e alegrias. Obrigada também por terem me ajudado, seja com experimentos ou com uma palavra de apoio ou de incentivo. Que Deus Pai abençoe a vida de vocês!

Quero agradecer também à todas pessoas, do laboratório do professor Márcio Fronza e do professor Rodrigo Scherer, que durante o percurso me ajudaram, providenciando uma vidraria, um reagente na correria dos experimentos ou cedendo o seu tempo, para me ajudar resolver alguma questão. Muito Obrigada!

Agradeço à Universidade Vila Velha (UVV), local onde construí toda minha trajetória acadêmica. Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo pelo financiamento da pesquisa. E a todos os amigos que não citei e que de alguma forma ajudaram e me apoiaram, muito obrigada, essa vitória também é de vocês!

SUMÁRIO

1. Fundamentação teórica	14
1.1 Queijos análogos	14
1.2 Soja.....	15
1.2 Gordura poli-insaturadas.....	17
1.2 Compostos bioativos: compostos fenólicos	19
1.3 Probióticos	21
Hipótese:	22
Objetivos	22
Objetivos gerais	22
Objetivos específicos.....	22
Referências	23
Capítulo 1:.....	27
Abstract.....	28
1. Introduction	29
1.1 Materials and methods.....	31
1.2 Materials.....	31
1.3 Preparation of samples.....	31
1.4 Tofu and Cream Cheese Analogue Composition	32
1.5 Quantification of total phenolics.....	32
2. Lipids Extraction	33
2.1 Determination of fatty acid profile by GC-FID	33
2.2 Sample Preparation.....	33
2.3 Chromatographic conditions.....	34
2.4 Identification, quantification and semi-quantification of FAME	34
2.5 Evaluation of in vivo toxicity using the animal model <i>Caenorhabditis elegans</i> (C. elegans)	34
2.5.1 Strain preparation <i>Caenorhabditis elegans</i>	34

2.5.2 Treatment.....	35
2.5.3 <i>C. elegans</i> mortality assessment.....	35
2.5.4 <i>C. elegans</i> development assessment.....	35
3. Statistical Analysis.....	36
4. Results and Discussion.....	37
5. References.....	44
Capítulo 2.....	44
Resumo.....	49
Abstract.....	50
1. Introdução.....	51
2. Materiais e métodos.....	53
2.1 Materiais.....	53
2.2 Preparação das amostras sem probióticos.	53
2.3 Preparação das amostras com adição de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Lra05)	54
2.3 Composição Centesimal.....	54
2.4 Preparação dos extratos para quantificação de polifenóis totais e flavonóides	54
2.5 Quantificação de polifenóis totais e flavonóides.	55
2.6 Análises microbiológicas.....	55
2.7 Ensaio para estresse químico em modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	56
3. Análises Estatísticas.....	58
4. Resultados.....	59
4.1 Composição Centesimal.....	59
4.2 Quantificação de fenólicos totais e flavonoides.....	60
4.3 Contagem microbiológica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e pH	62
4.4 Contagem de bactérias mesófilas e fungos totais	63
4.5 Estresse Oxidativo Químico em modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	65

5. Discussão.....	67
6. Considerações finais	76
7. Referências.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AlCl_3 – Cloreto de alumínio

BF_3 methanolic solution - Complexo de trifluoreto de boro-metanol

GC-FID – Cromatografia gasosa acoplada a detector de *ionização por chama (FID)*

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

KCl – Cloreto de potássio

KH_2PO_4 – Fosfato de potássio monobásico

NaCl – cloreto de sódio

NGM - Nematode Growth Medium

NMP – Número mais provável

NaOH – Hidróxido de sódio

Na_2PO_4 – Fosfato dissódico

MgSO_4 – Sulfato de magnésio

pH - potencial hidrogeniônico

PTFE - politetrafluoretileno

RESUMO

MAZUCO, RENATA ALVES, D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, janeiro de 2023. **Desenvolvimento, análise química e de toxicidade de creme de soja funcional, com especiarias, azeite de oliva e probióticos.** Orientador: Dominik Lenz.

Uma dieta composta por alimentos de origem vegetal, promove benefícios a saúde, como a prevenção de doenças cardiovasculares e outros fatores de risco, como redução da inflamação e dos níveis de lipídios no sangue. A soja é um alimento que possui proteínas e polifenóis em sua composição, que beneficiam organismo. Os probióticos são microrganismos que promovem benefícios a saúde, como o equilíbrio da flora intestinal. O azeite de oliva é uma fonte de gorduras insaturadas e polifenóis, como o hidroxitirosol, sua utilização na dieta está associada a benefícios a saúde. Objetivo dessa pesquisa foi desenvolver, um alimento saudável a partir do tofu, com a adição de especiarias, cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, azeite de oliva, e realizar a caracterização de sua composição, quantificação de polifenóis e analisar sobrevivência dos probióticos sob armazenamento em geladeira. Foi observado que com a fermentação das bactérias o teor de polifenóis aumentou ao longo dos dias e que possivelmente elas auxiliaram na redução do crescimento de outros microrganismos deteriorantes.

Palavras chaves: *Tofu, soja, probióticos, gorduras poli-insaturadas, GC-FID.*

ABSTRACT

MAZUCO, RENATA ALVES, D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, janeiro de 2023.
Development, chemical and toxicity analysis of functional soy cream with spices, olive oil and probiotics. Orientador: Dominik Lenz.

A diet composed of plant-based foods promotes health benefits, such as the prevention of cardiovascular disease and other risk factors, such as reduced inflammation and blood lipid levels. Soy is a food that has proteins and polyphenols in its composition, which benefit the body. Probiotics are microorganisms that promote health benefits, such as the balance of intestinal flora. Olive oil is a source of unsaturated fats and polyphenols, such as hydroxytyrosol, and its use in the diet is associated with health benefits. The objective of this research was to develop a healthy food from tofu, with the addition of spices, strains of *Lactobacillus rhamnosus*, olive oil, and to characterize its composition, quantify polyphenols and analyze the survival of probiotics under storage in a refrigerator. It was observed that with the fermentation of bacteria, the polyphenol content increased over the days and that possibly they helped to reduce the growth of other deteriorating microorganisms.

Key words: Tofu, soy, probiotics, polyunsaturated fats, GC-FID.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Queijos análogos

Os queijos análogos, são os produtos que substituem ou imitam o com parcial ou total substituição do leite por produtos não lácteos, geralmente de origem vegetal (Dhanraj et al., 2017; Short et al., 2021). A alimentação denominada “plant based” são caracterizadas pelo consumo majoritário ou exclusivo de alimentos de origem vegetal, como vegetarianismo e veganismo. Tais dietas têm ganhado espaço na sociedade científica e também entre a população geral, se tornando alguns dos principais padrões alimentares adotados nos países ocidentais (MARRONE et al., 2021).

Uma revisão sistemática de estudos clínicos randomizados relatou diversos benefícios relacionados às dietas à base de plantas. Tais benefícios estariam relacionados à modulação da microbiota intestinal, função cerebral, entre outros aspectos. Desta forma, os autores relataram que este padrão dietético pode ser um aliado ao tratamento e redução do risco de doenças relacionadas ao envelhecimento e à obesidade (MEDAWAR et al., 2019). Além disso, um estudo em 2019 avaliou que indivíduos que consomem dietas à base de plantas possuem índice de massa corporal mais baixo (IMC), triglicerídeos, colesterol total e colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e glicemia reduzidos, em comparação a indivíduos onívoros (KIM et al., 2019). Por fim, tais dietas estão associadas ainda a uma redução significativa no risco de doença cardiovascular e do desenvolvimento de câncer (MARRONE et al., 2021).

Por outro lado, sabe-se que leite e produtos lácteos têm alto valor nutricional e contribuem no fornecimento de nutrientes importantes como proteínas, cálcio e zinco para grande parte da população. Vale ressaltar, contudo que o perfil lipídico do leite contém mais de 70% de gorduras saturadas, que estão associados a um aumento risco de doenças cardíacas e arteriais (AINI et al., 2019). Por isso, a substituição da gordura do leite por fontes de lipídeos vegetais é uma alternativa para obter produtos alimentícios com ácidos graxos mono e polinsaturados com bom perfil lipídico. Sendo assim, bebidas vegetais, são um dos grupos de alimentos muito utilizados como ingrediente em muitos produtos alimentícios utilizados na dieta à base de plantas, como iogurte, queijo, kefir, manteiga e sorvete. Além disso, também são necessários para os consumidores que têm intolerância à lactose ou alergia ao leite de vaca (AYDAR;

TUTUNCU; OZCELIK, 2020). Neste contexto, segundo Kamath; Basak e Gokhale (2022), existe uma tendência de busca por opções de laticínios à base de vegetais, de forma que este setor da indústria de alimentos deve atingir um tamanho de mercado global de 52,58 bilhões de dólares até 2028.

Queijos análogos são produzidos a partir da mistura de ingredientes como gorduras ou proteínas não lácteas, dando origem a um produto semelhante ao queijo (BACHMANN, 2001). Conforme a matriz envolvida no processo produtivo e nos ingredientes utilizados, os queijos análogos podem ser agrupados como queijos análogos lácteos (caseína, caseinatos, gordura do leite, etc.); queijos análogos parciais (caseína, caseinatos, óleo de soja, etc.) e queijos análogos não lácteos (proteína de milho, proteína de soja, óleo de soja, etc.) (KAMATH; BASAK; GOKHALE, 2022).

Os queijos análogos estão sendo cada vez mais usados, devido ao seu custo-benefício, pela simplicidade de fabricação e à substituição de ingredientes lácteos por produtos vegetais mais baratos. Vale ressaltar ainda que as vendas de queijos análogos estão intimamente ligadas ao desenvolvimento do setor de alimentos de conveniência, que são capazes de ampliar a oferta e reduzir custos (Bachmann, 2001). Aini et al. (2019) relataram estudos sobre queijos análogos produzidos a partir de diversas matérias primas, incluindo gel de pectina, arroz, damasco, inulina e soja, sendo este último o ingrediente mais comumente utilizado na produção de queijos análogos, seja como substituto para a porção lipídica, devido ao alto valor nutricional dos lipídios da soja, ou como substituto para porção proteica, também devido ao alto percentual proteico dos grãos (Kamath; Basak; Gokhale, 2022).

1.2 Soja

A soja (*Glycine max*) é um alimento mundialmente popular, especialmente na Ásia, sendo também uma das principais culturas do mundo, com mais de 300 milhões de toneladas produzidas globalmente (Mosallanezhad et al., 2021). No Japão, é utilizada como matéria-prima para tofu, natto, molho de soja e missô, enquanto em outros países, é usada principalmente para óleo e ração para gado, além da produção de bebida vegetal e farinha de soja (Sugiyama, 2019).

Ao todo, já foram somados mais de 12000 produtos que contêm soja, dentre eles: soja cozida, soja torrada, missô, queijo de soja, maionese de soja, leite de soja, molho de soja, iogurte de soja, tamari, tempeh, proteína texturizada de soja (TSP) ou proteína vegetal texturizada (TVP) e tofu. Eles são consumidos em grande escala e

constituem a base de muitas dietas asiáticas, principalmente na Ásia Oriental, o que demonstra grande interesse da população por estes alimentos (JAYACHANDRAN; XU, 2019).

Um dos motivos responsáveis pelo aumento da popularidade e, conseqüentemente, do consumo de soja, se dá pela viabilidade de sua aplicação na indústria de processamento de alimentos, uma vez que sua utilização promove não a redução de custos de produção, e por ser nutritiva favorece a padronização de qualidade (Mosallanezhad et al., 2021)

Segundo Cao et al. (2019), após a descoberta da redução do risco câncer de mama, em mulheres na pré-menopausa, que consumiam uma dieta rica em soja, os alimentos à base de soja receberam maior atenção na sociedade. Sendo assim, outro fator que corrobora com a importância da soja está relacionado aos seus potenciais benefícios para a saúde (Otun et al., 2019). Autores relataram que orientais que ingerem mais soja e produtos derivados de soja são menos suscetíveis ao câncer de mama do que os ocidentais que não os consomem (Jayachandran; Xu, 2019). Estudos de revisão de literatura, mostraram que produtos derivados de soja são eficientes para reduzir níveis lipídicos em animais hiperlipidêmicos, além de exercer efeitos benéficos sobre vários outros fatores de saúde, como controle da pressão arterial, função da tireoide, câncer de próstata e funções renais, além de fornecer proteção contra osteoporose, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer de mama e câncer de próstata (Jayachandran; Xu, 2019; Otun et al., 2019).

A soja se caracteriza por conter compostos como proteínas, lipídios, fibras, vitaminas, minerais e fitoquímicos, como as isoflavonas (Mosallanezhad et al., 2021). Neste contexto, Otun et al. (2019) relataram que os dois principais componentes da soja responsáveis pelos benefícios à saúde são a proteína da soja e as isoflavonas da soja.

O grão de soja possui, em média, 40,3% de proteína, 21,0% de lipídeos, 33,9% carboidrato e 4,9% de cinzas em base seca (Fonseca et al., 2020). De igual forma, alimentos à base de soja são boas fontes de proteínas, vitaminas, minerais, fibras e são pobres em gorduras saturadas. Além disso, a soja e seus derivados são ricos em compostos bioativos e compostos fitoquímicos, tais como: proteínas e peptídeos biologicamente ativos, inibidores de proteases relacionados a supressão de câncer, isoflavonas, fitoesteróis, ácido fítico e saponinas (Colletti et al., 2020). Estes alimentos e seus compostos bioativos têm recebido atenção no âmbito científico, devido aos

benefícios propostos à saúde humana, sendo capazes de diminuir riscos doenças cardíacas e cânceres, incluindo endometrial, mama, próstata, cólon, pulmão e bexiga (Reddy; Bellaloui, 2018).

Geralmente, alimentos à base de soja são divididos em dois grupos: alimentos não fermentados e fermentados. O primeiro grupo contém os grãos frescos, nozes de soja, brotos de soja, farinha integral de soja, bebida vegetal (leite) de soja, entre outros. O segundo grupo inclui tempeh, produtos fermentados de bebida vegetal de soja, missô, molhos de soja, natto e, finalmente, tofu (Colletti et al., 2020). Este último alimento é rico em ácidos graxos essenciais, como os ácidos linoléico e linolênico. Além disso, devido ao seu potencial nutricional e bioativo, o tofu é também classificado como uma das melhores fontes de proteína à base de plantas (Ali; Tian; Wang, 2021).

1.2 Gordura poliinsaturadas

Os ácidos graxos são fonte de energia e de constituintes da membrana celular. Eles são considerados componentes essenciais para a produção de estruturas celulares, integrando fosfolipídios da membrana celular, exercendo papéis funcionais, metabólicos e de sinalização, compondo tecidos e órgãos, além de colaborar na síntese de substâncias biologicamente ativas (Djuricic; Calder, 2021; Sokoła-Wysoczańska et al., 2018). Em resumo, os ácidos graxos podem atuar na regulação da estrutura e função da membrana; regulação das vias de sinalização intracelular, atividade do fator de transcrição e expressão gênica; e regulação da produção de mediadores lipídicos bioativos (Calder, 2015).

Tais nutrientes podem ser agrupados em três diferentes categorias: A primeira categoria está relacionada ao comprimento da cadeia de carbono, sendo: ácidos

graxos de cadeia curta, aqueles compostos por 2 a 4 carbonos, como o ácido butírico; de cadeia média compostos por 6 a 12 carbonos; e cadeia longa, compostos por 14 carbono ou mais. A segunda está relacionada à localização da primeira ligação dupla, a partir da extremidade metil da molécula, como ômega-3, com a primeira ligação dupla no carbono 3, ou ômega-6, com a primeira ligação dupla no carbono 6. Por fim, pode ser classificado quanto ao número de ligações duplas, sendo: ácidos graxos saturados (sem ligações duplas), monoinsaturados (MUFAs) (1 ligação dupla) e poliinsaturados (PUFAs) (2 ou mais ligações duplas) (Zaloga, 2021). Segundo Sokół-Wysoczańska et al., (2018), os PUFAs detêm o papel mais importante e as funções mais significativas no metabolismo.

Os ácidos graxos influenciam no desenvolvimento de diversas doenças, incluindo doenças metabólicas, como diabetes tipo 2, doenças inflamatórias e câncer, além de exercer um papel na prevenção de Doenças Cardiovasculares (DCVs). Neste contexto, os PUFAs, por exemplo, podem agir como antioxidantes regulando a via de sinalização antioxidante e podem modular processos inflamatórios (Djuricic; Calder, 2021).

As doenças cardiovasculares (DCV), causadas por distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos, são a principal causa de morte no mundo. Sabe-se que a dieta pode influenciar positivamente ou negativamente nas DCV, de forma que os PUFAs podem diminuir a produção de espécies inflamatórias e reativas de oxigênio, favorecendo a prevenção de tais doenças (Zhu; Bo; Liu, 2019). Estudos científicos já demonstram que a ingestão dietética de ácidos graxos MUFAs e PUFAs se associou ao menor risco de mortalidade e morbidade por DCV, enquanto a ingestão dietética de gordura trans e gordura saturada se associou ao aumento do risco de DCV (Estruch et al., 2013; Djuricic & Calder, 2021). Além do papel protetor contra doenças metabólicas e cardiovasculares, os PUFAs também desempenham papel vital como nutriente no tratamento de esteatose hepática não alcoólica, reações autoimunes e outras doenças crônicas (Lee et al., 2016)

Dentre os PUFAs existe uma classe de ácidos graxos considerados essenciais, como os ácidos graxos ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6). Estes são derivados de ácidos graxos vitais, ou seja, ácidos α -linolênicos (ALA) e ácido linoleico (LA), respectivamente e não são sintetizados biologicamente, sendo necessária ingestão dietética dos mesmos, a fim de suprir as necessidades nutricionais (Sokół-

Wysoczańska et al., 2018). Tal necessidade pode ser suprida a partir do consumo de sementes de plantas como chia, girassol, de oleaginosas como castanhas e amendoim, além do consumo de peixes e óleo de peixes (Kapoor et al., 2021)

Uma das fontes de PUFA's é a soja, cujo óleo é o segundo de origem vegetal mais consumido no mundo. O óleo de soja convencional é rico em ácidos graxos, como ácido linoléico (~55% dos ácidos graxos totais) e ácido α -linolênico (~13% dos ácidos graxos totais) (Konda et al., 2020). Autores relatam que o teor e qualidade do óleo de soja têm recebido importância no âmbito da indústria e genética de alimentos, dado ao aumento da demanda por óleos vegetais e ao aumento da conscientização do consumidor sobre os problemas de saúde relacionados às gorduras alimentares (Clemente; Cahoon, 2009).

