



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102019007878-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102019007878-2

(22) Data do Depósito: 17/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(51) Classificação Internacional: A23C 19/076; A23L 33/105; A23L 33/22.

(52) Classificação CPC: A23C 19/0765; A23L 33/105; A23L 33/22.

(54) Título: QUEIJO PETIT SUISSE FONTE DE FIBRAS E ANTIOXIDANTES COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 80257355000108. Endereço: AV GAL CARLOS CAVALCANTI, 4748 - UVARANAS, Ponta Grossa, PR, BRASIL(BR), 84030-900, Brasileira

(72) Inventor: DANIEL GRANATO; CAROLINA TURNES PASINI DEOLINDO; JÂNIO SOUSA SANTOS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 17/04/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 15/10/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

QUEIJO PETIT SUISSE FONTE DE FIBRAS E ANTIOXIDANTES COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA

1. A presente invenção trata da elaboração de um queijo *Petit Suisse* adicionado de extrato hidroalcoólico de semente de uva orgânica Bordô com demonstrada atividade antioxidante química e com marcante teor de compostos fenólicos totais, fonte de fibras alimentares e atividade anti-hipertensiva *in vitro*. Adicionalmente, para incrementar a atividade antioxidante no queijo *Petit Suisse*, farinha da casca e suco de uva Bordô foram adicionados, ao passo que bagaço cervejeiro foi adicionado no intuito de aumentar o teor de fibras alimentares. Desta forma, foi possível desenvolver um queijo *Petit Suisse* fonte de fibras alimentares, com elevado conteúdo fenólico e atividade antioxidante além de apresentar inibição da enzima conversora da angiotensina-I *in vitro* (atividade antihipertensiva). Para o desenvolvimento do queijo, a extração (solução hidroalcoólica) de sementes e cascas de uva orgânica Bordô foi otimizada no intuito de obter um extrato com maior teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*.

2. O mercado de laticínios brasileiro é bastante amplo e com uma diversidade de produtos, como queijos, bebidas (fermentadas ou não), sobremesas, e gelados comestíveis. Nos últimos 15 anos, com o avanço tecnológico e novas tendências de consumo da população, a indústria alimentícia passou a produzir novos produtos como o queijo tipo cottage e o queijo tipo quark. O queijo quark é obtido pela fermentação do leite pela ação do coalho e cultura mesofílica, seguida de centrifugação da coalhada para separação do soro. Após a centrifugação, o queijo quark é adicionado, opcionalmente, de creme de leite, açúcar, polpa de fruta, corantes e aromatizantes, obtendo-se então o queijo *Petit Suisse* (BRASIL, 2000).

3. O queijo *Petit Suisse* apresenta alta umidade, consistência leve, lisa e cremosa, podendo ser doce ou salgado, dependendo dos ingredientes adicionados. O público-alvo de queijo *Petit Suisse* é composto por crianças, que costumam consumir o produto como sobremesa ou lanche rápido. Entretanto, esse alimento é bem aceito e consumido por adultos. Queijos *Petit Suisse* são, normalmente, adicionados de preparações que contém polpa de frutas (morango e/ou banana), amido e outros espessantes, corantes, acidulantes, conservantes (antifúngicos), e edulcorantes artificiais. Entretanto, os consumidores modernos buscam uma alimentação mais natural, com menor ingestão de produtos químicos sintéticos, e que possam trazer algum benefício à saúde (Prudencio et al., 2008; Granato, Nunes, & Barba, 2017; Vital et al., 2018). Granato et al. (2018) enfatizam que o desenvolvimento de produtos lácteos adicionados de extratos de ervas e outros extratos naturais podem ajudar a reduzir o uso de substâncias químicas sintéticas, pois tais extratos, além de serem geralmente tidos como seguros do ponto de vista toxicológico, conferem sabor, odor e cor aos produtos lácteos. Assim, extratos vegetais e sucos de frutas devem ser mais empregados no desenvolvimento de produtos lácteos processados no intuito de diminuir ou mesmo eliminar o uso de saborizantes e corantes sintéticos.

4. Dentre as frutas que poderiam ser adicionadas em produtos lácteos, a uva se destaca pela sua composição química, pelo seu sabor e cor característicos, além de ser uma das frutas com maior produção e consumo no mundo (Margraf et al., 2016). A viticultura é presente em vários estados brasileiros, concentrando-se na região sul, com maior produção no Rio Grande do Sul, que comprehende aproximadamente 90% da produção nacional de uvas viníferas, com cerca de 78

milhões de kg de uvas processadas em 2017 (IBRAVIN, 2017). O bagaço de uva compreende cascas, sementes e engaços que são gerados do processamento de sucos e vinhos, compreendendo cerca de 20% do peso seco (Monrad et al., 2010). Ao todo, mundialmente, são produzidos cerca de 15,6 milhões de toneladas de resíduos da uva, que apresentam elevados teores de compostos fenólicos (Karnopp et al., 2015). Por apresentar teor vitamínico não significativo, o bagaço é comumente descartado como matéria orgânica, reaproveitado como fertilizantes ou em alimentação animal. Os subprodutos da produção de vinhos e sucos são uma fonte barata para a extração de compostos bioativos, em especial os fenólicos, que podem ser utilizados como suplementos antioxidantes, na produção de cosméticos, farmacêuticos ou pigmentos naturais (Barba et al., 2016).

5. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (2019), em 2018 a produção de cerveja no Brasil alcançou 14,1 bilhões de litros, movimentando 1,6% do produto interno bruto, gerando cerca de 2,7 milhões de empregos. Para a produção de cerveja, cerca de 15% de malte são utilizados, gerando quantidade apreciável de bagaço cervejeiro. O bagaço de brasagem, constituído basicamente das cascas de cevada malteada, é o principal subproduto da indústria cervejeira. Atualmente, a tonelada do bagaço cervejeiro custa R\$ 70 e é utilizado, usualmente, para nutrição animal. Este bagaço provém do processo de obtenção do mosto, pela fervura do malte moído e dos adjuntos, que após a filtração é o resíduo do processo (Socaci et al., 2018). Sabendo que este coproducto apresenta alguns compostos fenólicos, como os ácidos ferúlico, *p*-coumárico, e siríngico, pesquisadores têm estudado formas de aproveitar tais compostos de forma a diminuir a taxa de resíduos desperdiçados (Socaci et al., 2018). Os coprodutos

também podem ser aplicados diretamente em matrizes alimentares como fonte de antioxidantes e fibras.

6. Por meio da pesquisa realizada acerca da anterioridade no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e por meio da Classificação Internacional de Patentes, IPC, usando os códigos A23C 21/00; A23C 19/032; A23C 21/02; A21D 8/04 usando as palavras chave: *Petit Suisse*; Queijo quark; *Petit Suisse* funcional; Queijo funcional; Sobremesa Anti-hipertensiva; Uva Bordô; Sobremesa com fenólicos; Queijo antioxidante; *Petit Suisse* com fenólicos, foram encontradas apenas uma anterioridade a cada código de busca utilizado. Porém nenhum registro encontrado (BR 10 2015 005707 5 A2; BR 10 2015 025575 6 A2; PI 9606405-6 A2; BR 10 2016 002941 4 A2) refere-se ao desenvolvimento de uma formulação de queijo *Petit Suisse* adicionada de extrato hidroalcoólico de semente de uva orgânica Bordô que apresente compostos antioxidantes naturais, ou que seja fonte de fibras alimentares e que apresente atividade anti-hipertensiva *in vitro*. Assim, fica notório que o setor de alimentos precisa inovar e usar coprodutos agroindustriais para desenvolver novos alimentos potencialmente funcionais, especialmente os laticínios, pois são amplamente consumidos em todas as faixas etárias no Brasil.

7. Assim sendo e verificando a necessidade de inovação tecnológica, a presente proposta abrange essa vertente, contribuindo tanto para o conhecimento científico quanto para as aplicações tecnológicas de coprodutos agroindústrias do processamento de uva e da produção de cerveja. Essas justificativas também se aliam à necessidade de desenvolvimento de novos alimentos lácteos que contenham compostos fenólicos e fibras alimentares. Portanto, a presente invenção

contempla o desenvolvimento de um queijo *Petit Suisse* adicionado de bagaço cervejeiro e de extrato da casca e semente de uva orgânica (*Vitis labrusca* cv. Bordô) tornando-se assim um produto potencialmente funcional e com características sensórias desejáveis.

8. Inicialmente estudou-se a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de semente e casca de uva bordô e bagaço cervejeiro frente ao radical 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH). Para esse fim, o teor de álcool a ser utilizado nas extrações dos compostos funcionais das cascas e sementes de uva e do bagaço cervejeiro, foi avaliado pela realização de extração com seis soluções (água/álcool etílico nas seguintes proporções [v/v]: 100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80, e 0/100). Uma relação amostra:solução extratora de 1:50 (m/v) foi empregada e as extrações foram realizadas em banho ultrassônico (305 W, 50/60 Hz) por 1 h a 25 °C. A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos foi avaliada pelo método de DPPH proposto por Brand-Williams et al. (1995) e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g (mg AAE/100 g). Esse ensaio permitiu a identificação da relação água:álcool etílico que apresentou maior capacidade antioxidante. Para isso, análise de variâncias unifatorial seguida do teste de Fisher ($p<0,05$) foram empregados e os resultados demonstraram que o bagaço cervejeiro apresentou a menor atividade antioxidante entre os três coprodutos. Esses resultados nos permitem concluir que o bagaço cervejeiro avaliado não é fonte de antioxidantes. Por outro lado, a semente de uva (3637 ± 4 mg AAE/100 g) e a casca de uva (1033 ± 10 mg AAE/100 g) extraídas com uma solução etanólica (60% v/v) apresentaram a maior atividade antioxidante, como mostra a Tabela 1. Conclui-se,

portanto, que a solução com 60% de álcool etílico extraiu a maior quantidade média de compostos antioxidantes em casca e semente de uva bordô.

Tabela 1: Valores de atividade antioxidante pela captura do radical DPPH contra as soluções etanólicas para cada composto analisado.

	Semente de uva (mg AAE/100 g)	Casca de uva (mg AAE/100 g)	Bagaço cevada (mg AAE/100 g)
Etanol (%)			
0	1614 ± 31 ^e	364 ± 13 ^c	0 ± 0 ^d
20	2498 ± 9 ^c	914 ± 16 ^b	0 ± 0 ^d
40	2239 ± 21 ^d	867 ± 32 ^b	22 ± 1 ^b
60	3637 ± 4 ^a	1033 ± 10 ^a	17 ± 1 ^c
80	3241 ± 2 ^b	865 ± 29 ^b	35 ± 3 ^a
100	2702 ± 24 ^c	358 ± 31 ^c	1 ± 0 ^d

9. A partir disso, casca e semente de uva bordô foram submetidas a um estudo químico-funcional mais detalhado no intuito de avaliar qual proporção entre tais coprodutos maximizaria a extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*. Para tanto, sete diferentes proporções (g/100 g) entre casca e semente de uva foram estudadas segundo um planejamento experimental completamente casualizado de modo a testar a relação casca/semente (m/m) de 100/0, 0/100, 33/67, 67/33, 75/25, 25/75 e 50/50. As extrações foram realizadas por meio de 1 g do material vegetal em contato com 50 mL de álcool etílico 60%, em banho ultrassônico (305 W, 50/60 Hz) por 1 h a 25 °C. Todos os extratos foram analisados em triplicata quanto ao conteúdo fenólico total pelo método do Azul da Prússia (Margraf et al., 2015), flavonoides totais quantificados pelo método proposto por Herald, Gadgil e Tilley (2012), taninos condensados determinados segundo Horszwald e Andlauer (2011), flavonóis totais quantificados pela metodologia descrita por Yermakov et al. (1987), *ortho*-difenólicos estimados segundo Durán et al.