1.2 Compostos fenólicos

Atualmente, sabe-se que os alimentos são muito mais do que apenas fontes de energia, mas também desempenham muitas outras funções que contribuem para a saúde e o bem-estar, exercendo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e imunomoduladores, por exemplo (Chugh; Kamal-Eldin, 2020). Os compostos responsáveis por tais efeitos são denominados compostos bioativos. Estes compostos são assim chamados, pois apresentam capacidade de exercer atividades fisiológicas e/ou celulares, podendo alterar o estado de saúde do organismo que os consomem, seja humano ou animal. Nas plantas, estes compostos são geralmente produzidos como metabólitos secundários, que não são necessários para o funcionamento diário da planta (como crescimento), mas que exercem papel fundamental na proteção, competição, defesa, atração e sinalização (Walia; Kumar Gupta; Sharma, 2019).

Compostos bioativos estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos, como frutas e hortaliças. Incluem flavonóides, antocianinas, taninos, betalaínas, carotenóides, entre outros. Vários produtos naturais fornecem uma gama distinta de nutrientes e de compostos bioativos, incluindo fitoquímicos (compostos fenólicos, flavonoides e carotenóides) (Walia; Kumar Gupta; Sharma, 2019). Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais e compreendem um amplo grupo de moléculas, que podem ser classificados em cinco grandes categorias: ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzoicos); estilbenos; quinonas;

flavonóides (antocianinas e antocianidinas, flavonóis, flavonas e isoflavonas); e taninos e lignanas (Morya et al., 2022). Vale ressaltar ainda que compostos fenólicos, além de exercer atividade antioxidante, também possuem papel antitrombótico, antimicrobiano e antiaterogênico, de forma que, seus efeitos na saúde humana estão sendo associados a diminuição do risco de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer, síndrome metabólica, diabetes tipo II e obesidade (Konstantinidi; Koutelidakis, 2019; Morya et al., 2022).

Dentre os compostos bioativos mais estudados estão resveratrol, epigallocatequina, curcumina, quercetina, antocianinas, b-glucanos, isoflavonas, probióticos e outras biomoléculas, os quais foram estudados e apresentam influência direta ou indireta em vias moleculares específicas, associadas à fisiopatologia de doenças cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólica e câncer (Karasawa; Mohan, 2018). A quercetina, um composto fenólico da classe dos flavonoides, apresenta atividades profiláticas e terapêuticas contra o câncer de colon, por meio de mecanismos como a inibição do potencial proliferativo das células, a promoção da parada do ciclo celular, e a indução de apoptose celular, apresentando potencial não mutagênico e baixa toxicidade (Macharia et al., 2022). As isoflavonas, outro composto fenólico da classe dos flavonoides, apresentam efeitos positivos para a saúde contra inúmeras doenças, incluindo doenças dermatológicas, câncer, osteoporose, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Tais efeitos são atribuídos principalmente à sua capacidade antioxidante, que participa na prevenção de diferentes doenças ligadas ao estresse oxidativo (Aydar; Tutuncu; Ozcelik, 2020; Morya et al., 2022)

Neste contexto, Macharia et al., (2022) ressaltaram que a soja possui um caráter único entre as leguminosas, pois é uma fonte de agregação de isoflavonas e antocianinas. Retratam ainda que a genisteína é a forma mais comum e abundante de isoflavonas na soja, e que está associada às propriedades anticancerígenas da soja. Outro estudo realizado por Basson et al. (2021) reuniu em uma revisão os principais compostos bioativos já identificados na soja e seus efeitos na saúde, reportando ao todo 10 compostos, sendo eles: fosfatidil-colina, que está relacionada a promoção e manutenção da saúde intestinal e diminuição do stress oxidativo; saponinas e fitoesteróis, com ação antioxidante, antiinflamatória e imunomoduladora; lecitinas, com ação antibacteriana, antifúngica e antiviral; lunasina, que promove a

supressão da inflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS) e diminui a produção de citocinas inflamatórias; Inibidor Bowman-Birk (BBI), um inibidor de protease relacionado a ação anti-inflamatória no intestino, supressão do stress oxidativo, diminuição de citocinas inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias; além de outros compostos, como a genisteína, mencionada anteriormente.

1.3 Probióticos

Probióticos são microrganismos, que apresentam grande importância para a saúde e de grande interesse na ciência, isso porque são capazes de promover efeitos benéficos à saúde por diferentes mecanismos de ação, como prevenção da adesão ou colonização de patógenos, produção de metabólitos e modulação do sistema imunológico pela produção de imunoglobulinas (Chugh; Kamal-Eldin, 2020).

Dentre os probióticos mais utilizados na preparação de diferentes alimentos funcionais estão primeiramente os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, seguidos de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* e leveduras *Saccharomyces*. Estes microrganismos podem ser utilizados na preparação de diferentes alimentos com potencial bioativo, incluindo produtos lácteos (leite, leites acidificados, iogurtes, queijos, cremes e sorvetes), bem como produtos não lácteos (carnes e produtos alimentares, tofu, bebidas fermentadas de soja, snacks de pão e fibras de cereais), entre outros (Nagpal et al., 2012).

Quando adicionados ou fermentados naturalmente nos alimentos, estes microrganismos produzem compostos bioativos, tais como bacteriocinas, enzimas metabólicas, aminoácidos e peptídeos, ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas, antioxidantes, agentes anti-inflamatórios e imunomoduladores, que coletivamente, melhoram a função fisiológica do intestino e exercem impactos benéficos na melhoria da saúde humana. Vale ressaltar ainda que o número de células probióticas viáveis em um alimento probiótico necessário para efeito evidente é de 10^8 a 10^9 UFC/g (Chugh; Kamal-Eldin, 2020; Gopikrishna et al., 2021; Tegegne; Kebede, 2022).

HIPÓTESE:

- 1) A hipótese desse trabalho é que o desenvolvimento de um creme de soja, a partir do tofu, com adição de azeite de oliva e especiarias, pode ser uma opção mais nutritiva, com mais polifenóis e fonte ácidos graxos insaturados, em relação ao tofu tradicional. Além disso, pode ser um alimento pró-longevidade, com testes realizados em organismo *C. elegans*
- 2) A adição de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* pode beneficiar o alimento, aumentando o teor de polifenóis com seu potencial bioativo, auxiliar na redução do crescimento de microrganismos deteriorantes no produto.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Elaborar um produto alimentício funcional, feito de soja com gorduras insaturadas, bioativos provenientes de especiarias e probióticos. Analisar quimicamente a sua composição, comportamento dos microrganismos durante armazenamento e avaliar a toxicidade do mesmo em modelo animal *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos específicos

- Produzir amostras de tofu tradicional e amostras com adição de azeite de oliva e especiarias para elaboração do creme de soja.
- Produzir amostras com adição de *Lactobacillus rhamnosus*.
- Realizar a composição centesimal do produto e a quantificação de polifenóis.
- Realizar a identificação e quantificação do perfil de ácidos graxos das amostras.
- Quantificar o teor de polifenóis dessas amostras durante o armazenamento em geladeira.
- Avaliar o crescimento dos probióticos e outros microrganismos durante o armazenamento em geladeira.
- Realizar análise de toxicidade aguda, desenvolvimento e resistência ao estresse químico em modelo com microrganismos *Caenorhabditis elegans*.

REFERÊNCIAS

OTUN, J., SAHEBKAR, A., ÖSTLUNDH, L. et al. Systematic Review and Meta-analysis on the Effect of Soy on Thyroid Function. **Sci Rep** 9, 3964 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40647-x>

SUGIYAMA, Akifumi. The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes, and beyond—A review. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 67-73, 2019.

MOSALLANEZHAD, Zahra et al. Soy intake is associated with lowering blood pressure in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized double-blind placebo-controlled trials. *Complementary therapies in medicine*, v. 59, p. 102692, 2021.

JAYACHANDRAN, Muthukumaran; XU, Baojun. An insight into the health benefits of fermented soy products. **Food chemistry**, v. 271, p. 362-371, 2019.

WIJEWARDANA, Chathurika; REDDY, K. Raja; BELLALLOUI, Nacer. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. **Food Chemistry**, v. 278, p. 92-100, 2019.

FONSECA, A. F.; NEVES, E.; DIPPLE, F. L.; LIMA, T. C. Correlation between productivity and centesimal composition of soybean cultivars. **Scientific Electronic Archives**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 54–58, 2020. DOI: 10.36560/131220201242. Disponível em: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1242>. Acesso em: 30 dez. 2022.

COLLETTI, Alessandro et al. Valorisation of by-products from soybean (Glycine max (L.) Merr.) processing. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2129, 2020.

ALI, Fatma; TIAN, Kangming; WANG, Zheng-Xiang. Modern techniques efficacy on tofu processing: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 766-785, 2021

AINI, N. et al. The formulation of cheese analogue from sweet corn extract. **International Journal of Food Science**, v. 2019, 2019.

ALI, F.; TIAN, K.; WANG, Z.-X. Modern techniques efficacy on tofu processing: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 766–785, 2021.

AYDAR, E. F.; TUTUNCU, S.; OZCELIK, B. **Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects.** *Journal of Functional Foods* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2020.

BACHMANN, H.-P. **Cheese analogues: a review** *International Dairy Journal*. [s.l: s.n.].

BASSON, A. R. et al. **Regulation of intestinal inflammation by soybean and soy-derived compounds.** *Foods* MDPI AG, , 1 abr. 2021.

CALDER, P. C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, v. 39, p. 18S-32S, 2015.

CAO, Z. H. et al. **Bioactivity of soy-based fermented foods: A review.** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 1 jan. 2019.

CHAVAN, R. S.; JANA, A. **CHEESE SUBSTITUTES: AN ALTERNATIVE TO NATURAL CHEESE-A REVIEW** *Int. J. of Food Science*. [s.l: s.n.].

CHUGH, B.; KAMAL-ELDIN, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, v. 32, p. 76–82, 2020.

CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean oil: Genetic approaches for modification of functionality and total content. *Plant Physiology*, v. 151, n. 3, p. 1030–1040, 2009.

COLLETTI, A. et al. **Valorisation of by-products from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) processing.** *Molecules* MDPI AG, , 1 maio 2020.

DJURICIC, I.; CALDER, P. C. **Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021.** *Nutrients* MDPI AG, , 1 jul. 2021.

ESTRUCH, R. et al. **Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet.** *The new england journal of medicine* , 2013.

FONSECA, A. F. et al. Correlation between productivity and centesimal composition of soybean cultivars. *Scientific Electronic Archives*, v. 13, n. 12, p. 54, 30 nov. 2020.

GOPIKRISHNA, T. et al. **Impact of Bacillus in fermented soybean foods on human health. Annals of Microbiology**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.

JAYACHANDRAN, M.; XU, B. An insight into the health benefits of fermented soy products. **Food Chemistry**, v. 271, p. 362–371, 15 jan. 2019.

KAMATH, R.; BASAK, S.; GOKHALE, J. **Recent trends in the development of healthy and functional cheese analogues-a review. LWT**Academic Press, , 1 fev. 2022.

KAPOOR, B. et al. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits. **Current Nutrition Reports**, 2021.

KARASAWA, M. M. G.; MOHAN, C. **Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. Natural Products and Bioprospecting**Springer, , 1 out. 2018.

KIM, H. et al. Plant-Based Diets Are Associated With a Lower Risk of Incident Cardiovascular Disease, Cardiovascular Disease Mortality, and All-Cause Mortality in a General Population of Middle-Aged Adults. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 16, 20 ago. 2019.

KONDA, A. R. et al. Metabolic engineering of soybean seeds for enhanced vitamin E tocopherol content and effects on oil antioxidant properties in polyunsaturated fatty acid-rich germplasm. **Metabolic Engineering**, v. 57, p. 63–73, 1 jan. 2020.

KONSTANTINIDI, M.; KOUTELIDAKIS, A. E. Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. **Medicines**, v. 6, n. 3, p. 94, 9 set. 2019.

LEE, J. M. et al. **Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. Nutrients**MDPI AG, , 4 jan. 2016.

MACHARIA, J. M. et al. **Medicinal plants with anti-colorectal cancer bioactive compounds: Potential game-changers in colorectal cancer management. Biomedicine and Pharmacotherapy**Elsevier Masson s.r.l., , 1 set. 2022.

MARRONE, G. et al. **Vegan diet health benefits in metabolic syndrome. Nutrients**MDPI AG, , 1 mar. 2021.

MEDAWAR, E. et al. **The effects of plant-based diets on the body and the brain: a systematic review.** Translational PsychiatryNature Publishing Group, , 1 dez. 2019.

MORYA, S. et al. **Nutraceutical and Pharmaceutical Behavior of Bioactive Compounds of Miracle Oilseeds: An Overview.** FoodsMDPI, , 1 jul. 2022.

MOSALLANEZHAD, Z. et al. **Soy intake is associated with lowering blood pressure in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized double-blind placebo-controlled trials.** Complementary Therapies in MedicineChurchill Livingstone, , 1 jun. 2021.

OTUN, J. et al. Systematic Review and Meta-analysis on the Effect of Soy on Thyroid Function. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

REDDY, K. R.; BELLALOU, N. **Soybean Seed Physiology, Quality, and Chemical Composition under Soil Moisture Stress** Chathurika Wijewardana. [s.l: s.n.].

SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, E. et al. **Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders—a review.** NutrientsMDPI AG, , 21 out. 2018.

SUGIYAMA, A. **The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes, and beyond—A review.** Journal of Advanced ResearchElsevier B.V., , 1 set. 2019.

TEGEGNE, B. A.; KEBEDE, B. **Probiotics, their prophylactic and therapeutic applications in human health development: A review of the literature.** HeliyonElsevier Ltd, , 1 jun. 2022.

WALIA, A.; KUMAR GUPTA, A.; SHARMA, V. Role of Bioactive Compounds in Human Health. **ACTA SCIENTIFIC MEDICAL SCIENCES**, 2019.

ZALOGA, G. P. **Narrative review of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation upon immune functions, resolution molecules and lipid peroxidation.** NutrientsMDPI AG, , 1 fev. 2021.

ZHU, Y.; BO, Y.; LIU, Y. **Dietary total fat, fatty acids intake, and risk of cardiovascular disease: A dose-response meta-analysis of cohort studies.** Lipids in Health and DiseaseBioMed Central Ltd., , 6 abr. 2019.

CAPÍTULO 1:

Submitted to Journal of Oleo Science - Manuscript ID ESS-22-323

Chemical composition and profile of unsaturated fatty acid by GC-FID analyses of a cream cheese analogue made by soy, olive oil and spices

Renata Alves Mazuco¹, Denise Coutinho Endringer^{1,2}, Tadeu Uggere Andrade^{1,2}, Stanislaw Bogusz Junior³, Leandro Bertacchini de Oliveira³, Iêda Carneiro Kalil², Dominik Lenz^{1,2,*}.

¹ *Plant Biotechnology Graduate Program, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil.*

² *Pharmaceutical Sciences Graduate Program, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil.*

³ *Institute of Chemistry of São Carlos (IQSC), University of São Paulo (USP)*

*Corresponding author at: Department of Plant Biotechnology, Universidade Vila Velha. Avenida Comissário José Dantas de Melo, n 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, CEP 29102-920, Brasil.

E-mail address: dominik.lenz@gmail.com

Dominik Lenz – ORCID 0000-0001-6932-401X

Ieda Carneiro Kahlil – ORCID 0000-0001-5703-7697

Tadeu Uggere Andrade – ORCID 0000-0001-6387-7895

Denise Coutinho Endringer – ORCID 000-0001-9396-2097

Renata Alves Mazuco – ORCID 0000-0002-4259-7170
renataalvesmazuco@gmail.com

Leandro Bertacchini de Oliveira – ORCID 0000-0001-8414-0243
leandrobortacchini@usp.br

Stanislau Boguz Junior – ORCID 0000-0002-4382-5745 stanislau@iqsc.usp.br

Keywords: unsaturated fatty acid, GC-FID, soy, cheese analogue.

Running Title: Chemical composition and fatty acids in cream cheese analogue.

Abstract

Vegetable oils have potential abilities to reduce the risk of inflammatory processes and heart disease. Cream cheese is high in saturated fat content of animal origin, which are associated with risk of chronic diseases. This work aimed to develop a cream cheese analogue made of soy, olive oil and herbs and chemically analyze its profile of polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. The toxicity of the product was excluded using the *Caenorhabditis elegans* model. The results described the profile of the fatty acids and showed the potential of the product for a healthier nutrition.

1. Introduction

An increasing percentage of population is interested in healthier nutrition to maintain healthy habits. The American Heart Association recommends a diet with fruits, vegetables, nuts, grains and legumes aiming to reduce the risk of cardiovascular disease. In addition, a vegetarian diet has proven to prevent cardiovascular diseases like coronary disease, heart failure and high blood pressure¹⁾.