(1991) e antocianinas monoméricas totais quantificadas pelo método de pH diferencial (Lee et al., 2005). Os resultados da composição fenólica total foram expressos em mg/100 g. A capacidade antioxidante dos extratos foi medida pela captura do radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995), capacidade de redução de íon férreo (FRAP) segundo Benzie e Strain (1996), capacidade redutora total (CRT) pelo método proposto por Berker et al. (2013) e capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu (FCRC) de acordo com Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventós (1999) e os resultados expressos em mg ácido ascórbico equivalente por 100 g (FRAP, DPPH), mg ácido gálico equivalente/100 g (FCRC) e mg quercetina equivalente por 100 g (CRT). Os resultados foram submetidos a análise de variâncias unifatorial seguida do teste de Fisher ($p<0,05$) para estabelecer o extrato com maior atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos. Os resultados da composição fenólica e atividade antioxidante estão descritos na Tabela 2. Os resultados deixaram claro que a amostra composta por 100% de semente apresentou o maior ($p<0,05$) conteúdo fenólicos total 3886 ± 124 mg de ácido gálico equivalente por 100 g, flavonoides totais 6736 ± 276 mg (+)-catequina equivalente por 100g, flavonóis totais 215 ± 13 mg quercetina equivalente por 100 g, *orto*-difenóis 1260 ± 8 mg ácido clorogênico por 100 g e taninos condensados 10635 ± 753 mg (+)-catequina equivalente por 100 g. Já o conteúdo de antocianinas monoméricas foi maior na amostra composta por 100% de casca de uva 1054 ± 10 malvidina-3-glicosídeo equivalente por 100 g, tal resultado é esperado tendo em vista a presença de antocianinas ser característica dessa parte da fruta. Em relação à atividade antioxidante, o extrato com 100% da semente de uva bordô apresentou os maiores valores médios ($p<0,05$) em relação às outras combinações de casca e semente de

uva: DPPH = 12872±64 mg AAE/100 g, FRAP = 7733±58 mg AAE/100 g, TRC = 6774±218 mg QE/100 g e FCRC = 4726±2244 mg ácido gálico equivalente por 100 g. Tendo em vista os resultados obtidos, variando a proporção de cascas e semente de uva na extração, apresentarem maiores concentrações de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante para a amostra com apenas semente de uva, a semente de uva orgânica bordô foi escolhida como matriz para a elaboração do extrato composto por água e álcool etílico a 60% (v/v). A farinha da casca de uva passou então a ser adicionada como corante natural do queijo e também por adicionar fibras alimentares. Similarmente, o bagaço cervejeiro foi adicionado à formulação do queijo *Petit Suisse* para incrementar o teor de fibras alimentares no queijo desenvolvido.

Tabela 2: Compostos fenólicos e atividade antioxidante para diferentes proporções de casca e semente de uva orgânica Bordô.

Casca/ Semente (%)	Compostos Fenólicos totais	Flavonoides totais	Antocianinas monoméricas totais	ortho-Difenóis	Flavonóis totais	Taninos condensados	DPPH	FRAP	CRT	Capacidade Redutora do Folin-Ciocalteu
	(mg AGE/100 g)	(mg CE/100 g)	(mg/100 g)	(mg CAE/100 g)	(mg QE/100 g)	(mg CE/100 g)	(mg AAE/100 g)	(mg AAE/100 g)	(mg QE/100 g)	(mg AGE/100 g)
100/0	1546±53 ^e	1504±99 ^g	1054±10 ^a	609±10 ^f	122±4 ^d	4656±201 ^c	3177±15 ^g	2627±36 ^g	1664±98 ^e	2048±43 ^f
0/100	3886±124 ^a	6736±276 ^a	60±14 ^g	1260±9 ^a	215±13 ^a	10635±753 ^a	12872±64 ^a	7733±58 ^a	6774±218 ^a	4726±245 ^a
33/67	3410±169 ^b	5353±321 ^c	375±8 ^e	962±1 ^c	199±6 ^b	8489±491 ^b	10190±61 ^b	6014±75 ^c	5511±90 ^b	3720±135 ^c
67/33	2403±151 ^d	3437±75 ^e	665±12 ^c	766±1 ^e	143±5 ^c	8479±438 ^b	4334±96 ^f	4619±64 ^e	3206±120 ^d	3305±118 ^d
75/25	2263±61 ^d	2886±37 ^f	754±28 ^b	751±9 ^e	142±7 ^c	7521±368 ^b	5373±88 ^e	4028±92 ^f	3206±155 ^d	3035±43 ^e
25/75	3594±179 ^b	6209±71 ^b	311±5 ^f	1124±1 ^b	185±8 ^b	10385±720 ^a	8695±112 ^c	6652±275 ^b	5477±418 ^b	4091±238 ^b
50/50	2691±58 ^c	4471±177 ^d	511±7 ^d	918±0 ^d	183±14 ^b	10552±774 ^a	7226±52 ^d	5327±105 ^d	4724±55 ^c	3841±41 ^{bc}
P-valor ¹	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Nota: ¹Valores de probabilidade obtidos por análise de variâncias unifatorial. Letras diferentes na mesma coluna representam valores estatisticamente

diferentes ($p<0,05$).