There is scientific evidence that a diet rich in saturated fat raises total cholesterol level and low-density lipoprotein cholesterol (LDL), both known as risk factors in terms of developing atherosclerosis, cardiovascular disease and other metabolic disorders^{2,3)}.

The quality of the fatty acids used to replace saturated fats, however, deserves attention. The literature gathers evidence about soybean and vegetable oils for their potential abilities to reduce the risk of inflammatory processes and heart disease, because the oils are rich in polyunsaturated fatty acids. Mainly the fatty acids α -linolenic (ω -3), Linoleic (ω -6) and oleic acid (ω -9) have proven important in reducing the total

cholesterol and high-density-lipoprotein cholesterol (HDL) ratio, preventing atherosclerosis, and inflammatory processes ⁴⁻⁶⁾.

Cream cheese, widely consumed in the West, is a cheese soft and excellent spreadability⁷⁾. These characteristics are related to its composition with high saturated fat content of animal origin, which is associated with risk of obesity and other chronic diseases ⁸⁻¹⁰⁾.

Soybean (*Glycine Max* L.) is a vegetable known to being a source of proteins, polyphenols, such as isoflavones, and its use in the diet is associated with health benefits. It has been used soy for beverage production^{11,12)}, fermented^{12,14)} and for a plethora of products summarized as analogue cheeses^{15,16)}.

The objective of the present work was to develop and chemically analyze a cream cheese analogue made of soy, olive oil and herbs. Main subjects of the experiments were excluding toxicity and the analysis of composition of the fat acids contained in the product. This new formulation was also compared with a traditional formulation of tofu.

2. Materials and methods

2.1 Material

The soybeans (*Glycine max* L.), rice vinager (Toscano Alimentos), salt, garlic in natura (*Allium sativum*) dried rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), dried oregano (*Origanum vulgare* L.), dried basil (*Ocimum basilicum* L.) and extra-virgin olive oil (Borges) were bought in sotcks at the local market in Vila Velha state of Espírito Santo. The reagents isooctane grade HPLC, 14% boron trifluoride methanolic solution, Folin Ciocalteu reagent, KCL, KH₂PO₄, Na₂PO₄, NaCl, butylated hydroxytoluene (BHT), gallic acid, sodium carbonate, sodium chloride and saturated fatty acid methyl esters standard (C4:0 - C24:0), were obtained from Sigma-Aldrich (USA). The standards saturated and unsaturated fatty acid methyl esters GLC-85 and the internal standard tricosanoic acid methyl ester (C23:0), were obtained from Nu-Chek Prep. Inc (USA).

2.2 Preparation of samples

The tofu was prepared according to the scientific literature^{16,17}. Briefly, soybeans were washed with fresh water, peel was removed and were ground in a blender with water (s:w = 1:3, w/v) , then it was filtered to obtain hydrosoluble soy extract (HSE). The HSE was boiled in water at 95 °C for 15 minutes and was coagulated by adding rice vinager 1,5 % at 75 °C. The precipitate was removed and pressed in cheesecloth molds for 12 h. After this period, the mass was divided in tofu (TF) that was homogenized in a food processor until it had a homogeneous and creamtexture, and cream cheese analogue (CCA) that was homogenized with 2 % of salt, 2% of garlic paste, 15% extra virgin olive oil and 0,6 % of a mixture of equal parts of dry herbs: basil, rosemary and oregano.

The samples (TF and CCA) were stored in natura and one part was lyophilized in the Lyophilizer Enterprise I Terroni equipment at -30 °C for 72 hours for phenolics and fatty acid analyses. The in natura and lyophilized products were stored in plastic

tubes under refrigeration -20 °C until the time of analysis.

2.3 Tofu and Cream Cheese Analogue Composition

To determine protein content and total nitrogen content of the samples was measured by the Kjeldahl method and a factor of 5.52 was used to convert nitrogen content to protein content, ash by incineration at 550 °C, moisture content was determined by drying in an oven at 105 °C until constant weight, total lipids were conducted according to the method of Goldfish¹⁸). The carbohydrate content was calculated by the difference. The calories (kcal/100g) were determined by the Atwater conversion values, considering that 1 g of proteins as well as carbohydrates corresponds to 4 kcal, whereas 1 g of carbohydrates corresponds to 4 kcal each, while 1 g of lipids corresponds 9 kcal¹⁹).

2.4 Quantification of total phenolics

The content of total phenolic compounds was determined by the method used by Bloor²⁰) and Krepsky²¹), with some modifications. The extraction was performed by weighing 1 g of each lyophilized sample in a centrifuge tube with protection from light, adding 10 ml of methanol (MeOH): water (60:40 v/v) and then centrifuging at 1139,80 RCF, for 10 minutes (NT 816 Novatecnica). The supernatant was transferred to another tube and the volume diluted to 15 ml. An aliquot of 100 µl of the sample was added to a 96-well plate, 100 µl of Folin Ciocalteu reagent at a concentration of 10% and then 100 µl of sodium carbonate (Na₂CO₃) at 7.5%. After 60 min, the reading was performed at 765 nm in a SpectraMax®190 spectrophotometer. The calibration curve was prepared using gallic acid as a standard, at concentrations from 2 a 10 µl/ml. From the equation of the straight line obtained from the standard curve ($y = 0,2287x + 0,2352$, $R^2 = 0,9814$) the total phenolic compounds content was calculated, and the results were expressed in mg EAG per gram of sample.

2.5 Lipids Extraction

Lyophilized samples of TF and CCA were first subjected to the lipid extraction process according to the method of Blight and Dyer (1959)²², modified by Christine (1989)²³. First, 6 g of each lyophilized sample were mixed in vortex with 30 mL of chloroform: methanol (1:2 v/v) with 0,001% BHT solution in a plastic tube, for 3 minutes, and then centrifuged in a centrifuge NT 816 Novatecnica, at 1488,71 RCF for 10 minutes. The supernatant was collected, another 10 mL of chloroform was added to the solid residue in the tube, vortexed for 5 minutes and centrifuged for 10 minutes. The supernatant was collected and pooled with the first.

Then, 10 mL of 0.88% KCL solution was added with stirring to the collected supernatants in a separator funnel and the phases were separated. The lower layer containing the lipids was collected and centrifuged again to remove residues and then evaporated in a rotary evaporator under vacuum at 40° C. The collected lipids were stored at -20°C until the analysis by GC-FID.

The fat concentration was calculated using the formula below:

Total lipids % (m/m) = $100 \times N/P$ (P = sample mass in grams; N = (ballon mass + lipids) – ballon mass).

2.6 Determination of fatty acid profile by GC-FID

2.6.1 Sample Preparation

The vegetable oil samples were properly weighed on an analytical balance (26 ± 7 mg) and derivatized with 14% BF₃ methanolic solution as described by Joseph and Ackman (1992)²⁴. In this step the triacylglycerols were converted into methyl esters of fatty acids (FAME). After derivatization, the analytes were extracted with the aid of 500 µL of isooctane and transferred to a new 1.5 mL amber vial fitted with a screw cap and septum PTFE/silicone. The extraction process was repeated twice to ensure that all material derivative was recovered. Prior to GC-FID analysis, the internal standard

methyl at a concentration of 0.597 mg mL⁻¹ has been added to the samples.

2.6.2 Chromatographic conditions

For the analysis, a Shimadzu gas chromatograph, model GC 2014, equipped with an AOC-20i auto-injector, and a flame ionization detector (FID) was used. The analytes were separated on a fused silica capillary column with a polar stationary phase of modified polyethylene glycol SUPELCOWAX™ (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), under the following chromatographic conditions: injection volume 1 µL, inlet at 250 °C operating in split mode 1:100 for 1.0 min; carrier gas helium at constant pressure of 84.3 kPa; oven temperature program: starting at 100 °C (5 min), followed by increment of 3 °C min up to the temperature of 260 °C (5 min); detector temperature: 260 °C.

2.6.3 Identification, quantification and semi-quantification of FAME

To identify the analytes, a standard solution of methyl esters of GLC-85 fatty acids (Nu-Chek Prep. Inc., USA) as well as the standard ester solution methyl saturated fatty acids, C4 – C24 (Sigma-Aldrich, USA), which were injected into the GC FID under the same chromatographic conditions as the samples. For the quantification of the analytes, internal standard method was used as described by Visentainer (2012)²⁵. The semi-quantitation (relative area %) of the methyl esters was obtained according to IOFI (2011)²⁶.

2.7 Evaluation of in vivo toxicity using the animal model *Caenorhabditis elegans*(*C. elegans*)

2.7.1 Strain preparation *Caenorhabditis elegans*

The nematodes *Caenorhabditis elegans* used in the study were wild type N2 kindly were obtained from Department of Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

The strains were maintained in nematode growth medium (NGM), seeded with *Escherichia coli* OP50, incubated at 20°C for maintenance²⁷. The experiment was carried out in the same larval stage according describes by Charão et al. (2015)²⁸ and

Augusti et al. (2017)²⁹).

2.7.2 Treatment

The L1 worms were exposed for 30 minutes (acute treatment) with TF and CCA with constant agitation in a homogenizer in liquid medium buffer M9 (0.02 M KH₂PO₄, 0.04 M Na₂HPO₄, 0.08 M NaCl). Worms treated with M9 buffer and M9 buffer plus 50 µl of 2.25% levamisole were used as negative controls (NC) and positive controls (CP), respectively. After exposure, the worms were washed 3 times with M9 buffer to remove treatments and then transferred to NGM plates inoculated with *E. coli* OP50 bacteria for toxicity, mortality and development analyzes²⁹).

2.7.3 *C. elegans* mortality assessment

The plates were kept in an incubator (B.O.D) (TECNAL, TE-371, São Paulo, BR) at 20°C for 24h. After this period, the surviving worms on each plate were counted to determine the effect of the samples on the mortality rate 28,29), using an optical microscope (Nikon, Eclipse e200, Japan). Worms were classified as dead if they did not exhibit pharyngeal movement or pumping.

2.7.4 *C. elegans* development assessment

After 48 hours of treatment, development was evaluated by measuring the body area (µ²) of the adult worms under a microscope (Nikon, Eclipse e200, Japan). The worms were photographed to have their body contour measured (10 measurements per plate), performed manually with the aid of the AxioVision software version 4.8.2 28,29).

3. Statistical Analysis

For the analysis of the results of the composition, total phenolic content and quantification of fatty acids between the TF and CCA samples, T Test was used considering $p < 0.05$ for statistical differences. For the acute toxicity test with *C.elegans*, the significance of the difference between the means of the groups was determined by Chi-Square test and for the analysis of the development of the worms, the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) to compare the means and Turkey's test was used to verify the significant differences ($p < 0.05$). Data were analyzed using Prisma 5.0 statistical program and Microsoft excel (2013).

4. Results and Discussion

The results of the analysis of the proximate composition and total phenolic content are shown in Table 1. The results were expressed as mean $\pm$ standard error. The phenolic content was higher in CCA. This result was expected, as olive oil, garlic and herbs are a source of phenolic compounds. In analysis performed (CHUNG et al., 2011), they study differences between cultivars of soy in Korea and found for TF, in analyses by HPLC, the mean of 1641 $\mu\text{g/g}$ for polyphenols, this value is higher than that found in our study, and this may be linked to differences between soybean cultivars³⁰).

Table 1. Results of proximate composition and total phenolics (TPC) compounds of TF and CCA

Samples	Moisture (%)	Ash (%)	Lipids (%)	Protein (%)	Carbohydrates (%)	Calories (kcal)	TPC ($\mu\text{g/g}$)
TC	81.94 ^a $\pm$ 0.07	0.509 ^a $\pm$ 0.088	0.23 ^a $\pm$ 0.03	10.94 ^a $\pm$ 1.25	6.35 ^a $\pm$ 1.30	71.35 ^a $\pm$ 0.10	19.15 $\pm$ 2.13 ^a
CCA	63.28 ^b $\pm$ 3.03	1.87 ^b $\pm$ 0.13	13.07 ^b $\pm$ 1.74	9.65 ^a $\pm$ 0.04	11.43 ^a $\pm$ 3.35	202.07 ^b $\pm$ 9.23	36.91 $\pm$ 2.69 ^b

TPC: total phenolics compounds (mEq of gallic acid per g of sample). Different letters in a same column indicate statistical differences by ANOVA and test T ($p < 0.05$).

Statistical differences were found to the moisture, ash, lipids, calories and total phenolics content. These differences were expected, due to the addition of the virgin olive oil, which has lipids and polyphenols in its composition, in addition to the mixture

of garlic with rosemary, basil and oregano, which certainly contributed to the amount of ash and total phenolics content 30-32). With the addition of a different fat source (i.e., virgin olive oil) to the CCA, the lipid, ash and calorie content increased, but they moisture content decreased. The total protein and carbohydrates content, remained similar between the two samples, since the soy base of TC and CCA is the same(LI et al., 2013, 2020a) .

Li Qinghi and collaborators (2013)¹⁷⁾, investigated four processes of soy cheese, using lactic bacteria and enzymatic GDL. Among the composition of the products obtained, the protein content ranged from 6.4 to 22.39 g/100 g, fat ranged from 18,51 to 28,74 g/100 g, ash ranged from 0.26 g to 1.93 g/100 g and a ranged from 48,59 to 54.48 g/100 g for moisture¹⁷⁾. These results showed that the manufacturing process caused differences in the final composition of the product, in addition to differences in texture and sensory properties, according to the authors. In our study, significant differences were also found between the samples, supporting the idea that the development process, as well as the use of addition of ingredients, directly affect the final composition of the products. Oyeyinka³³⁾ and collaborators, worked with 100% and 60% soy cheese analogue, with the addition of 40% cashew nut milk composition, differences between in the composition of the sample were found, as was expected. The protein and ash in our study was lower than that obtained in the study by Oyeyinka³³⁾, who obtained gray values between 18.73% and 20.81% for ash and values between 43.68% and 63.99% for protein content.

These differences in the composition of the final product between the studies are expected, due to variations in the way of processing and difference in vegetable raw material origin location.

The acute toxicity test was performed on samples of TF and CCA on the experimental model in vivo *C. elegans*. The effect of each product was demonstrated through tests that evaluated the survival rate and development of the worms.

A chi-squared distribution test yielded significant differences ($p < 0,05$) between all groups as compared to the positive control, whereas no significant differences were detected between the other groups. As there were no differences between negative control and TF and CCA, it may be concluded, there is no toxic effect of the samples.

In the trial which evaluated the influence of the products on the development of worms, the CCA induced the development with difference ($p < 0.05$) when compared to the TF, and this last not showed substantial difference when compared with negative control. All groups were statically different to positive control (levamisole).

Recent scientific literature revealed that phenolic compounds present in plant sources have several properties, that can be beneficial to health, such as antioxidant, anti-mutagenic activity, protection against cardiovascular diseases and atherosclerosis. Soybean, olive oil, garlic, considered as a source of these phytochemicals, among other important constituents for health^{16,30,32,34}). The superior development of worms in the CCA group suggests benefits from the association of the bioactive constituents of soy with the constituents of olive oil and garlic mixture.

The *C. elegans* model has been widely used and with numerous benefits in research, as it has a short life cycle, easy handling and low storage cost, in addition, the action of phytochemicals in reducing free radicals has been widely discussed (VIEW, 1998). Studies carried out with the *C. elegans* model have already been carried out, using polyphenols from Blueberry, Cocoa and isolated polyphenols such as

catechin and quercetin, noting the role of polyphenols in increasing the resistance of worms to oxidative, thermal and longevity stress 35-38).

Di Rosa³⁹, evaluated the action of olive polyphenols on longevity and neuroprotective action against Parkinson's disease in model *C. elegans*. In this study, a natural formulation of olive polyphenols, containing hydroxytyrosol and isolated hydroxytyrosol, was evaluated, concluding that the "in natura" version had a superior action because it has in its composition other compounds such as oleuropein aglycone, tyrosol and gallic acid, in agreement with other studies^{40,41}.

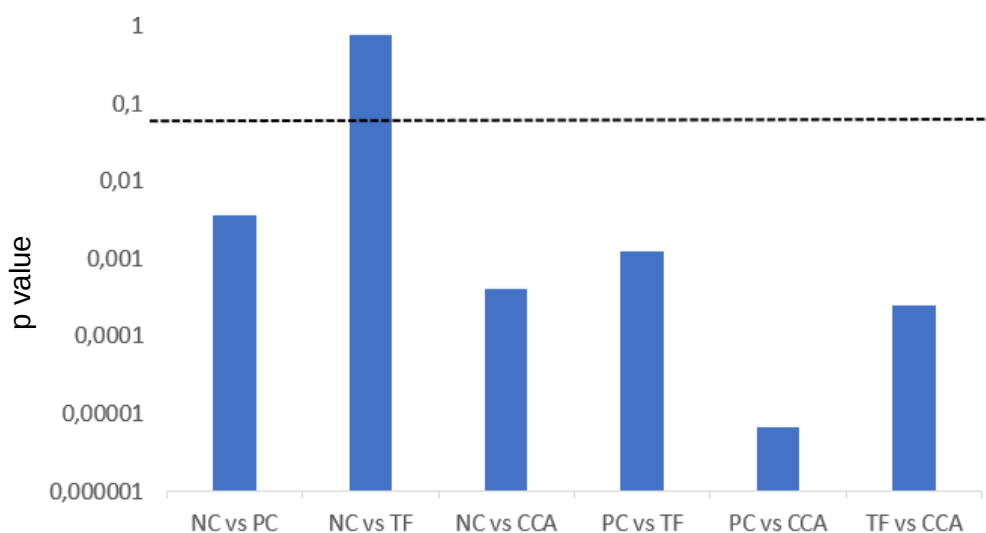


Figure 1. Development assay results for TF and CCA using the *C. elegans* animal model. NC: negative control. PC: positive control. Data expressed by p-value per parameter. The line represents $p = 0.05$. The x-axis depicts the compared groups, the y-axis depicts the respective p-values.

The results for the fatty acids composition of the samples are in Table 2.

Table 2. FAME results (%) for TF and CCA samples.

FAME	TF (%)	CCA (%)
Palmitic acid (C16:0)	10.28 ± 0.07	11.82 ± 0.1*
Stearic acid (C18:0)	2.98 ± 0.01	2.28 ± 0.05*
Oleic acid (C18:1- ω9)	23.70 ± 0.32	51.2 ± 0.9*
Linoleic acid (C18:2- ω 6)	51.35 ± 0.39	26.29 ± 0.96*
α-Linolenic acid (C18:3- ω 3)	5.55 ± 0.01	2.86 ± 0.04*
Σ SFA	13.25 ± 0.07	14.125 ± 0.19*
Σ MUFA	23.69 ± 0.31	51.17 ± 0.90*
Σ PUFA	56.90 ± 0.38	29.19 ± 1.04*
ω -6/ ω 3 ratio	9.25 ± 0.08	9.04 ± 0.09*
PUFA/SFA ratio	4.29 ± 0.04	2.07 ± 0.05*

SFA: saturated fatty acid; MUFA: monounsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid. Note: Values are rounded up to two decimal places. * represent statistical differences (p<0.05).

The major fatty acid in the TF sample were linoleic (51.35%), oleic (23.7%), palmitic (10.2), α-linoleic (5.55%) and stearic acid (2.98%) and they are different with p<0,05 from que values found in the CCA. Was observed some reduction for palmitic, stearic, linoleic and α-linolenic fatty acids, it could be justified because of the addition of olive oil, garlic, salt and herbs, that caused the dilution of fatty acids in the composition of the product. In contrast was observed an increase of 27.5% for ω -9 monounsaturated fatty acid, oleic acid in CCA, and this is due to the addition of olive oil, which has an abundance this fatty acid in its composition⁴). Evidence that oleic acid can contribute to improve the immune system health have been reported in literature,

among other benefits, being a relevant point for the consumption of CCA⁴²).

Similar results were found in the analyses of 100% soymilk cheese analogue, in a study conducted by Oyeyinka (2019)³³, which they found linoleic acid (54%), oleic acid (20%), palmitic acid (10.7%), α -linolenic acid (7.5%), and stearic acid (3.8%), corroborating with our TF analysis.

There are several scientific evidences indicated that dietary rich in saturated fat raise total cholesterol level and low-density lipoprotein cholesterol, and this is a risk factor to the development of atherosclerosis and cardiovascular disease^{2,3}).

The consumption of unsaturated and polyunsaturated fatty acids is associated with decreased circulating concentrations of total and LDL cholesterol, reducing the risk of cardiovascular disease. The LA ω -6 and ALA ω -3 present in both TF and CCA, are essential fatty acids, because the human body cannot synthesize, they must be obtained through the diet. They can be converted into long chained polyunsaturated fatty acids by enzymes Δ 5 and Δ 6 desaturases, like docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, ω -3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3)⁴³). The presence of MUFAS and SFAS in the diet intake are associated a potential protective effect cardiovascular disease, hypolipidemic and anti-inflammatory activity and the interest in plant-based food has been increasing because of its healthy benefits^{1,44}). Thus, studies suggest that the consumption of a dietary with emphasis on the composition of lipids from vegetable sources, like soy and olive oil, could be an interesting option in the maintenance of cardiovascular healthy and health in general, because of polyunsaturated fats composition and other components, like protein content and polyphenols^{24,37-39}). In the literature among the years there are described studies about the interest in soy-based products, because its composition and versatility^{11,13,44,45}).

The CCa presented a similar composition to the TF, in the proteins and carbohydrates parameters, and expected differences in terms of moisture, lipids and calories. The CCA present Cream cheese analogue presented a low risk of toxicity due to the combination of ingredients, according to the acute toxicity test performed in the experimental model in vivo with *C. elegans* worms and demonstrated the presence of polyunsaturated fatty acids, according to the results of the FAME profile. In this way, it can be considered a promising food for the beneficiary population in general, especially people with cardiovascular disease. More scientific research may described details about the compounds, public acceptability, safety and commercial viability of the cream cheese analogue.

Acknowledgements

The Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPES) for funding research and equipment to Universidade Vila Velha for laboratories and grants (processo: 83587683-22-2018).

Declarations

The authors declare that there is no conflict of interests

6. References

- 1 Kahleova H., Levin S., Barnard N. D. Vegetarian Dietary Patterns and Cardiovascular Diseases. *Progress in Cardiovascular Diseases*. v.61, n.54 (2018). doi: 10.1016/j.pcad.2018.05.002.
- 2 Torres, N.; Guevara-Cruz, M.; Velázquez-Villegas L.A.; Tovar, A.R. Nutrition and Atherosclerosis., *Archives of Medical Research*. v. 46, n.408 (2015). doi: 10.1016/j.arcmed.2015.05.010
- 3 Soliman, G. A. Dietary Fiber, Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*. v.11, n.5 (2019). doi: <https://doi.org/10.3390/nu11051155>.
- 4 Cai, W.; Calder, P.C; Cury-Boaventura, M.F.; de Waele, E.; Jakubowski, J.; Zaloga, G. Biological and Clinical Aspects of an Olive Oil Based Lipid Emulsion – a Review. *Nutrients*. v.10, n.6. (2018). doi: 10.3390/nu10060776
- 5 Hamley, S. The effect of replacing saturated fat with mostly n-6 polyunsaturated fat on coronary heart disease: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrition Journal*. v.16, n.1 (2017). doi: <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0254-5>
- 6 Maki, K.C.; Eren, F.; Cassens, M.E.; Dicklin, M.R.; Davidson, M.H. ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiometabolic Health: Current Evidence, Controversies, and Research Gaps. *Adv. Nutr.*v.9, n.6 (2018). doi: 10.1093/advances/nmy038
- 7 Mehanna, N.; Mahmoud A.E.A.; Elshenawy, A.; et al. Effect of fat replacement with modified starch on composition and quality of cream cheese. *Romanian Biotechnological Letters*. v.26 (2021). doi: <https://doi.org/10.25083/rbl/26.4/2793-2799>
- 8 Chen, S.; Bobe, G.; Zimmerman, S.; Hammond, E.G.; Luhman C.M. Boylston, T.D. et al. Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. v.52, n.11 (2004). doi: 10.1021/jf035193z
- 9 Ningtyas, D.W.; Bhandari, B.; Bansal N.; Prakash, S. Sequential aspects of cream cheese texture perception using temporal dominance of sensations (TDS) tool and its relation with flow and lubrication behaviour. *Food Research International*. v.120 (2019). doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.009>

- 10 Vigneux M.P.B., W. Villeneuve, Y. Pouliot, M. Britten, *International Dairy Journal*, 126 (2022).
- 11 Manzoni, M. S. J., Cavallini, D. C. U., Pauly-Silveira, N. D., Roselino, M. N., & Rossi, E. A. Development of a synbiotic low-calorie beverage made from soy and yacon extracts. *Food and Nutrition Sciences*, v.3, n.11 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.311195>
- 12 Battistini, C.; Gullón, B.; Ichimura, E.S.; Gomes, A.M.P et al. Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.49, n.2 (2018). doi: 10.1016/j.bjm.2017.08.006
- 13 D. M. Liu, L. Li, X. Q. Yang, S. Z. Liang, J. S. Wang, *Food Technology and Biotechnology* **2006**, 44, 417.
- 14 Zielinska, D.; Kamiska, A.; Kolożyn-Krajewska, D. Development of tofu production method with probiotic bacteria addition. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. v.4, n.6 (2015). doi: 10.15414/jmbfs.2015.4.6.485-490
- 15 Masotti, F.; Cattaneo, S.; Stuknyte, M.; De Noni, I. Status and developments in analogue cheese formulations and functionalities. *Trends in Food Science and Technology*.v.74 (2018). doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.016
- 16 Y. Li, X. Zhang, J. J. Yang, X. Y. Ma, X. D. Jia, P. Du, A. li Li. Influence of the addition of *Geotrichum candidum* on the microbial, Chemical, textural, and sensory features of soft soy cheese. *Journal of Food Processing and Preservation* **2020**, 44, 1.
- 17 Q. Li, Y. Xia, L. Zhou, J. Xie. Evaluation of the rheological, textural, microstructural and sensory properties of soy cheese spreads. *Food and Bioproducts Processing* **2013**, 91, 429.
- 18 AOAC. (2002). Official Methods of Analysis, 19^a edição.
- 19 Merril, A.L; Watt, B.K. *Agriculture handbook*. p.74 (1973).
- 20 S. J. Bloor, L. Packer, K. R. Markham, S. Overview of Methods for Analysis and Identification of Flavonoids. *In Methodos Enzymology* (pp. 3-14): Elsevier.

- 21 Krepsky, P.B.; Isidório, R.G.; de Souza filho, J.D. et al. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenesis* preparations. *Phytomedicine*. v.19, n.11, (2012). doi: 10.1016/j.phymed.2012.05.011
- 22 Bligh, E.G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. v.37, 911–917 (1957). doi:10.1139/o59-099
23. Christine, W. W. *Gas chromatography and lipids a practical guide*. The Oily Press (1989).
- 24 Joseph, J. D.; Ackman, R. G. Capillary Column Gas Chromatographic Method for Analysis of Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Ethyl Esters: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. v. 75, n. 3, p. 488–506 (1992). doi: 10.1093/jaoac/75.3.488
- 25 Visentainer, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*. v.35, n.2 (2012). doi: 10.1590/S0100-40422012000200008
- 26 OIFI. Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). *Flavour and fragrance journal*. v.26, 2011. doi:10.1002/ffj.2061
- 27 Brenner, S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v.77, p.71-94, 1974. doi: 10.1093/genetics/77.1.71
- 28 Charão M.F., Souto C., Brucker N., Barth A., Jornada D.S., Fagundez D. et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *International Journal of Nanomedicine*. v.10 (2015). doi: 10.2147/IJN.S84909
- 29 Augusti P.R., Brasil A.V.S., Souto C., Göethel G., de Oliveira Rios A. et al. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold Flowers. *Food and Chemical Toxicology*. v.109 (2017). doi: 10.1016/j.fct.2017.08.045

- 30 Guasch-Ferré M., Hu F.B, Martínez-González M.A., Fitó M., Bulló M. et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine*. v.13, n.12 (2014). doi: 10.1186/1741-7015-12-78
- 31 Davis, B.C.; Kris-Etherton P.M. Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: current knowledge and practical implications. *American Journal of Clinical Nutrition*. v.78 (2003). doi: 10.1093/ajcn/78.3.640S.
- 32 Rakhi N.K., Tuwani R., Mukherjee J., Bagler G. Data-driven analysis of biomedical literature suggests broad-spectrum benefits of culinary herbs and spices. *PLoS ONE*. v.13, n.1 (2018). doi: 10.1371/journal.pone.0198030
- 33 Oyeyinka A.T., Odukoya J.O., Adebayo Y.S. Nutritional composition and consumer acceptability of cheese analog from soy and cashew nut milk. *Journal of Food Processing and Preservation*. v.43, n.1 (2019). doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14285>
- 34 I. M. Chung, S. H. Seo, J. K. Ahn, S. H. Kim, *Food Chemistry* **2011**, 127, 960.
- 35 Wilson M.A., Shukitt-Hale B., Kalt W., Ingram D.K., Joseph J.A., Wolkow C.A. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. v.5, n.1 (2006). doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00192.x
- 36 Kampkötter A., Nkwonkam C.G., Zurawski R.F., Timpel C., Chovolou Y., Wätjen W., Kahl R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*. v. n.234 (2007). doi: 10.1016/j.tox.2007.02.006
- 37 Surco-Laos F., Dueñas M., González-Manzano S., Cabello J., Santos-Buelga C., González-Paramás A.M. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Research International*. v.46, n.2 (2012). doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.014.
- 38 Martorell P., Bataller E., Llopis S., Gonzalez N., Álvarez B. et al A Cocoa Peptide Protects *Caenorhabditis elegans* from Oxidative Stress and β -Amyloid Peptide Toxicity. *PLoS ONE*. v.13 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0063283

- 39 G. di Rosa, G. Brunetti, M. Scuto, A. T. Salinaro, E. J. Calabrese, R. Crea, C. Schmitz-Linneweber, V. Calabrese, N. Saul, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 1.
- 40 Soni M.G, Burdock G.A., Christian M.S., Bitler C.M, Crea R. Healthspan Enhancement by Olive Polyphenols in *C. elegans* Wild Type and Parkinson's Models. *International Journal of Molecular Sciences*.v.21, n.11 (2020). doi: 10.3390/ijms21113893
- 41 Angeloni C., Malaguti M., Barbalace M.C., Hrelia S. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *Int.J. Mol. Sci.* v.18, n.11 (2017). doi: 10.3390/ijms18112230
- 42 Carrillo, C.; Cavia, M. M. Y Alonso-Torre, S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action: a review. *Nutr. Hosp.* v.27, n.4 (2012). doi: 10.3305/nh.2012.27.4.5783.
- 43 Orsavova J., Misurcova L., Vavra Ambrozova J., Vicha R., Mlcek J. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*. v.16, n.6 (2015). doi: 10.3390/ijms160612871
- 44 Short E.C., Kinchla A.J., Nolden A.A. Plant-Based Cheeses: A Systematic Review of Sensory Evaluation Studies and Strategies to Increase Consumer Acceptance. *Foods*. v.10, n.4 (2021). doi: 10.3390/foods10040725
- 45 R. Farahmandfar, M. M. Tehrani, S. M. A. Razavi, M. B. H. Najafi, *International Journal of Food Properties* **2011**, *14*, 697.

CAPÍTULO 2

Elaboração, análise química e de toxicidade de creme de soja com especiarias, azeite de oliva e probióticos.

RESUMO

Uma dieta composta por alimentos de origem vegetal, promove benefícios a saúde, como a redução do risco de doenças cardiovasculares e outros fatores de risco, como redução da inflamação e dos níveis de lipídios no sangue. A soja é um alimento que possui proteínas e polifenóis em sua composição, que beneficiam organismo. Os probióticos são microrganismos que promovem benefícios a saúde, como o equilíbrio da flora intestinal. O azeite de oliva é uma fonte de gorduras insaturadas e polifenóis, como o hidroxitirosol, sua utilização na dieta está associada a benefícios a saúde. Objetivo dessa pesquisa foi elaborar, um creme de soja a partir do tofu, que é feito a partir da soja, com a adição de especiarias, cepas de *Lactobacillus rhamnosus* e azeite de oliva. Para verificar as características do produto, realizou-se a caracterização de sua composição, variação do pH, quantificação de polifenóis pelo método de Follin-Ciocalteu, análise da sobrevivência dos probióticos sob armazenamento em geladeira por 15 dias. Também foi realizada a análise da resistência frente ao estresse químico de microrganismos *Caenorhabditis elegans*, quando expostos ao produto. Com a elaboração do creme de soja, foi possível observar que, com a fermentação das bactérias, houve variação do pH, o teor de polifenóis aumentou ao longo dos dias e que possivelmente elas auxiliaram na redução do crescimento de outros microrganismos deteriorantes do alimento.

ABSTRACT

A diet composed of plant-based foods promotes health benefits such as reduced risk of cardiovascular disease and other risk factors such as reduced inflammation and blood lipid levels. Soy is a food that has proteins and polyphenols in its composition, which benefit the body. Probiotics are microorganisms that promote health benefits, such as the balance of intestinal flora. Olive oil is a source of unsaturated fats and polyphenols, such as hydroxytyrosol, and its use in the diet is associated with health benefits. The objective of this research was to elaborate a soy cream from tofu, which is made from soy, with the addition of spices, strains of *Lactocaseibacillus rhamnosus* and olive oil. To verify the characteristics of the product, the characterization of its composition, pH variation, quantification of polyphenols by the Follin-Ciocalteu method, analysis of the survival of probiotics under storage in a refrigerator for 15 days were carried out. An analysis of the resistance to chemical stress of microorganisms *Caenorhabditis elegans*, when exposed to the product, was also carried out. With the preparation of soy cream, it was possible to observe that, with the fermentation of the bacteria, there was a variation in the pH, the polyphenol content increased over the days and that possibly they helped to reduce the growth of other microorganisms that deteriorate the food.

1. INTRODUÇÃO

Alimentos de origem vegetal promovem benefícios à saúde por possuírem menor quantidade de gorduras saturadas, possuir fibras e compostos bioativos, como polifenóis, flavonoides e carotenoides, que atuam reduzindo o estresse oxidativo no organismo, prevenindo doenças e reduzindo a inflamação (Kahleova; Levin; Barnard, 2018). Devido a essas características, uma dieta baseada, em sua maior parte, em alimentos vegetais, reduz os riscos de doenças como, obesidade, hipertensão, aterosclerose, síndrome metabólica e fatores de riscos para outras doenças cardiovasculares, como redução dos níveis de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (Davis; Kris-Etherton, 2003; Kahleova; Levin; Barnard, 2018; Short; Kinchla; Nolden, 2021).

A soja (*Glycine Max* L.) é uma leguminosa, conhecida por ser fonte de proteínas, polifenóis como as isoflavonas, e seu uso na alimentação está associado a benefícios à saúde (Chung et al., 2011). A soja tem sido utilizada para a produção de bebidas e alimentos, sendo o tofu feito a partir da coagulação do extrato hidrossolúvel de soja, o mais conhecido (Battistini et al., 2018; Zhang; Qin, 2018). Outras versões de tofu tem sido relatadas na literatura, com a adição de outros ingredientes, para melhorar características sensoriais e funcionais, como a adição de probióticos, especiarias e oleaginosas (Ashenafi Mogessie, 1994; Li et al., 2020b; Oyeyinka; Odukoya; Adebayo, 2019; Zielinska; Kaminska; Kolozyn-Krajewska, 2015).