10. O extrato de semente de uva extraído com álcool etílico a 60% (v/v) foi liofilizado e caracterizado em relação à sua composição fenólica, atividade antihipertensiva e atividade antioxidante *in vitro*. O teor de antocianinas monoméricas, fenólicos totais, compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta performance usando arranjo de diodos e detector de fluorescência, e atividade antioxidante (FCRFC, DPPH e FRAP) do extrato de semente de uva e do suco de uva orgânica foram analisados. O suco de uva orgânica Bordô (fenólicos totais 597 ± 15 mg AGE/L) apresentou elevada concentração de malvidina-3,5-diglicosídeo, (-)-epicatequina e 3,4 ácido dihidroxibenzóico ($116,84\pm0,22$, $130,18\pm0,33$ e $90,67\pm0,66$ mg/L, respectivamente). O extrato de semente de uva apresentou elevada concentração de fenólicos totais (13643 ± 690 mg AGE/100 g), principalmente de antocianinas monoméricas, ácido gálico e 2,4-ácido-dihidroxibenzóico (84 ± 8 , $262,26\pm18,33$ e $110,64\pm0,48$ mg/100 g de extrato, respectivamente). Tendo em vista a maior concentração de compostos fenólicos no extrato de semente de uva, os resultados correspondentes para a atividade antioxidante (FRAP, DPPH e FCRC) (13190 ± 563 mg AAE/L, 7033 ± 382 mg AAE/L e 9680 ± 698 mg GAE/L) são maiores que a do suco de uva orgânica Bordô (1393 ± 49 mg AAE/L, 370 ± 19 mg AAE/L e 961 ± 29 mg GAE/L) (Tabela 3).

Tabela 3: Composição fenólica e atividade antioxidante do suco de uva orgânica Bordô e do extrato otimizado de semente de uva Bordô.

Compostos fenólicos	Suco de uva orgânica Bordô (mg/L)	Extrato otimizado de semente de uva Bordô (mg/100 g)
Delfnidina-3-glicosídeo	$34,38\pm0,17$	$0,93\pm0,03$
Malvidina-3-glicosídeo	$5,04\pm0,05$	$0,49\pm0,02$
Cianidina-3-glicosídeo	$2,96\pm0,04$	$0,37\pm0,00$

Malvidin-3,5-diglucosídeo	116,84±0,22	3,09±0,01
Ácido 2,5-dihidroxibenzólico	5,45±0,57	12,82±0,47
Ácido 2,4-dihidroxibenzólico	ND	110,64±0,48
3,4 ácido dihidroxibenzólico	90,67±0,66	ND
Ácido siríngico	ND	56,45±2,16
Ácido clorogênico	ND	50,25±11,03
Ácido gálico	19,30±0,12	262,26±18,33
Ácido 2-hidroxycinâmico	6,20±1,83	13,70±0,77
Ácido <i>p</i> -cumárico	51,27±1,39	ND
Ácido elágico	15,25±2,42	2,83±0,83
Ácido cafeico	4,61±0,08	ND
Ácido ferúlico	41,81±2,48	ND
Quercetina	0,32±0,00	0,17±0,01
Rutina	27,15±0,54	2,01±0,30
(+)-Catequina	1,18±0,00	3,74±0,07
(-)-Epicatequina	130,18±0,33	6,64±0,26
<i>trans</i> -Resveratrol	0,50±0,02	0,18±0,01
Procianidina A2	5,80±0,85	ND
Teor de fenólicos totais	597±15	13643±690
Antocianinas monoméricas totais	179±1	84±8
FRAP	1393±49	13190±563
FCRC	961±29	9680±698
DPPH	370±19	7033±382

Nota: O conteúdo fenólico total e a capacidade redutora de Folin-Ciocalteu (FCRC) são expressos em equivalente de ácido gálico.

FRAP e DPPH são expressos como equivalentes de ácido ascórbico.

11. O *Petit Suisse* foi elaborado com leite bovino integral pasteurizado proveniente da Fazenda Escola Capão da Onça (UEPG). Ao leite pasteurizado foram adicionados 0,1 g/100 mL de fermento mesofílico composto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 0,02 g/100 g de cloreto de cálcio e 0,01 g/100 g de coalho, em seguida o leite foi homogeneizado. Deixou-se inocular por 18 h a 35 °C, a coalhada foi então quebrada e agitada lentamente por 15 min. Pela suspensão da massa, sob refrigeração, o soro foi então drenado, por ação da gravidade até pH = 4,3±0,1 por 12 h, em tecido de algodão previamente esterilizado. À massa foram adicionados açúcar de coco (13 g/100 g), creme de leite (15 g/100 g), bagaço

cervejeiro (1 g/100 g), casca de uva (3 g/100 g) para aumentar teor de fibra e enaltecer a coloração do produto, suco de uva (16 g/100 g) como saborizante e agente de cor, e extrato hidroalcoólico de semente de uva liofilizado (ESU) (0,5 g/100 g). Para avaliar os parâmetros desejados três formulações foram preparadas, de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Formulações de queijo *Petit Suisse* preparadas.

	Extrato hidroalcoólico de semente de uva Bordô	Suco de uva Bordô	Casca de uva Bordô	Bagaço cervejeiro	Açúcar de coco	Creme de leite
	0,5 g/100 g	16 g/100 g	3 g/100 g	1 g/100 g	13 g/100 g	15 g/100 g
Queijo <i>Petit Suisse</i> com adição de ESU	+	+	+	+	+	+
Queijo <i>Petit Suisse</i> sem adição de ESU	-	+	+	+	+	+
Queijo <i>Petit Suisse</i> controle negativo	-	-	-	+	+	+

Nota: Sinais + indicam a adição do ingrediente à formulação, sinais – indicam a ausência do ingrediente à formulação. ESU = extrato de semente de uva.

12. Para estabelecer a composição proximal do *Petit Suisse* adicionado de extrato hidroalcoólico de semente de uva, foram utilizados os métodos AOAC (2006) para teores de cinzas (método 923-03), proteínas (método 920-87; N x 6,38), umidade (método 925-09), fibras alimentares (método 958.29) e lipídeos totais (método Soxhlet). O *Petit Suisse* elaborado apresentou 37,29 g/100 g de carboidratos totais, 0,79±0,10 g/100 g de cinzas, 8,26±0,15 g/100 g de proteínas, 4,65±0,22 g/100 g de fibras alimentares e 14,00±0,30 g/100 g de lipídeos totais. Quando comparado a produtos comerciais brasileiros, o presente produto apresenta maior teor de proteínas, lipídeos totais e fibras alimentares: Queijo *Petit Suisse*

comercial 1 – 5,8 g/100 g de proteínas, 2,8 g/100 g de lipídeos totais, 18,5 g/100 g de carboidratos totais e 0 g/100 g de fibras alimentares; Queijo *Petit Suisse* comercial 2 – 4,7 g/100 g de proteínas, 5,8 g/100 g de lipídeos totais, 21,1 g/100 g de carboidratos totais e 0 g/100 g de fibras alimentares. No produto elaborado, as fibras alimentares são oriundas das cascas de uva e do bagaço cervejeiro adicionados à formulação. A legislação brasileira vigente (Brasil, 2012) considera um produto como “fonte de fibras” com no mínimo 3 g/100 g de fibra alimentar, portanto o queijo *Petit Suisse* desenvolvido pode ser considerado “fonte de fibras alimentares”, destacando-se dos demais produtos comerciais nessa categoria.

13. As formulações de queijo elaboradas e o extrato otimizado foram analisados segundo à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA-I), de acordo com o método proposto por Ramchandran and Shah (2010), utilizando 10 gramas de amostra para extração. O extrato de semente de uva obtido apresentou inibição de 81,60% da ECA-I e o queijo *Petit Suisse* com o extrato apresentou 76,91% de inibição da ECA-I, enquanto que o queijo *Petit Suisse* preparado sem o extrato de semente de uva (elaborado com adição de casca e suco em sua massa) apresentou uma inibição de 38,18% da ECA-I (**Figura 1**). O resultado mostra que o processamento mantém alta inibição da atividade da ECA-I no *Petit Suisse*. Estes resultados estão relacionados com a composição fenólica do extrato, que é composta principalmente de ácido 2,4-di-hidroxibenzólico e ácido gálico, bem como (-)-epicatequina, (+)-catequina que estão mais relacionados com a inibição da enzima conversora da angiotensina-I segundo vários autores. A ECA-I é uma metaloproteína que catalisa a hidrólise do decapeptídeo angiotensina-I e produz o octapeptídeo angiotensina-II, responsável pelo aumento da pressão arterial, por isso

a inibição da enzima ECA-I é considerada uma abordagem útil para diminuir o risco e até diminuir o risco da hipertensão e doenças associadas (Liu et al., 2018).

14. Para avaliar a aceitação do produto elaborado foi efetuado a análise sensorial dos queijos *Petit Suisse* com e sem adição do extrato de semente de uva. O procedimento adotado para a avaliação sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 65493717.9.0000.0105). Os dois queijos foram avaliados de acordo com o grau de aceitação de odor, textura, consistência, aparência e aceitação global usando uma escala hedônica de 9 pontos (1= desgostei extremamente; 5= indiferente; 9= gostei extremamente) (ISO, 2014). Ambos os queijos não apresentaram *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e coliformes a 45 °C apresentou-se <3 NMP/25 g. Cada formulação foi avaliada por 101 provadores não treinados distintos, totalizando 202 respostas (57% mulheres e 43% homens, 18-59 anos). Os resultados obtidos mostram que a aceitabilidade do queijo *Petit Suisse* fabricados com e sem o extrato liofilizado de semente de uva foram de 73% e 71% ($p=0,745$), respectivamente (**Figura 2**). Pode-se afirmar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a aceitabilidade entre as amostras, evidenciando que o extrato de semente de uva não interfere na aceitabilidade do queijo *Petit Suisse*. Esse resultado é desejado pela indústria alimentícia, pois apesar das propriedades antioxidantes, alterações sensoriais podem causar rejeição de produtos.

Descrição das Figuras

Figura 1: Inibição da atividade inibitória da enzima de conversão da angiotensina I (ACE) do extrato hidroalcoólico de semente de uva, um queijo *Petit Suisse* sem adição de qualquer ingrediente derivado de uva (controle) e queijos *Petit Suisse* com ou sem GSE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as amostras de acordo com o teste de Fisher.

Figura 2: Média das notas atribuídas pelos avaliadores para os parâmetros avaliados de acordo com escala hedônica para o queijo *Petit Suisse* com adição de extrato e queijo *Petit Suisse* sem adição de extrato.