Os probióticos, como cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobactérias*, são microrganismos que quando utilizados na dieta, promovem benefícios à saúde, influenciando positivamente no equilíbrio da microbiota intestinal, auxiliando na digestão de carboidratos quando não digeridos corretamente pelo organismo, além de combater microrganismos patogênicos (Ng et al., 2008; Nagpal et al., 2012; Sharma; Sharma; Kaminska; Kolozyn-Krajewska, 2015; Amin, 2018; Zielinska).

O azeite de oliva é uma fonte de gorduras insaturadas e polifenóis, como o hidroxitirosol, sua utilização na dieta está associada a benefícios à saúde, como redução de riscos de doenças cardiovasculares (Guasch-Ferré et al., 2014; Orsavova et al., 2015). As especiarias, como orégano, alecrim, alho, tomilho, manjerição são utilizadas na culinária pelos seus benefícios devido a presença de

substâncias bioativas em sua composição e o potencial em melhorar características organolépticas nos alimentos (Vallverdú-Queralt et al., 2014; Bower; Marquez; De Mejia, 2016; Cosa et al., 2019; Jiang, 2019).

O presente estudo teve por objetivo elaborar, um produto alimentício, a partir de uma do tofu, com a adição de especiarias, cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, e azeite de oliva. Realizar a caracterização de sua composição, quantificação de polifenóis e analisar sobrevivência dos microrganismos durante 15 dias, sob armazenamento à 9°C. Além disso, foi realizado um ensaio em modelo animal *Caenorhabditis elegans*, para avaliar se o produto poderia auxiliar na resistência dos vermes frente ao estresse químico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

A soja (*Glycine max* L.), vinagre de arroz (Toscano Alimentos), sal, alho natural (*Allium sativum*), mix de especiarias “ervas finas” (Nativo) contendo: alecrim (*Salvia rosmarinus*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), manjerona (*Origanum majorana*), salsa desidratada (*Petroselinum crispum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e orégano (*Origanum vulgare*), azeite de oliva extravirgem (Borges) foram adquiridos em lotas no mercado local de Vila Velha, no Espírito Santo. O metanol utilizado foi da marca Neon, os reagentes Folin Ciocalteu, ácido gálico, quercetina e carbonato de sódio foram obtidos da marca Sigma-Aldrich. Os probióticos *Lactobacillus rhamnosus* (LRa05) (origem China), importados e distribuídos pela Active Pharmaceutica, foram adquiridos em farmácia de manipulação local. O agar MRS Man Rogosa Sharpe, agar plate Count (PCA), agar sabouraud dextrose cloranfenicol e a peptona bacteriológica, foram adquiridos da marca Kasvi. O Caldo EC e o caldo bile verde brilhante 2%, da marca HIMEDIA. O gerador de anaerobiose foi adquirido da marca Probac.

2.1 Preparação das amostras sem probióticos.

O tofu foi preparado de acordo com LI et al. (2013) e Q. LI (2020) com modificações. Os grãos de soja foram lavados com água destilada, e colocadas de molho por 16 horas. As cascas foram retiradas, e em seguida, os grãos foram triturados com água (1:3, p/v), em liquidificador (Mondial, Brasil). O volume obtido foi filtrado para obtenção do extrato hidrossolúvel de soja (EHS). O EHS foi fervido à 95 °C por 15 minutos e coagulado pela adição de vinagre de arroz 1,5% a 75°C (Djaafar, F. T. et al. 2010). O precipitado foi retirado, prensado em formas por 12h, com um peso de 500g. Após esse período, a massa recolhida foi dividida para o processamento das diferentes amostras. A amostra tofu (T) foi homogeneizada em mixer (Britânia, Brasil) com 2% de sal e a amostra creme (C) foi homogeneizada com 2% de sal, 2% de alho, 15% de azeite virgem extra e 0,6% de ervas finas. As amostras foram alíquotadas, sendo divididas para armazenamento à 9°C em tubos plásticos com tampa, para as análises de umidade, quantificação de polifenóis, flavonóides e análises microbiológicas. Algumas alíquotas foram armazenadas à -20°C para quantificação de cinzas, proteínas e lipídios.

2.3 Preparação das amostras com adição de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Lra05)

A preparação da cultura de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Lra05) e inoculação nas amostras, foi realizada de acordo com (Sharma; Sharma; Amin, 2018; Sharma; Trivedi; Gat, 2017). A inoculação foi preparada com 1 g de *L. rhamnosus* liofilizado em 250 mL de caldo MRS, em condição de anaerobiose à 37°C, por 48h, para obtenção de uma contagem de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL. Após isso, todo conteúdo foi centrifugado (10.000 rpm por 10 minutos à 4°C), lavado duas vezes com solução salina 0,85% autoclavada e ressuspendido ao seu volume original. Duas concentrações dessa solução foram utilizadas, (1% e 5%) e adicionadas ao tofu e ao creme de soja, originando as amostras tofu 1% (T1), tofu 5% (T5), creme 1% (C1) e creme 5% (C5). Parte das amostras foi colocada sob armazenamento à 9°C para análises durante 15 dias e outra parte, armazenada à -20°C até o momento das análises da composição centesimal.

2.4 Composição Centesimal

A determinação do teor de umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa a 105 °C até a obtenção de peso constante; cinzas por incineração em mufla a 550 °C; o teor proteico pelo método de Kjeldahl, seguido da conversão do resultado em proteína bruta, utilizando o fator 5,52, referente a soja; lipídeos totais pelo método de extração de Goldfish; e o teor de carboidratos por diferença (Aoac, 2012). Calorias (kcal.100 g⁻¹) foram determinadas aplicando os valores de conversão de Atwater que considera que 1 g de proteínas correspondem a 4 kcal, assim como carboidratos, enquanto 1 g de lipídeos correspondem a 9 kcal (Merrill, A.L. And Whatt, 1973).

2.5 Preparação dos extratos para quantificação de polifenóis totais e flavonóides

Um grama de cada amostra foi pesado e alocado em tubo plástico coberto por papel alumínio. Foram então adicionados 10 ml de metanol 60%, agitando em agitador vórtex por 2 minutos, até completa solubilização. Em seguida, os tubos foram levados à centrifuga a 6000 rpm por 15 min à 4°C, e o sobrenadante foi filtrado, completando o volume até 10 ml com água deionizada (Krepsky et al., 2012). Os extratos foram obtidos das amostras nos tempos 5 e 15 dias de geladeira. Os procedimentos foram realizados ao abrigo da luz e em seguida, acondicionados sob refrigeração.

2.6 Quantificação de polifenóis totais e flavonóides.

A determinação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com (Esquivel-Alvarado et al., 2020). Foram pipetados 25 µl de cada extrato em microplaca e 10 µl de Folin Ciocalteu 10%. Em seguida, adicionou-se 215 µl de Carbonato de Sódio 7,5%. Após 3 minutos, a absorbância foi lida a 765 nm, em triplicata, em espectrofotômetro SpectraMax® 190 (Avantor, Estados Unidos). A análise do branco foi realizada com água deionizada no lugar do extrato. Uma curva analítica de ácido gálico (6,25 – 70 µl/mL) foi elaborada, gerando a equação de regressão ($y = 0,00411x + 0,0609$; $R^2 = 0,9976$) para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

A determinação de flavonoides foi realizada de acordo com (Xu; Chang, 2007). Em uma microplacada com 96 poços, foram adicionados em cada poço 180 µl de cada extrato e 15 µl de NaNO₂ 2,5%. Após 6 minutos, foram adicionados 15 µl de AlCl₃ 10% e, depois de 5 minutos, foram adicionados 50 µl de NaOH 1M. Aguardou-se 10 minutos, para a formação do complexo flavonoide-alumínio, à temperatura ambiente. A curva padrão foi elaborada com quercetina (0 – 150 µl/mL), gerando a equação ($y = 0,0039x + 0,0902$; $R^2 = 0,9902$) para expressar os resultados em mg equivalentes de quercetina por g de amostra.

2.7 Análises microbiológicas

A contagem de probióticos foi realizada das amostras inoculadas T1, T5, C1 e C5, imediatamente após a inoculação, e durante o armazenamento sob refrigeração à 9°C nos dias 5 e 15. A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais, termotolerantes e fungos totais foi realizada nas amostras C e T para verificação de possíveis contaminações no produto base e nas amostras C1 e C5, para verificar como seria o crescimento desses microrganismos na presença dos probióticos, simulando um tempo de permanência na geladeira dos possíveis consumidores.

As análises foram realizadas em triplicatas utilizando 1g de cada amostra homogeneizado em vórtex com 9 mL de solução peptona 0,1%, em seguida, 6 diluições decimais em água peptonada foram preparadas.

As contagens de probióticos *L. rhamnosus* e microrganismos mesófilos, foram realizadas por método de plaqueamento em superfície, utilizando agar MRS e agar PCA, respectivamente, de acordo com Zielinska; Kaminska; Kolozyń-Krajewska

(2015), com modificações. Para quantificação das bactérias probióticas e mesófilas, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h, sendo que no caso das probióticas as placas foram alocadas em jaras com gerador de anaerobiose (Anaerobac). A contagem foi expressa em UFC/g.

A análise de coliformes totais e termo tolerantes foi realizada de acordo Silva et al. (2017) pela semeadura de três séries de tubos, contendo 9 mL de caldo Lactosado e tubo de Durhan invertido, com 1 mL de diferentes diluições da amostra. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 h para verificar a formação de gás e turvação do meio, indicando presença destes microrganismos. Os tubos positivos, com formação de gás, foram semeados em tubos contendo o caldo bile verde brilhante 2% e incubados à 37°C para confirmação de coliformes totais e em tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC), com tubos de fermentação de Durhan, e incubados a 45 °C por 24 horas para confirmação de termotolerantes. O NMP de coliformes termotolerantes/g de amostra foi calculado pelo número de tubos positivos confirmados.

A contagem de fungos totais foi realizada pela inoculação de três séries de tubos, contendo 9 mL de água peptonada com 1 mL de diferentes diluições da amostra, em placas com agar sabouraud dextrose cloranfenicol, armazenadas por 5 dias à 37°C. Os resultados foram expressos em UFC/g de amostra (Silva et al., 2017).

2.8 Ensaio para estresse químico em modelo *Caenorhabditis elegans*

a) Preparo das cepas *C. elegans*:

Os nematódeos *Caenorhabditis elegans* usados no estudo foram do tipo selvagem N2 obtidas do Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

A manutenção das cepas foi realizada em placas com meio de crescimento para nematoides (NGM), semeadas com *Escherichia coli* OP50 e encubadas à 20°C (Brenner, 1974).

Para realização dos experimentos os vermes tiveram sua idade sincronizada no mesmo estágio larval. A sincronização para obtenção dos *Caenorhabditis elegans* no primeiro estágio larval (L1) foi realizada a partir da liberação dos ovos dos nematoides grávidos (Augusti et al., 2017). Os nematoides foram coletados em tubos,

aos quais foi adicionada a solução de lise contendo NaOCl 1% e NaOH 0,25 M. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 6 minutos e em seguida foram levados à centrifugação por 6 minutos a 3600 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com água esterelizada e centrifugado por 6 minutos a 3600 rpm. Após descartar a água, os ovos sedimentados foram ressuspensos em solução tampão M9, 0,02 M KH_2PO_4 , 0,04 M de Na_2HPO_4 , 0,08 M NaCl, (Neon, SP, Brasil) e 0,001 M de MgSO_4 (Neon, SP, Brasil), colocados em placas contendo o meio NGM sem adição de bactérias e levados para incubação (Augusti et al., 2017; Charão et al., 2015).

Como apenas os ovos (embriões) resistem ao tratamento, todos eclodem depois de algumas horas do plaqueamento e a cultura é considerada sincronizada com os indivíduos estacionários em L1.

b) Ensaio para o estresse químico

O ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Bonomo et al. (2014) com modificações. Para o tratamento, larvas L1 sincronizadas foram colocadas em placas contendo C, C1 ou C5, e deixadas por 48h a 20°C até atingirem o estágio L4. Para testar se o tratamento com as amostras contendo probióticos, promoveu um aumento na resistência ao estresse oxidativo em relação a amostra sem, os animais tratados ou não com as amostras foram transferidos para uma solução de tampão M9 contendo 7,5mM de tert-butil Hidroperóxido (t-BOOH), um análogo do peróxido de hidrogênio mais estável em meio líquido. Cada experimento foi realizado em placas de 96 poços, com 10 animais colocados em 3 poços por grupo. A viabilidade dos animais foi analisada no tempo 0 e após 6 horas usando microscópio óptico (Nikon, Eclipse e200, Japão) para contar o número de animais mortos. Os vermes eram considerados mortos quando não apresentavam mais batimento faríngeo. As análises foram realizadas em triplicada.

3. Análises Estatísticas

Para a análise dos resultados da composição centesimal, teor de fenólicos totais, flavonóides e quantificação de microrganismos entre as amostras, foi utilizado o Teste T considerando $p < 0,05$ para diferenças significantes. Para o teste de resistência ao estresse químico em modelo *C. elegans*, os dados foram normalizados, submetidos à análise de variância (ANOVA), para comparar as médias e o teste de Turkey foi usado para verificar as diferenças significativas ($p < 0,05$). Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Prisma 5.0 e Microsoft Excel (2013).

4. RESULTADOS

4.1 Composição Centesimal

Os resultados obtidos para umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos e calorias estão representados na Figura 1, e os obtidos para o pH, estão na Figura 2.

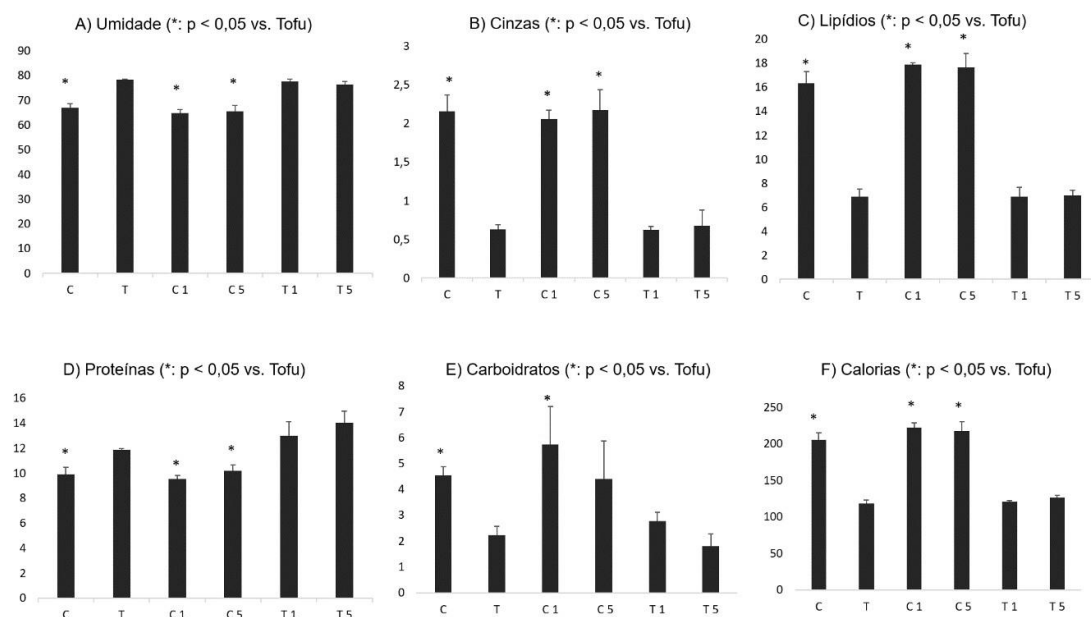


Figura 1. Resultados estão expressos em % para umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, e em Kcal./100g para calorias. Diferenças com $p < 0,05$ em relação ao grupo tofu estão representadas por *.

Os resultados para o teor de umidade das amostras C, C1 e C5 foram respectivamente, $66.99\% \pm 1.57$, $67.75\% \pm 1.46$ e $64.63\% \pm 0.67$. Esses valores diferiram significativamente da amostra T ($78.34\% \pm 0.32$). As amostras T1 e T5 com

resultados respectivamente, $77.52\% \pm 1.09$ e $76.48\% \pm 1.13$, não apresentaram diferença significativa da amostra T. O teor de cinzas obtido para as amostras T, T1 e T2 foram, $0.62\% \pm 0.06$, $0.62\% \pm 0.04$ e $0.67\% \pm 0.2$, respectivamente. As amostras C, C1 e C5 apresentaram valores de cinzas estatisticamente superiores aos encontrados para a amostra T, T1 e T5.

Na análise de proteína, foram encontradas diferenças significantes entre as amostras C ($9.93\% \pm 0.55$), C1 ($9.54\% \pm 0.27$) e C5 ($10.19\% \pm 0.49$) e a amostra T ($11.88\% \pm 0.08$). O teor de proteínas das amostras T1 e T5, $13.01\% \pm 1.13$ e $14.04\% \pm 0.92$, respectivamente, não diferiu com significância do teor da amostra T. Na quantificação de lipídios, as amostras C ($16.35\% \pm 0.35$), C1 ($17.9\% \pm 0.12$) e C5 ($17.65\% \pm 1.17$), obtiveram maior teor desse macronutriente, em relação as outras amostras. A amostra T1 com teor de $6.9\% \pm 0.76$ e T5 com teor de $6.99\% \pm 0.4$, não obtiveram diferença significativa da amostra T ($6.91\% \pm 0.6$).

Para carboidratos, foram encontradas diferenças com $p < 0,05$ entre as amostras C1 ($5,72\% \pm 1,47$), e C5 ($4,40\% \pm 1,46$) com a amostra T ($2,23\% \pm 0,33$). As amostras T1 e T5 com teores respectivamente de, $2,76\% \pm 0,35$ e $1,79\% \pm 0,46$, não foram significativamente diferentes de T. A quantidade de calorias quantificadas nas amostras C ($205.13 \text{ Kcal} \pm 10.11$), C1 ($222.24 \text{ Kcal} \pm 6.31$) e C5 ($217.29 \text{ Kcal} \pm 12.77$) foi superior e diferiram significativamente da amostra T ($118.66 \text{ Kcal} \pm 4.07$). Essa última, possui valor calórico menor que as T1 e T5, respectivamente, $120,95 \text{ Kcal} \pm 1.17$ e $126.33 \text{ Kcal} \pm 3.13$, mas sem diferença significativa.

4.2 Quantificação de fenólicos totais e flavonoides

Foi observado o aumento dos valores de polifenóis quantificados em todas as amostras com probióticos na análise aos 15 dias, em relação as amostras sem probióticos, com diferença na amostra C, T5 e T. Não houve diferença significativa entre o teor de polifenóis após 15 dias das amostras C1 e C5 (figura 2).

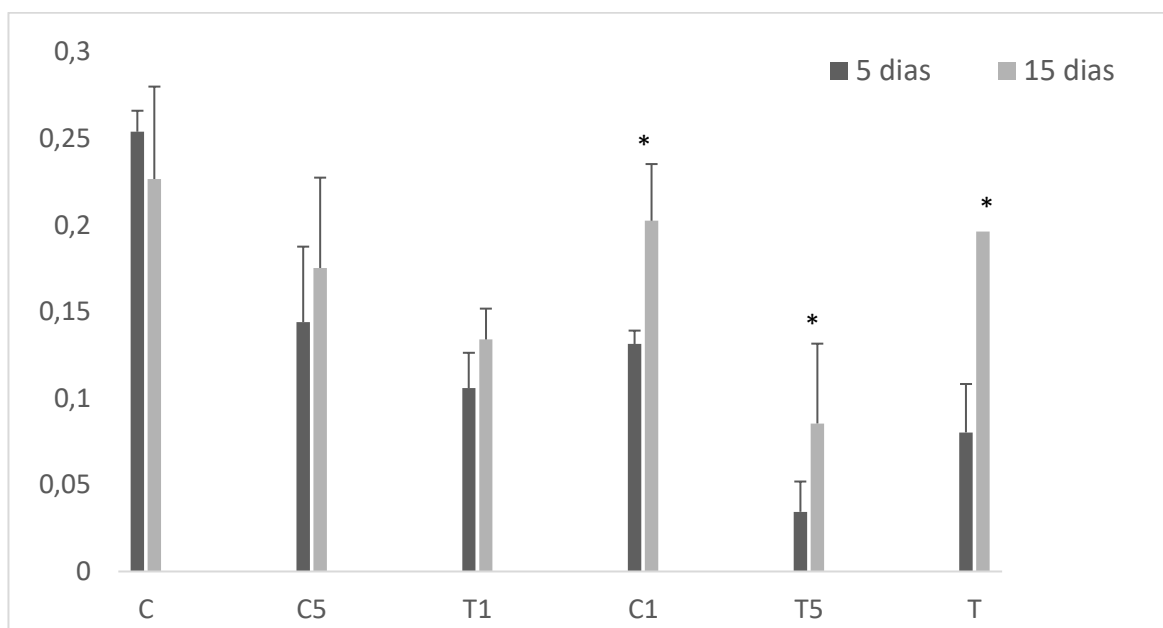


Figura 2: Média e desvio padrão do teor de fenólicos totais das amostras em mEq.ácido gálico/g de amostra, nos intervalos de 5 e 15 dias armazenadas após a produção. * representa diferença com $p < 0,05$.

Houve aumento no tempo de 15 dias, nas amostras C ($p > 0,05$), T ($p < 0,05$), T1 ($p < 0,05$) e T5 ($p > 0,05$). Nas amostras C1 e C5, houve redução da quantidade flavonóides, mas sem diferença significativa da quantificação realizada no tempo de 5 dias (figura 3).

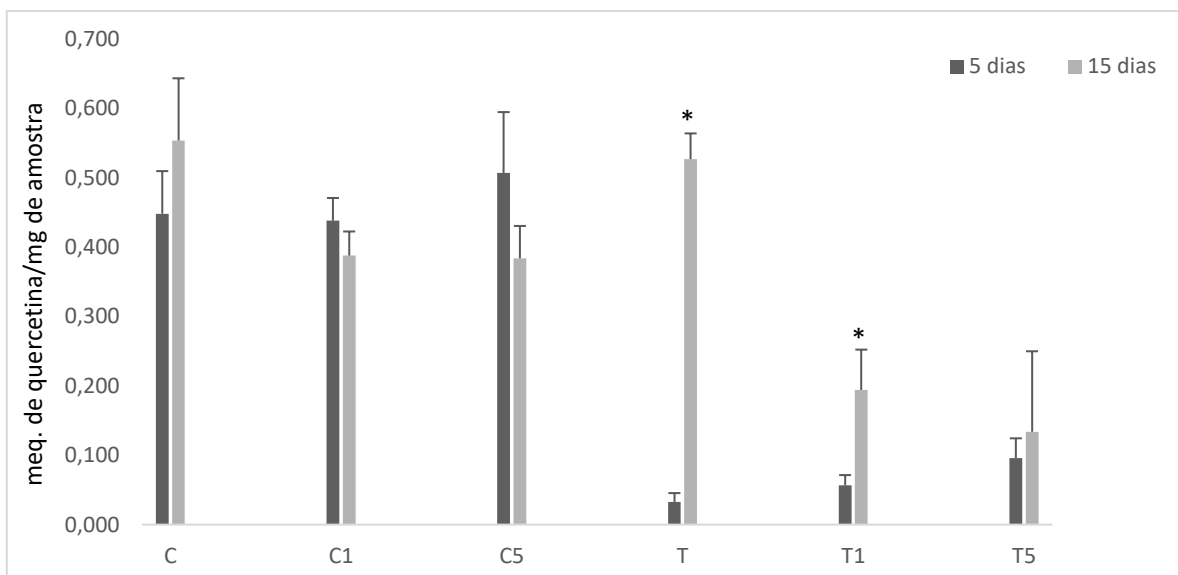


Figura 3: Média e desvio padrão da variação do teor de flavonoides das amostras, nos intervalos de 5 e 15 dias armazenadas após a produção. *Representa diferença com $p < 0,05$.

4.3 Contagem microbiológica de *Lactcaseibacillus rhamnosus* e pH

Durante os dias de armazenamento, o número de probióticos variou entre aumentou até 2.92×10^9 para C1 e até 1.15×10^9 para C5. As amostras T1 e T 5, tiveram a contagem estabelecida, respectivamente em, 4.63×10^8 e 6.53×10^8 (figura 4).

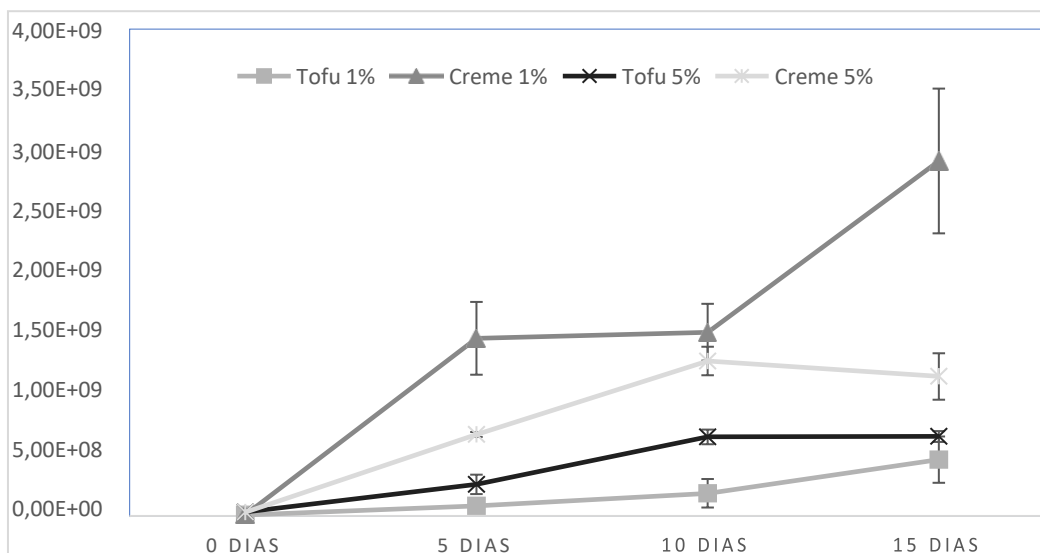


Figura 4. Perfil de sobrevivência dos probióticos *L. rhamnosus* (LRa05), durante armazenamento por 15 dias à 9°C. Eixo Y representa a contagem de unidades formadoras de colônia UFC/mL e no eixo X o tempo, em dias.

No tempo 0, a contagem dos probióticos não teve diferença significativa entre os grupos com mesma porcentagem de probióticos. Ao longo de 10 dias, houve aumento do número de unidades formadoras de colônias (UFC), onde os grupos com 5% de probióticos apresentaram contagem maior do que nos grupos com 1% ($p < 0,05$). Porém, ao 15º dia, o grupo C1 apresentou contagem, com $p < 0,05$, superior ao grupo C5. A quantidade de probióticos nos grupos C1 e C5 foi significativamente maior em todos os tempos de contagem, em relação aos grupos T1 e T5.

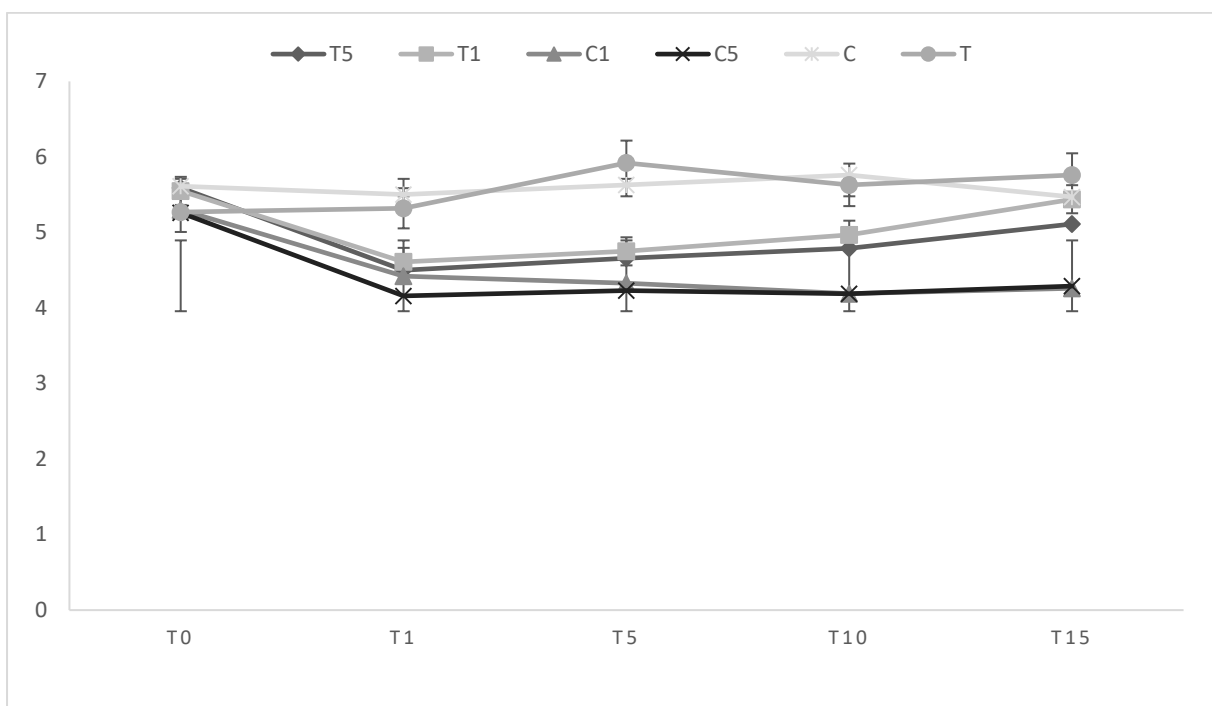


Figura 5. Resultados obtidos para o pH das amostras ao longo de 15 dias, à 9° C, nos tempos 0, 1, 5, 10 e 15. No eixo Y, o valor de pH e no eixo X está representado o tempo, em dias. Diferenças com $p < 0,05$ em relação ao grupo tofu estão representadas por *.

Não houve variação de pH para a amostra C, durante o tempo de armazenamento com $p < 0,05$. Para a amostra C1, houve redução do pH após as primeiras 24h à 37°C, e continuou reduzindo nos dias seguintes sob armazenamento em geladeira, todos os valores foram menores em relação ao tempo 0. O mesmo perfil de mudança foi observado para o grupo C5 (figura 5).

Para a amostra T, não houve variação significativa de pH nas primeiras 24h, mas após 5 e 15 dias, houve uma elevação do pH. Já a amostra T1, sofreu uma redução do pH nas primeiras 24h e após 5 dias, mas com 15 dias, o pH se elevou e não houve diferença significativa em relação ao tempo 0. A amostra T5 seguiu o mesmo padrão de variação da amostra T1.

4.4 Contagem de bactérias mesófilas, coliformes totais/termotolerantes e fungos totais

A contagem de bactérias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes e fungos totais, foi realizada nas amostras que estavam sob resfriamento à 9°C, após 5 e 15

dias da produção, os resultados estão apresentados na figura 6 e tabela 1.

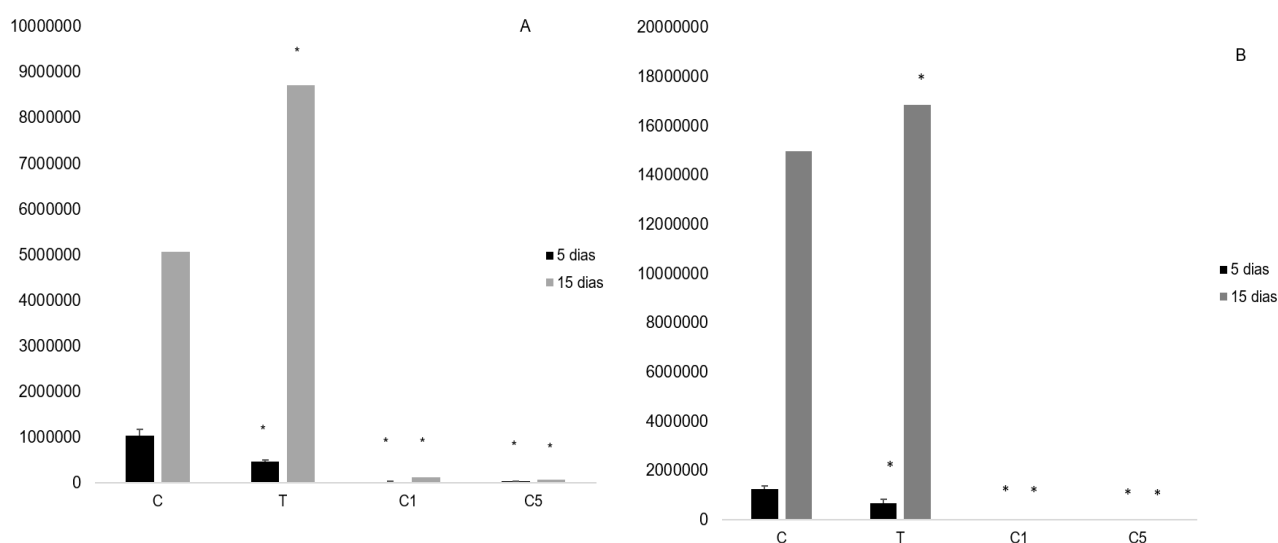


Figura 6: A: contagem de microrganismos mesófilos aeróbios nos tempos 5 e 15 dias. B: Contagem de fungos totais nos tempos 5 e 15 dias. Os valores estão expressos em média e desvio padrão. O eixo Y representa a contagem de unidades formadoras de colônias em UFC/g e no eixo X as amostras. * representa diferença com $p < 0,05$ em relação a amostra creme.

Tabela 5: Médias das contagens das unidades formadoras de colônias de mesófilos aeróbios, coliformes e fungos totais.

Após 5 dias:	Coliforme Totais 35 °C NMP/g	Coliformes termotolerantes 45 °C NMP/g
Creme	$7,5 \times 10^3$	NE
Tofu	<3	NE
Creme 1%	<3	NE
Creme 5%	$3,33 \times 10^3$	NE
Após 15 dias:		
Creme	<3	NE
Tofu	<3	NE
Creme 1%	<3	NE
Creme 5%	<3	NE

* representa diferença com $p < 0,05$ em relação a amostra creme e letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa entre a amostra creme 1% e 5%.

Na primeira análise de bactérias mesófilas, após 5 dias de produção, todas as amostras diferiram significativamente da amostra creme, sendo a menor contagem na amostra creme 1%. Esta última obteve uma menor quantidade de microrganismos em relação a amostra creme com 5% de *L. rhamnosus*. Com 15 dias, a amostra C demonstrou uma resitência maior ao crescimento de bactérias mesófilas em relação a amostra T, mas não em relação as amostras C1 e C5. Comparando essas duas últimas, a amostra com 5% de probióticos obteve uma contagem menor de mesófilos em relação a amostra com 1%.

Para fungos totais, a amostra C5 não teve crescimento detectado com 5 ou 15 dias de armazenamento. Com 5 e 15 dias, a amostra C1 obteve menor contagem em relação as demais, com $p < 0,05$.

Com 5 dias de armazenamento, somente as amostras creme e creme 5% apresentaram contagem de coliformes totais, não houve resultado positivo para termotolerantes. Com 15 dias, não houve resultado positivo nem para coliformes totais nem para termotolerantes, para nenhuma amostra.