15. Os avaliadores também foram questionados se consideram o queijo *Petit Suisse* como saudável ou não, e informaram quanto a mais pagariam por um produto *Petit Suisse* rico em compostos antioxidantes naturais usando uma escala estruturada (não pagaria nada a mais; R\$ 1,50 a mais; R\$ 2,00 a mais; R\$ 2,50 a mais, R\$ 3,00 a mais – US\$ 1 = R\$ 3,89) e por um produto *Petit Suisse* fonte de fibras (não pagaria nada a mais; R\$ 1,50 a mais; R\$ 2,00 a mais; R\$ 2,50 a mais, R\$ 3,00 a mais) em comparação ao preço convencional de mercado (R\$ 0,73 ± 0,10) de um queijo *Petit Suisse* tradicional de 50 g. Dos 202 avaliadores, 78% consideram o *Petit Suisse* um produto saudável (86% dos homens e 64% das mulheres), e 48% e 34% dos avaliadores pagariam pelo menos R \$ 1,50 e R \$ 2,00 a mais por um Queijo *Petit Suisse* adicionado com antioxidantes naturais, respectivamente. Além disso, 50% e 27% pagariam R \$ 1,50 e R \$ 2,00 a mais por um queijo *Petit Suisse* adicionado de fibras, respectivamente. Esses dados mostram a tendência do consumidor de valorizar produtos com um potencial funcional claro.

16. Para avaliar os queijos em relação ao efeito da estocagem refrigerada, durante 28 dias, com intervalos de sete dias, os queijos foram analisados quanto a atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais, pH, acidez total titulável, sinérese em centrífuga rotativa, sólidos solúveis usando refratômetro de mão e textura avaliando firmeza e consistência. Preliminarmente, 10 g de queijo *Petit Suisse* foram extraídos com 10 mL de álcool metílico, a 25 °C, com uso de um vortex, por 5 min. A suspensão foi centrifugada (8.000 g/10 min) e o sobrenadante retirado e analisado imediatamente. Verificou-se que a acidez diminuiu

com aumento do pH, e não houve mudança significativa na umidade, sinérese, sólidos solúveis, e textura do *Petit Suisse* adicionado de extrato de semente de uva ao longo dos 28 dias de monitoramento (Tabela 5). Verificou-se diferença significativa ($p<0,05$) no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (FRAP, DPPH) para todas as amostras e dias analisados (Tabela 6). Evidenciou-se ausência de atividade antioxidante e fenólicos totais nas amostras controle (sem adição de suco e extrato de uva) e na amostra comercial, resultado que demonstra a ausência de ingredientes potencialmente antioxidantes.

Tabela 5: Características físico-químicas do *Petit Suisse* adicionado de extrato de semente de uva sob efeito refrigerado por 28 dias.

	Acidez (g/100 ácido lático)	pH	Sinérese (% soro)	Sólidos solúveis (° Brix)	Umidade (g/100 g)	Firmeza (g)	Consistência (g.s)
Dia 0	1,64±0,12 ^{ab}	3,58±0,03 ^d	24±1 ^c	12±0 ^d	35±0	746±42 ^b	15615±994 ^c
Dia 7	1,84±0,23 ^a	3,71±0,02 ^c	37±1 ^a	15±0 ^{bc}	35±0	556±69 ^c	13487±1609 ^c
Dia 14	1,31±0,19 ^{bc}	3,68±0,02 ^c	28±1 ^b	19±1 ^a	35±0	839±37 ^b	2046±1311 ^{ab}
Dia 21	0,83±0,07 ^d	3,89±0,02 ^b	31±0 ^b	16±0 ^b	35±1	991±53 ^a	22695±2279 ^a
Dia 28	1,11±0,17 ^{cd}	4,02±0,01 ^a	30±1 ^b	15±1 ^c	34±2	839±61 ^b	19563±1356 ^b
P-valor ¹	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,244	p<0,001	p<0,001

Nota: ¹Valores de probabilidade obtidos por análise de variância unifatorial. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre as amostras ao nível de 5%.

Tabela 6: Composição fenólica e atividade antioxidante do *Petit Suisse* adicionado de extrato de semente de uva e o queijo *Petit Suisse* controle (sem extrato) sob efeito refrigerado por 28 dias.

	Petit Suisse cheeses	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	P-valor ¹
Fenólicos totais (mg AGE/100 g)	Sem extrato*	17±0 ^{aA}	12±0 ^{cB}	12±0 ^{dB}	13±0 ^{bB}	9±0 ^{eB}	p < 0,001
	Com extrato**	17±0 ^{aB}	16±0 ^{aA}	16±0 ^{bA}	14±0 ^{cA}	10±0 ^{dA}	p < 0,001
	Controle***	0	0	0	0	0	NA
	Comercial****	0	0	0	0	0	NA
P-valor ¹		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
FRAP (mg AAE/100 g)	Sem extrato*	44±0 ^{bA}	50±2 ^{aA}	34±1 ^{cB}	36±1 ^{cB}	35±2 ^{cB}	p < 0,001
	Com extrato**	45±1 ^{aA}	38±0 ^{bB}	37±1 ^{bA}	43± ^{aA}	38±1 ^{bA}	p < 0,001
	Controle***	0	0	0	0	0	NA
	Comercial****	0	0	0	0	0	NA

P-valor ¹		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p < 0,001
DPPH (mg AAE/100 g)	Sem extrato*	8±1 ^{bA}	10±1 ^{aA}	6±0 ^{cB}	10±0 ^{aA}	11±0 ^{aB}	p < 0,001
	Com extrato**	6±0 ^{cB}	9±0 ^{abB}	7±0 ^{cA}	10±0 ^{aA}	12±0 ^{aA}	p < 0,001
	Controle***	0	0	0	0	0	NA
	Comercial****	0	0	0	0	0	NA
P-valor ¹		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	

Nota: ¹Valores de probabilidade obtidos por análise de variância unifatorial. * Queijo *Petit Suisse* com casca de uva, com suco de uva e sem extrato hidroalcoólico de semente de uva; ** Queijo *Petit Suisse* com casca de uva, com suco de uva e com extrato hidroalcoólico de semente de uva; *** Queijo *Petit Suisse* sem casca de uva, sem suco de uva e sem extrato hidroalcoólico de semente de uva; **** Queijo *Petit Suisse* preparado de morango – Produto comercial. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística em relação ao período de armazenamento ao nível de 5%; Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre as amostras ao nível de 5%; NA=Não aplicável.