4.5 Estresse Oxidativo Químico em modelo animal *Caenorhabditis elegans*

A sobrevivência ao estresse químico foi medida às 0 e 6 h. Foram analisados três poços, cada um com aproximadamente dez vermes, para cada grupo experimental. Os vermes foram classificados como mortos se não exibissem movimento ou bombeamento faríngeo. Não houve diferença significativa entre o número de sobreviventes entre os tempos da análise dos grupos, comparado ao grupo controle (figura 7).

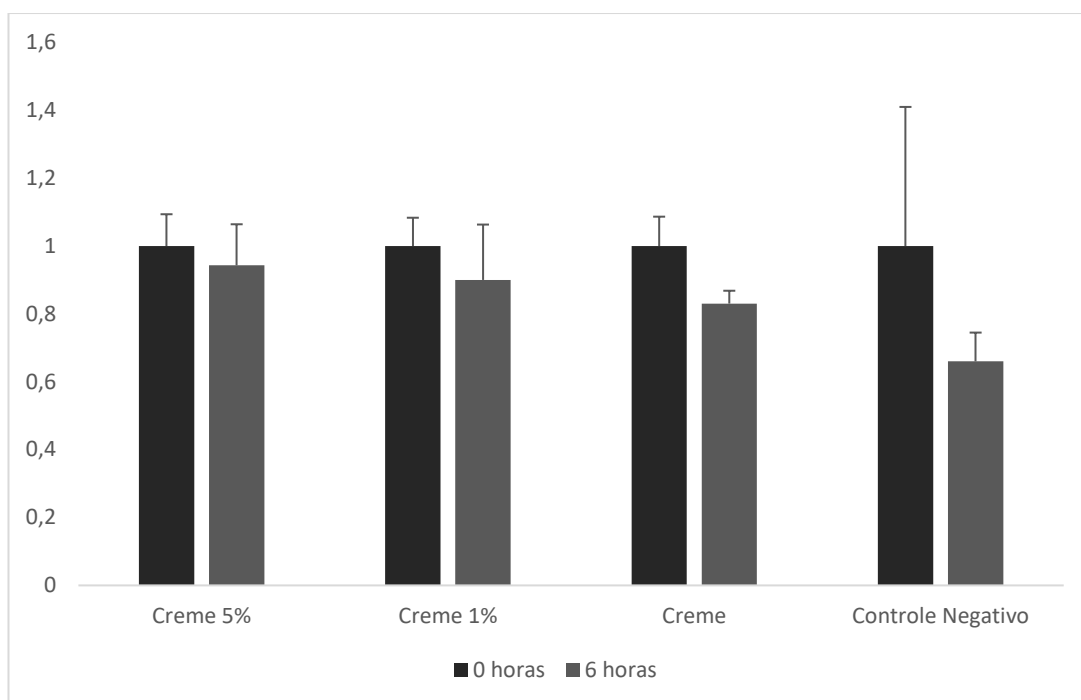


Figura 7: Taxa de sobrevivência de *C.elegans* durante o estresse químico nos grupos contendo amostras e grupo controle. Os dados normalizados, estão expressos como média $\pm$ D. P. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

O teor de umidade encontrado para as amostras C, C1 e C5, variou entre 64.75 ± 1.46 – 66.99 ± 1.57 , apresentando menor teor de umidade em relação as outras amostras, isso está relacionado à maior quantidade de gorduras quantificada para as mesmas. Esses valores são superiores aos encontrados por Oyeyinka et al. (2019), que desenvolveu variações de tofu com 100% soja e 60% soja com 40% castanha de caju, encontrando para umidade valores de 55.16% e 47.19%, respectivamente. Porém, os valores encontrados para todas amostras dessa pesquisa, estão semelhantes aos descritos no trabalho de Li et al., 2020, que variou entre 62.74%-70.81%.

Para cinzas, as amostras analisadas nessa pesquisa variaram entre 0,62 – 2,17. Esses valores estão de acordo com os encontrados em outras pesquisas com produção de tofu. Em trabalho realizado por Li et al. (2020), foram encontrados valores entre 1.31% a 2.37%, para amostras de tofu armazenadas em diferentes temperaturas. Em análises da utilização de diferentes coagulantes na produção de tofu, pesquisas científicas já relataram alteração no teor de cinzas e de outros componentes. Schimidt et al. (2017), analisou o efeito de diferentes coagulantes na produção de tofu, quantificando teor de cinzas entre 0.63% – 0.94%. Ndife et al., (2021) também encontrou variação em duas análises, encontrando valores entre 2.8 – 3.89%. Shobharani et al. (2015), em sua pesquisa com alimento a base de soja e probióticos, encontrou maior teor de minerais, nos produtos com fermentação, sendo isso relacionado a digestão da proteína da soja por microrganismos, que fornecem minerais mais solúveis.

O teor de lipídeos das amostras C, C1 e C5 foi superior, com uma diferença significativa, ao encontrado nas amostras T, T1 e T5 devido à adição de azeite de oliva e alho, componentes conhecidamente ricos em ácidos graxos (Cosa et al., 2019; Orsavova et al., 2015). Esses dados, justificam a elevação do teor de calorias das amostras C, C1 e C5 em relação às amostras sem adição de azeite. O teor de lipídeos quantificado para as amostras sem adição de azeite, alho e ervas, variou entre 6.91% a 6.99, próximo da faixa de valores quantificados por Han et al., 2002, para variações de tofu fermentado (8-12%).

O teor de lipídeos dessas amostras está semelhante ao encontrado por Oyeyinka et al, 2019 para a amostra contendo 60% soja e 40% castanha de caju e também, estão semelhantes ao encontrado por Ndife et al. (2021) ,que estudou a produção de tofu com fermentação diferentes tipos de coagulantes, encontrando teor de 5.3 – 7.56% de lipídios para suas amostras. A quantificação de lipídeos das nossas amostras, com e sem adição de probióticos, azeite, alho e ervas, está superior ao encontrado no trabalho de Shobharani et al. (2015), que produziu tofus com diferentes probióticos e encontrou teor de lipídios entre 1.11 – 2.59%.

A quantidade de proteínas quantificada nas amostras dessa pesquisa foi semelhante entre si, variando entre 9.93 – 14.04%, devido à variações no processo de preparo das amostras, onde as amostras receberam adição de probióticos, azeite, alho e ervas. Li, Qinghui et al, (2013), encontraram valores entre 6.4 – 22.39% de proteínas nas amostras de tofu em sua pesquisa realizada, utilizando 4 variações na produção e adição de probióticos *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM and *Bifidobacterium lactis* HOWARUTM. As amostras T1 e T5 resultaram em um pequeno aumento do teor de proteínas em relação a amostra T. Em outros estudos com soja e probióticos, a quantidade de proteína também já foi quantificada em maior quantidade em amostras com adição de microrganismos em relação a amostras sem, sendo isso atribuído à multiplicação de células microbianas, o que contribui para o conteúdo de proteína (Ebhodaghe et al., 2012; Shobharani et al., 2015).

Os carboidratos foram quantificados, por diferença, nas amostras C, C1 e C5 ficaram entre 4.40 – 5.72%, quantidade superior às amostras T, T 1 e T5, que variaram entre 1.79 – 2.3%. Possivelmente essa diferença está relacionada a adição das ervas e pasta de alho à composição dos produtos. Os valores encontrados para as amostras T, T1 e T5 são semelhantes aos descritos Shobharani et al., 2015 em sua pesquisa, que variaram 1.16 – 3.47% para amostras de tofus com diferentes probióticos e 3,82% para o controle sem probiótico.

Os polifenóis são moléculas bioativas, sendo os flavonoides um subgrupo, desses compostos. Estão presentes nas plantas, frutas e hortaliças (Santos- Buelga et al., 2019). Alimentos contendo polifenóis, são considerados funcionais pois diversos estudos ao longo dos anos comprovaram a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimutagênica dessas moléculas, portanto o seu consumo beneficia a saúde (Liu et al., 2021; Ruiz Rodríguez et al., 2021; Soni et al., 2006).

Os resultados das análises químicas mostraram que a amostra C alcançou uma maior concentração de polifenóis e flavonoides do que a amostra T com diferença significativa ($p < 0,05$) na primeira análise e com $p > 0,05$ na análise aos 15 dias (Figura 2). Essa diferença na quantidade está relacionada ao fato de que, o produto C possui adição de azeite de oliva, alho e ervas, itens utilizados na culinária que possuem compostos fenólicos em sua composição, além dos encontrados naturalmente na soja. Além disso, a fermentação pelos probióticos, também pode aumentar o teor dessas moléculas pela hidrólise de polifenóis complexos em outros compostos fenólicos (Angeloni et al., 2017; Chung et al., 2011; Jiang, 2019; Soni et al., 2006; Vallverdú-Queralt et al., 2014).

O aumento do teor desses compostos na amostra T dias após a primeira análise, pode ser atribuído a ação das bactérias mesófilas quantificadas nessa amostra, que também aumentaram em número de UFC/mL durante o período de 5 e 15 dias ($4.7 \times 10^5 - 8.72 \times 10^6$ ufc/mL). As amostras T1 e T5 também alcançaram maior quantidade de polifenóis na análise aos 15 dias, com diferença ($p < 0,05$) em relação a amostra T no mesmo período, reforçando que a adição de probióticos beneficiou o produto, mas não houve diferença significativa entre a adição de 1% ou 5% para essa análise na amostra T.

A literatura científica possui registros de que a fermentação com bactérias ácido lácticas, pode aumentar a biodisponibilidade e bioatividade de fitoquímicos, pela conversão de suas versões glicosídicas em agliconas, pela ação das enzimas β -glucosidase produzida pelos microrganismos (Hur et al., 2014; Liu et al., 2021). Liu et al., 2021 estudaram a fermentação de bagaço de maçã com *Lactcaseibacillus rhamnosus* L08. Nessa pesquisa, foi verificada a produção de β -glucosidase por esses microrganismos e a quantificação de polifenóis nas amostras fermentadas, foi realizada durante 7 dias. Os resultados mostraram que ao 3º e (440.45 $\mu\text{g/mL}$) e 6º dia (480.80 $\mu\text{g/mL}$), houveram aumentos dos teores de polifenóis em 15% em relação a amostra não fermentada (383.0 $\mu\text{g/mL}$), sendo isso justificado pelo crescimento bacteriano e atividade da enzima citada. Porém, nessa mesma pesquisa, foi observado que entre o 4º e 5º dia, ocorreu um decréscimo nessa quantificação de fitoquímicos, fato que foi associado a utilização dos compostos fenólicos pelas cepas, como fonte de carbono para que elas mantivessem o seu crescimento. O significativo aumento no 6º dia, foi associado acúmulo de β -glucosidase durante a fermentação, que resultou

em hidrólise de polifenóis complexos em mais compostos fenólicos.

As amostras C1 e C5 também alcançaram maior teor de polifenóis no 15º dia em relação ao 5º (Figura 2), que pode ser justificado pelo crescimento dos probióticos ao longo dos dias (Figura 4). No entanto, não houve diferença significativa entre as duas amostras nesse período da análise, sugerindo que a quantidade de probióticos adicionada de 1 e 5% promoveram benefícios semelhantes ao produto.

Na quantificação de flavonoides (Figura 3), as amostras C1 e C5 sofreram uma redução do conteúdo, mas sem diferença significativa entre as análises. Enquanto as amostras T 1 e T 5 tiveram o teor aumentado, mas também sem diferença significativa ($p>0,05$). Na pesquisa com fermentação do bagaço de maçã, LIU et al., 2021 também observaram aumento e redução de alguns flavonoides durante as análises, sugerindo que as enzimas produzidas pelos *Lactobacillus rhamnosus*, podem possuir mais afinidade molecular para algumas moléculas de fenólicos do que para outras, resultando assim, em hidrólise em diferentes níveis.

Em outro estudo, onde o objetivo foi avaliar a influência de cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*, quanto à cor, perfil polifenólico e atividade antioxidante do suco de amora, foi observada maior concentração de polifenóis e flavonoides nas amostras fermentadas em relação a amostra não fermentadas. A quantidade de polifenóis foi maior no grupo fermentado por *Lactobacillus plantarum*, chegando à 8,34 mEq. de gálico. Esse fato, foi atribuído a capacidade desses microrganismos em produzir enzimas hidrolíticas, que quebram moléculas de fenólicos conjugados em compostos mais simples (Kwaw et al., 2018).

A RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018 (Brasil, 2018) dispõe sobre diretrizes para que um alimento com probiótico seja considerado funcional, desde que, por meio de estudos sua segurança seja comprovada, que ocorra avaliação dos desfechos relevantes para o benefício alegado, e que seja avaliada a quantidade adequada de microrganismos.

Nagpal et al. (2012) em uma revisão de literatura sobre utilização de probióticos em alimentos, relatou que para que tenham atividade funcional, a contagem de microrganismos deve ficar em torno de $10^6 - 10^9$ UFC/mL.

A contagem de células viáveis de *L. rhamnosus*, aumentou significativamente

entre o tempo 0 (dia da inoculação) ao 15º dia de armazenamento, para todas as amostras contendo probióticos. Esse crescimento ficou evidenciado também, com a redução do pH das amostras. Durante os 15 dias de armazenamento, todas as amostras permaneceram com quantidade de probióticos dentro da faixa desejada, acima de 10^6 UFC/mL (Ng et al., 2008).

Nas primeiras 24h, o pH reduziu significativamente para as amostras C1, C5, T1 e T5, mostrando que houve fermentação e crescimento das bactérias à 37°C, ficando em torno de 4.42, 4.16, 4.61 e 4.5, respectivamente. Enquanto as amostras sem probióticos, T e C, com pH respectivamente 5.27 e 5.61 no tempo 0, apresentaram uma leve alteração do valor nas primeiras 24 h, sem diferença significativa. Zielinska et al. (2015) analisou 4 tipos de preparação de tofu com e sem adição de probióticos.

Na referida pesquisa, foi obtido 6,39 para o pH após 24h à 9°C, da amostra sem adição de microrganismos, não observando variação significativa ao longo de 15 dias (6,86). Para a amostra contendo *Lactcaseibacillus casei*, após 20h e 22h em incubação à 37°C o pH foi de 5,5 e 4,33, respectivamente, semelhante ao obtido em nas amostras da atual pesquisa.

Entre o 5º e 15º a contagem de probióticos das amostras C5, permaneceram dentro da faixa desejada de 10^9 UFC/mL. A amostra C1 permaneceu com aumento da contagem até o 15º dia, mas não ultrapassando 10^9 UFC/mL. O pH dessas amostras, permaneceu na faixa de 4.20 – 4.26.

Quando adicionadas aos alimentos, as bactérias ácido lácticas produzem ácidos orgânicos, convertendo glicose em ácido láctico ao longo dos dias (NG et al., 2008). A multiplicação desses microrganismos, ocasionam a redução do pH e consequentemente, também auxiliam na conservação, por inibirem o crescimento de outros microrganismos não desejados (El-Shouny et al., 2013; Liong et al., 2009; Zielinska et al., 2015). Nessa pesquisa, foi observado que nas amostras C1 e C5, ao 15º dia, tinham menor quantidade de microrganismos mesófilos com $p < 0,05$ em relação às amostras C e T, que não continham adição de probióticos, contribuindo para essa evidência.

Liu, Dong et al. (2006), realizaram uma pesquisa com adição de *Lactobacillus rhamnosus* 6013, em amostras de tofu, e observou o comportamento do crescimento

dos probióticos e do pH, ao longo de 30 dias sob armazenamento à 4°C, observando que apesar do pH ter reduzido (4.5 a 4.3), em relação o tempo inicial, o número de células viáveis também reduziu ($8.9 - 7.9 \times 10^7$), com mudanças mais evidentes entre 5º e 15º dia.

As amostras T1 e T5 não apresentaram diferença significativa entre si, durante o tempo de armazenamento. O pH dessas amostras, ao final do armazenamento, eram de 5,44 e 5,11, respectivamente, valores maiores do que o pH das amostras C1 e C5 no mesmo período, mostrando que a quantidade de microrganismos afetou o pH das amostras nessa pesquisa. Resultados semelhantes também foram obtidos em outros estudos com tofu e probióticos (Liong et al., 2009; Liu, Dong Mei et al., 2006; Zielinska et al., 2015). Além disso, a literatura científica tem relatado possíveis benefícios da associação de óleos vegetais e probióticos afim de aumentar sua viabilidade e sobrevivência nos produtos alimentares, melhorando a resistência à estresses do ambiente e ácidos gástricos (Alonso García et al., 2019; Zullo e Ciafardini, 2019).

As amostra tofu apresentou uma contagem de bactérias mesófilas aeróbias maior do que amostra creme no 5º e 15º dia, sugerindo que a adição das especiarias, alho e azeite de oliva, podem ter auxiliado na conservação do produto. O pH da amostra T não apresentou diferença significativa entre o tempo 0 e 15º dia, permanecendo na faixa de 5.27 – 5.76, valores semelhantes da amostra C, que permaneceu entre 5.47 – 5.63.

Apesar das amostras C1 e C5 apresentarem maior contagem de células viáveis de *L. rhamnosus*, do que as amostras T1 e T5, todas permaneceram com uma quantidade de microrganismos acima de 10^6 , quantidade aceitável para que o alimento tenha potencial para ser avaliado como funcional (Ng et al., 2008).

Não existe legislação vigente com padrões estabelecidos para contagem de microrganismos mesófilos em tofu, porém a literatura relata que alimentos destinados ao consumo humano com mais de 10^6 UFC/g devem ser considerados suspeitos, pois há uma possibilidade de ter presença de microrganismos deteriorantes no alimento (Ribeiro et al., 2017).

Os resultados nessa pesquisa para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias na amostra T ($4.7 \times 10^5 - 8.72 \times 10^6$), está próximo à de tofus industrializados no Brasil, que podem variar entre $4.3 \times 10^5 - 9.1 \times 10^6$ (Ribeiro et al., 2017). A contagem obtida

nas outras amostras também está acima do parâmetro aceitável para outros alimentos, no entanto, as amostras C 5 e C1 tiveram uma contagem significativamente menor de microrganismos mesófilos aeróbios em relação as amostras C e T. Essa constatação, indica que a adição de probióticos, azeite, alho e ervas podem ter beneficiado o alimento, promovendo um crescimento mais lento de outros microrganismos, que podem deteriorar os alimentos.

Ashenafi Mogessie (1994), analisaram diferentes tipos de tofu, e observou contagem de mesófilos em torno de $5.2 - 6.4 \times 10^5$ UFC/g. Ele verificou que o precipitado obtido a partir do leite de soja, possuía contagem na faixa 10^2 UFC/g, evidenciando que as contaminações aconteceram nos processos de preparo do tofu subsequentes. Além disso, uma das amostras continha adição de ervas, sendo essa detentora da maior contagem de microrganismos, sendo assim, ele sugeriu que as ervas antes de serem adicionadas, devem passar por um processo para redução de sua microbiota. Outro estudo, realizado por Rossi e colaboradores em 2016, com análises de tofu fresco e industrializado, verificou que a qualidade microbiológica desse alimento pode ser melhorada pela redução de cargas microbiológicas de outros ingredientes utilizados no preparo, procedimentos que sigam as normas higiênico-sabituárias, durante a moldagem, coagulação e armazenamento, mais rigorosos.

De acordo com a resolução RDC nº 161, de 01 de julho de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2022) que regulamenta padrões microbiológicos e sanitários para o tofu, os valores para coliformes a 45°C, devem apresentar valores menores que 10^2 NMP/g. Os resultados apresentados na tabela 1, mostram que não houve crescimento de coliformes, mostrando que não houve contaminação do alimento com esse microrganismo. Ribeiro et al. (2017) em sua pesquisa, encontrou valores entre $3.2 \times 10^1 - 7.9 \times 10^5$ para coliformes totais para 7 amostras, sendo que 3 apresentaram contagem acima de 10^5 para termotolerantes, mostrando que houveram falhas no processo de produção.

Os alimentos destinados ao consumo humano não são obtidos em estado estéril ou sem contaminação de maneira habitual. Do ponto de vista microbiológico, os condimentos ou especiarias em contato com umidade, temperatura e manipulação inadequada, podem ser fontes de contaminação de bactérias e fungos (Klimešová et al., 2015).

A RDC nº 12/2001 que dispõe sobre padrões microbiológicos em alimentos, da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), determina valores padrões que preconizam índices aceitáveis iguais ou menores a 5×10^2 UFC/g para coliformes fecais, não estabelecendo valores permitidos para bolores e leveduras em especiarias, condimentos e tofu. Sendo as especiarias são amplamente utilizadas das especiarias na culinária (Jiang, 2019; Vallverdú-Queralt et al., 2014).

Durante as análises, a amostra C apresentou contagem de fungos semelhante à amostra T, e isso pode estar associado a presença de microrganismos nas especiarias, contaminação na parte inicial do processo ou contaminação durante a manipulação dos mesmos, durante o preparo (Klimešová et al., 2015). No entanto, a amostra C1 apresentou contagem menor, enquanto que a C5, não apresentou crescimento de fungos, sugerindo que a adição de probióticos pode ser benéfica para um menor ou inibição de crescimento de microrganismos nos alimentos, ajudando na sua conservação (Behera e Panda, 2020; Munekata et al., 2022). Ng et al., 2008, realizou análises comparando tofus inoculados com *L. bulgaricus* FTCC 0411 e *L. fermentum* FTD 13, durante 9 dias com armazenamento à 4°C e 25°C. Nessa pesquisa, foi observado que o crescimento de microorganismos aeróbicos e anaeróbicos não específicos, foi maior nas amostras controle armazenadas nas duas temperaturas, onde não houve adição de probióticos. Foi apresentando um crescimento mais lento nas amostras armazenadas sob resfriamento, evidenciando que a temperatura mais baixa e a adição de probióticos, podem beneficiar a qualidade do alimento por mais dias. Zielinska et al. (2015), também encontrou resultados semelhantes em sua pesquisa com adição de *L. paracasei* LOCK 0919 e *Bifidumbacterium animalis* spp. *lactis* BB-12 em tofu. Os resultados mostraram menor crescimento de microrganismos contaminantes nas amostras com probióticos em comparação com a amostra sem.

A soja é uma leguminosa, fonte de aminoácidos, polifenóis e a literatura relata o seu consumo como benéfico à saúde, devido as suas propriedades anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica e antiaterogênica (Ng et al., 2008; Oyeyinka et al., 2019). O azeite de oliva, possui polifenóis e gorduras insaturadas em sua composição que beneficiam a saúde em diversos aspectos, por sua ação antioxidante e de prevenção de doenças crônicas (Angeloni et al., 2017; Jimenez-Lopez et al., 2020), além disso, a adição de probióticos também um fator que auxilia no aumento de compostos bioativos, aumentando a atividade antioxidante e promovendo benefícios à saúde

humana, como melhora da saúde intestinal, imunidade e prevenção de doenças (Bustos et al., 2004; Nagpal et al., 2012; Yeo e Liong, 2010).

Para estabelecer o potencial benéfico *in vivo* do creme de soja com probióticos frente ao estresse oxidativo, foi utilizado o modelo *C. elegans*, amplamente estudado, por ter um ciclo de vida curto, fácil de manusear, ser um organismo multicelular com um genoma totalmente sequenciado, por existirem cepas mutantes disponíveis e por ter vias evolutivamente conservadas para o envelhecimento (C. elegans Sequencing Consortium, 1998).

A capacidade dos fitoquímicos em aumentar a resistência ao estresse oxidativo é descrita na literatura, como a avaliação da ação de polifenóis de blueberry na longevidade em modelo *C. elegans* e a influência de catequinas na resistência ao estresse oxidativo e térmico, no mesmo modelo animal (Surco-Laos et al., 2012; Wilson et al., 2006). Em um estudo em no modelo *C. elegans*, foi avaliada a ação dos polifenóis da azeitona na longevidade e na ação neuroprotetora contra a doença de Parkinson. Foi analisada uma formulação natural de polifenóis de oliva, contendo hidroxitirosol e hidroxitirosol isolado, concluindo que a versão "in natura" teve ação superior por possuir em sua composição outros compostos como oleuropeína aglicona, tirosol e ácido gálico (Di Rosa et al., 2020). No entanto, nessa pesquisa, houve uma mortalidade de 100%, independente da exposição do tratamento.

6. Considerações finais

Foram realizadas análises para caracterizar a composição do produto, sendo possível quantificar seus compostos bioativos durante um período de armazenamento, como polifenóis, flavonóides e os probióticos. Foram realizadas comparações com uma versão tradicional de tofu e análises a respeito de possíveis microrganismos que possam ter contaminado o alimento durante o processamento ou armazenamento. Para pressupor um possível efeito no aumento da resistência frente ao estresse químico, em modelo com microrganismos *C. elegans*, , foi concluído que não houveram diferenças entre os grupos tratamento e o grupo controle, sendo necessárias mais pesquisas para revisão dos parâmetros analisados.

Foram verificados benefícios da adição de especiarias, alho e azeite, na amostra creme, como ao aumento de polifenóis e flavonóides em relação a amostra tofu, sendo esses parâmetros melhorados após a fermentação pelos probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, que foram adicionados e permaneceram em quantidades adequadas, para que o alimento seja considerado funcional, durante 15 dias de armazenamento. Também foi verificado um benefício da adição *L. rhamnosus* em relação a proteção contra crescimento de outros microrganismos que possam deteriorar o alimento, porém, são necessários mais análises e melhor controle dos processos, para reduzir interferentes durante a produção.

Considerando que a soja, o azeite, especiarias e os probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, possuem diversos benefícios à saúde descritos na literatura, o alimento elaborado na presente pesquisa pode ser um produto com propriedades superiores ao tofu tradicional, nos parâmetros analisados e possivelmente, viável comercialmente, visto que, todos esses itens são de fácil acesso pelas indústrias de alimentos no Brasil. No entanto, mais estudos são necessários para assegurar o controle de qualidade do processamento e a aceitabilidade pelo público potencialmente consumidor.

7. Referências

1. DJAAFAR, T. F.; CAHYANINGRUM NURDEANA; PURWANINGSIH HENI. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF TRIBAL BEAN (*Canavalia virosa*) AND ITS ALTERNATIVE TOFU AND TEMPEH FOOD PRODUCTS. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, 2010.
2. ALONSO GARCÍA, E. et al. New insights into the molecular effects and probiotic properties of *Lactobacillus pentosus* pre-adapted to edible oils. **LWT**, v. 109, p. 153–162, 1 jul. 2019.
3. ANGELONI, C. et al. **Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 1 nov. 2017.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. **Assoc Anal Chem**, 2012.
5. ASHENAFI MOGESSIE. **Microbiological evaluation of tofu and tempeh during processing and storage****Plant Foods for Human Nutrition**. [s.l: s.n.].
6. AUGUSTI, P. R. et al. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 60–67, 2017.
7. BATTISTINI, C. et al. Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 303–309, 2018.
8. BEHERA, S. S.; PANDA, S. K. **Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. Current Opinion in Food Science**Elsevier Ltd, , 1 abr. 2020.
9. BOWER, A.; MARQUEZ, S.; DE MEJIA, E. G. The Health Benefits of Selected Culinary Herbs and Spices Found in the Traditional Mediterranean Diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2728–2746, 9 dez. 2016.
10. BRENNER, S. **THE GENETICS OF CAENORHABDYTIS ELEGANS**. [s.l: s.n.].
11. BUSTOS, G. et al. Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* Using Vinification Lees as Nutrients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 801–808, 17 fev. 2004.

12. CHARÃO, M. F. et al. Caenorhabditis elegans as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093–5106, 2015.
13. CHUNG, I. M. et al. Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 960–967, 2011.
14. COSA, S. et al. Exploring common culinary herbs and spices as potential anti-quorum sensing agents. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 1–17, 2019.
15. DAVIS, B. C.; KRIS-ETHERTON, P. M. Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: Current knowledge and practical implications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3 SUPPL., p. 640–646, 2003.
16. DE BONOMO, L. F. et al. Açai (Euterpe oleracea Mart.) modulates oxidative stress resistance in Caenorhabditis elegans by direct and indirect mechanisms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 3 mar. 2014.
17. DI ROSA, G. et al. Healthspan enhancement by olive polyphenols in c. Elegans wild type and parkinson's models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1–22, 2020.
18. EBHODAGHE, S. O.; ABIOSE, S. H.; ADENIRAN, H. A. Assessment of Physico-chemical Characteristics, Viability and Inhibitory Effect of Bifidobacteria in Soymilk. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 2, 28 abr. 2012.
19. EL-SHOUNY, W.; ABO-KAMAR, A.; RAGY, S. **CHARACTERIZATION OF THE PARTIALLY PURIFIED PLANTARCIN SR18 PRODUCED BY LACTOBACILLUS PLANTARUM SR18**. [s.l: s.n.].
20. ESQUIVEL-ALVARADO, D. et al. Composition of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Three Tropical Vaccinium Species from Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 2872–2879, 11 mar. 2020.
21. **Genome sequence of the nematode C. elegans: A platform for investigating biology**. **Science**American Association for the Advancement of Science, , 11 dez. 1998.
22. GUASCH-FERRÉ, M. et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2014.

23. HAN, B.-Z.; ROMBOUTS, F. M.; NOUT, M. J. R. **A Chinese fermented soybean food** *International Journal of Food Microbiology*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro>.
24. HUR, S. J. et al. **Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods**. *Food Chemistry* Elsevier Ltd, , 1 out. 2014.
25. JIANG, T. A. **Health benefits of culinary herbs and spices**. *Journal of AOAC International* AOAC International, , 1 mar. 2019.
26. JIMENEZ-LOPEZ, C. et al. Olive Oil. [s.d.].
27. KAHLEOVA, H.; LEVIN, S.; BARNARD, N. D. Vegetarian Dietary Patterns and Cardiovascular Disease. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 61, n. 1, p. 54–61, 2018.
28. KLIMEŠOVÁ, M. et al. Microbial contamination of spices used in production of meat products. **Potravinárstvo**, v. 9, n. 1, p. 154–159, 2015.
29. KREPSKY, P. B. et al. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. **Phytomedicine**, v. 19, n. 11, p. 953–957, 2012.
30. KWAW, E. et al. Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. **Food Chemistry**, v. 250, p. 148–154, 1 jun. 2018.
31. LI, Q. et al. Evaluation of the rheological, textural, microstructural and sensory properties of soy cheese spreads. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 429–439, 2013.
32. LI, Y. et al. Influence of the addition of *Geotrichum candidum* on the microbial, chemical, textural, and sensory features of soft soy cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 11, p. 1–11, 2020a.
33. LI, Y. et al. Influence of the addition of *Geotrichum candidum* on the microbial, chemical, textural, and sensory features of soft soy cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 11, 1 nov. 2020b.
34. LIONG, M. T. et al. Survival, growth characteristics and bioactive potential of *Lactobacillus acidophilus* in a soy-based cream cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 8, p. 1382–1391, jun. 2009.
35. LIU, D. M. et al. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 417–422, 2006.

36. LIU, L. et al. Biotransformation of polyphenols in apple pomace fermented by β -glucosidase-producing *Lactobacillus rhamnosus* I08. **Foods**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2021.
37. MERRILL, A.L. AND WHATT, B. K. Energy value of foods. Basic and derivation. **Agriculture Handbook No. 74**, n. 74, p. 2–11, 1973.
38. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO GABINETE DO MINISTRO. . [s.l: s.n.].
39. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA-RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. . [s.l: s.n.].
40. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. . [s.l: s.n.].
41. MUNEKATA, P. E. S. et al. **Functional fermented meat products with probiotics—A review. Journal of Applied Microbiology** John Wiley and Sons Inc, , 1 jul. 2022.
42. NAGPAL, R. et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, n. 1, p. 1–15, 2012.
43. NDIFE, J.; IMADE, I.; SAMAILA, J. Production and quality evaluation of soy cheese (tofu) using various coagulants . **Croatian journal of food science and technology**, v. 13, n. 1, p. 36–42, 1 jun. 2021.
44. NG, K. H. et al. Growth characteristics and bioactivity of probiotics in tofu-based medium during storage. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 477–487, 2008.
45. ORSAVOVA, J. et al. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12871–12890, 2015.
46. OYEYINKA, A. T.; ODUKOYA, J. O.; ADEBAYO, Y. S. Nutritional composition and consumer acceptability of cheese analog from soy and cashew nut milk. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 12, p. 1–6, 2019.
47. RIBEIRO, T. T. B. C.; COSTA, G.; DA COSTA, M. Contaminação microbiana em tofu industrial. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 3, 2017.

48. ROSSI, F. et al. Microbiological characteristics of fresh tofu produced in small industrial scale and identification of specific spoiling microorganisms (SSO). **LWT**, v. 70, p. 280–285, 1 jul. 2016.
49. RUIZ RODRÍGUEZ, L. G. et al. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. **Food Research International**, v. 140, 1 fev. 2021.
50. SANTOS-BUELGA, C. et al. Plant phenolics as functional food ingredients. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Academic Press Inc., 2019. v. 90p. 183–257.
51. SHARMA, P.; SHARMA, D.; AMIN, A. Development of a functional fermented peanut-based cheese analog using probiotic bacteria. **Biotechnologia**, v. 99, n. 4, p. 435–441, 2018.
52. SHARMA, P.; TRIVEDI, N.; GAT, Y. Development of functional fermented whey–oat-based product using probiotic bacteria. **3 Biotech**, v. 7, n. 4, p. 1–8, 2017.
53. SHOBHARANI, P.; PRAKASH, M.; HALAMI, P. M. Probiotic *Bacillus* spp. in Soy-Curd: Nutritional, Rheological, Sensory, and Antioxidant Properties. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 10, p. M2247–M2256, 1 out. 2015a.
54. SHOBHARANI, P.; PRAKASH, M.; HALAMI, P. M. Probiotic *Bacillus* spp. in Soy-Curd: Nutritional, Rheological, Sensory, and Antioxidant Properties. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 10, p. M2247–M2256, 1 out. 2015b.
55. SHORT, E. C.; KINCHLA, A. J.; NOLDEN, A. A. Plant-based cheeses: A systematic review of sensory evaluation studies and strategies to increase consumer acceptance. **Foods**, v. 10, n. 4, 2021.
56. SILVA, N. DA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. 2017.
57. SONI, M. G. et al. **Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods**. **Food and Chemical Toxicology**, jul. 2006.
58. SURCO-LAOS, F. et al. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 514–521, 2012.

59. VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. **Food Chemistry**, v. 154, n. 2014, p. 299–307, 2014.
60. WILSON, M. A. et al. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 5, n. 1, p. 59–68, 2006.
61. XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, mar. 2007.
62. YEO, S. K.; LIONG, M. T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 267–275, 2010.
63. ZHANG, Q.; QIN, W. **Tofu and soy products: The effect of structure on their physicochemical properties**. [s.l.] Elsevier, 2018.
64. ZIELINSKA, D.; KAMINSKA, A.; KOŁOZYN-KRAJEWSKA, D. Development of tofu production method with probiotic bacteria addition. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 04, n. 06, p. 485–490, 2015.
65. ZULLO, B. A.; CIAFARDINI, G. Evaluation of physiological properties of yeast strains isolated from olive oil and their in vitro probiotic trait. **Food Microbiology**, v. 78, p. 179–187, 1 abr. 2019.