Referências

Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. (2019). Dados do setor cervejeiro nacional. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/. Acesso em 16 abril 2019.

BARBA, F. J., ZHU, Z., KOUBAA, M., SANT'ANA, A. S., & ORLIEN, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends Food Science and Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016.

BENZIE, I. F. F., & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERKER, K. I., OLGUN, F. A. O., OZYURT, D., DEMIRATA, B., APAK, R. Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4783-4791, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. Use of free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. Instrução normativa nº 53, de 29 de dezembro de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo *Petit Suisse*. 2000.

DURÁN, R. M., PADILLA, R. B., MARTÍN, A. M., UR SINOS, J. A. F., & MENDOZA, J. A. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. **Grasas y Aceites**, v. 42, n. 4, p. 271-276, 1991.

GRANATO, D., NUNES, D. S., & BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 13-22, 2017.

GRANATO, D., SANTOS, J. S., SALEM, R. D.S., MORTAZAVIAM, A. M., ROCHA, R. S., & CRUZ, A. G. Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. **Current Opinion in Food Science**, p. 19, v. 1-7, 2018

HERALD, T. J., GADGIL, P., & TILLEY, M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2326-2331, 2012.

HORSZWALD, A., & ANDLAUER, W. Characterization of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, p. 189–199, 2011.

IBRAVIN. Evolução da quantidade de uvas processadas pelas empresas do RS (milhões de kg). *IBRAVIN, MAPA, SEAPI-RS - Cadastro Vinícola*. 2017

KARNOOPP, A. R., FIGUEROA, A. M., LOS, P. R., TELES, J. C., SIMÕES, D. R. S., BARANA, A. C., KUBIAKI, F. T., OLIVEIRA, J. G. B., & GRANATO, D. Effects of whole-wheat flour and Bordô grape pomace (*Vitis labrusca* L.) on the sensory, physicochemical and functional properties of cookies. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 750-756, 2015.

LEE, J., DURST, R. W., & WROLSTAD, E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colourants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 1269–1278, 2005.

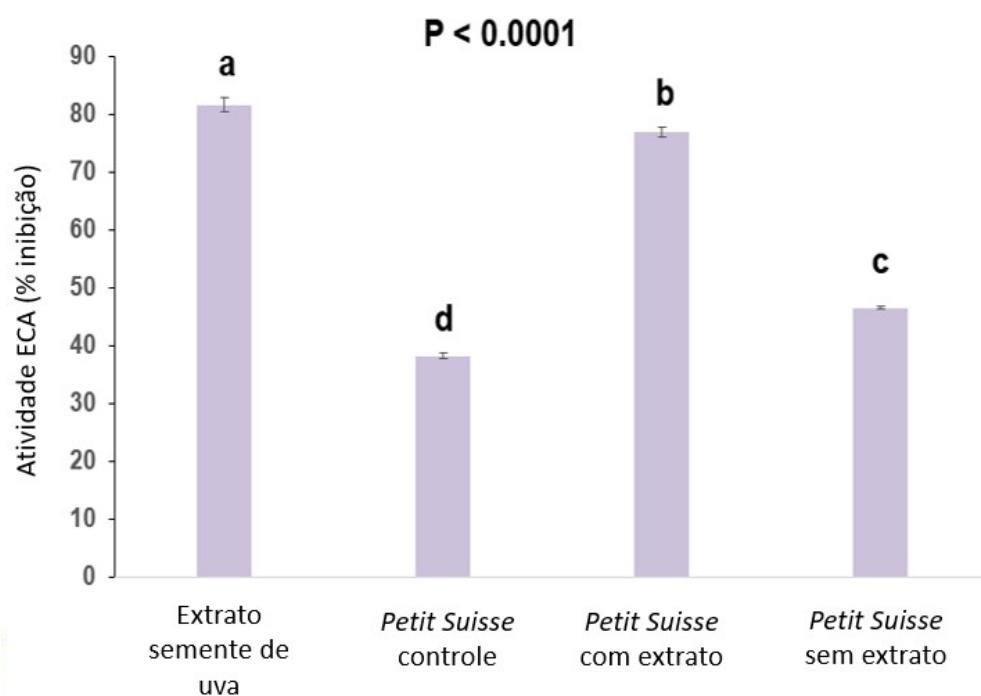
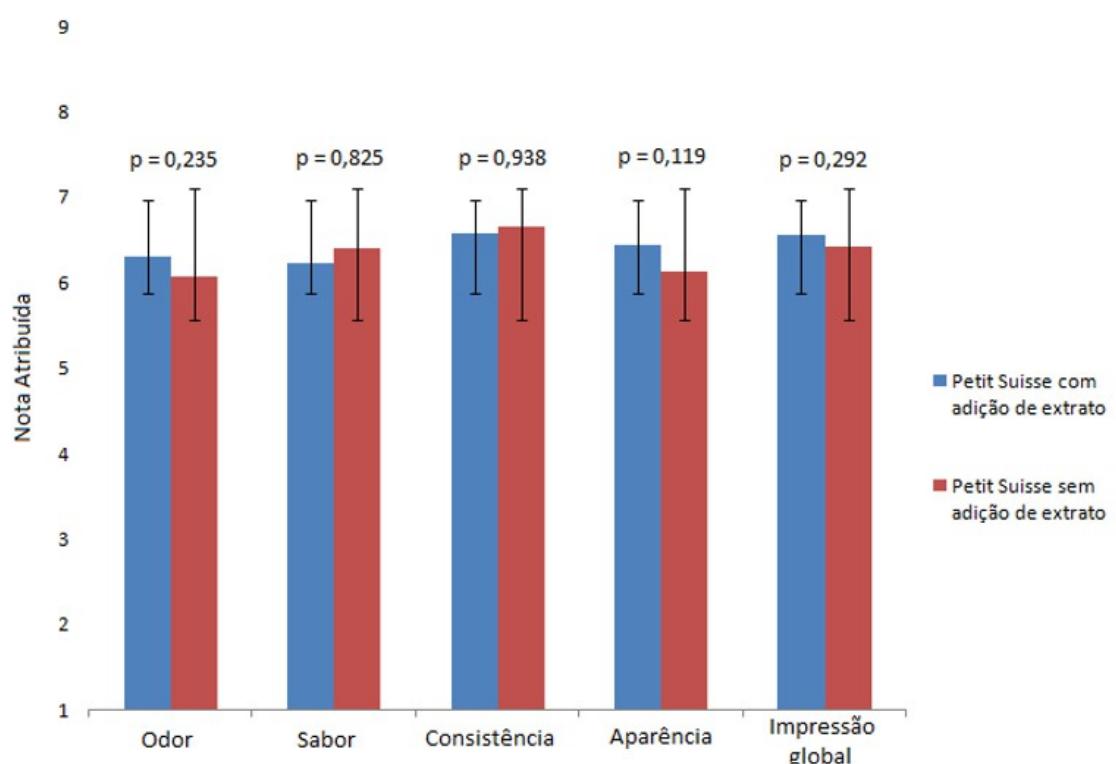
LIU, C., FANG, L., MIN, W., LIU, J., & LI, H. Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). **Food Chemistry**, v. 245, p. 471-480, 2018.

MARGRAF, T., KARNOOPP, A.R., ROSSO, N.D., & GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. **Journal of Food Science**, v. 80 n. 11, p. 2397–2403, 2015.

- MARGRAF, T., SANTOS, E. N. T., DE ANDRADE, E. F., VAN RUTH, S. M., & GRANATO, D. Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and *in vitro* antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. **Food Research International**, v. 82, p. 145-155, 2016.
- MONRAD, J. K., HOWARD, L.R., KING, J. W., SRINIVAS, K., & MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2862–2868, 2010.
- PRUDENCIO, I. D., PRUDÊNCIO, E. S., GRIS, E. F., TOMAZI, T., & BORDIGNON-LUIZ, M. T. *Petit Suisse* manufactured with cheese retentate and application of betalains and anthocyanins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 905 – 910, 2008.
- RAMCHANDRAN, L., & SHAH, P. N. Characterization of functional, biochemical and textural properties of symbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 819–827, 2010.
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SOCACI, S. A., FĂRCAS, A. C., DIACONEASA, Z. M., VODNAR, D. C., RUSU, B., & TOFANĂ, M. Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain. **Journal of Cereal Science**, v. 80, p. 180-187, 2018.
- VITAL, A. C. P., SANTOS, N. W., MATUMOTO-PINTRO, A. T., SCAPIM, M. R. S., & MADRONA, G. S. Ice cream supplemented with grape juice residue as a source of antioxidants. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 1, p. 183 – 189, 2018.
- YERMAKOV, A. I., ARASIMOV, V. V., & YAROSH, N. P. Methods of biochemical analysis of plants. **Leningrad: Agropromizdat**, 1987.

REIVINDICAÇÕES

1. QUEIJO PETIT SUISSE FONTE DE FIBRAS E ANTIOXIDANTES COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA, **caracterizado por** apresentar a seguinte composição qualitativa e quantitativa: leite bovino integral pasteurizado e fermentado; fermento mesofílico na quantidade de 0,1 g/100 mL, composto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*; cloreto de cálcio na quantidade de 0,02 g/100 g; coalho na quantidade de 0,01 g/100 g; açúcar de coco na quantidade de 13 g/100 g; creme de leite na quantidade de 15 g/100 g; bagaço cervejeiro na quantidade de 1 g/100 g; casca de uva na quantidade de 3 g/100 g; suco de uva Bordo roxa orgânico na quantidade de 16 g/100 g; e extrato hidroalcoólico (60:40 etanol:água v/v) de semente de uva Bordo liofilizado (ESU) na quantidade de 0,5 g/100 g.
2. QUEIJO PETIT SUISSE FONTE DE FIBRAS E ANTIOXIDANTES COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar uma concentração de fibras alimentares variando de 24 a 67 g/100 g na formulação, compatível com a quantidade total de ingredientes especificados na reivindicação 1.
3. QUEIJO PETIT SUISSE FONTE DE FIBRAS E ANTIOXIDANTES COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** apresentar uma atividade anti-hipertensiva entre 60% e 80% de inibição da enzima conversora da angiotensina I em ensaio in vitro, decorrente da formulação e concentração de fibras descritas nas reivindicações anteriores.

**Figura 1****Figura 2**