

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

FERNANDA RODRIGUES LEITE ROLIM

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUEIJO DE
COALHO CAPRINO NA SOBREVIVÊNCIA DE UMA
NOVA CEPA COM POTENCIAL PROBIÓTICO

JOÃO PESSOA - PB

2015

FERNANDA RODRIGUES LEITE ROLIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUEIJO DE
COALHO CAPRINO NA SOBREVIVÊNCIA DE UMA
NOVA CEPA COM POTENCIAL PROBIÓTICO**

JOÃO PESSOA - PB

2015

FERNANDA RODRIGUES LEITE ROLIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUEIJO DE
COALHO CAPRINO NA SOBREVIVÊNCIA DE UMA
NOVA CEPA COM POTENCIAL PROBIÓTICO**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Ramos do E. Queiroga

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Elieidy Gomes de Oliveira

JOÃO PESSOA - PB

2015

R748a Rolim, Fernanda Rodrigues Leite.

Avaliação do efeito protetor de queijo de coalho caprino na sobrevivência de uma nova cepa com potencial probiótico / Fernanda Rodrigues Leite Rolim.- João Pessoa, 2015.

69f. : il.

Orientadora: Rita de Cássia Ramos do E. Queiroga

Coorientadora: Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT

FERNANDA RODRIGUES LEITE ROLIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUEIJO DE COALHO CAPRINO
NA SOBREVIVÊNCIA DE UMA NOVA CEPA COM POTENCIAL
PROBIÓTICO**

Dissertação aprovada em 06 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Ramos do E. Queiroga - PPGCTA/CCS/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani - PPGCTA/CT/UFPB
Examinador Interno

Prof. Dr. Juscelio Donizete Cardoso - PGBCM/UFPB
Examinador Externo

Aos meus pais e meu irmão,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por permitir a realização desse curso, pela proteção, saúde e por está presente em minha vida em todos os momentos.

Aos meus pais, José Leite Rolim e Nely Rolim, pelo apoio afetivo, financeiro e por me incentivarem sempre em busca da minha formação intelectual e profissional; obrigada por sempre me ensinarem o caminho do bem. Devo tudo que sou a vocês.

Ao meu irmão, Fernando Rolim, pelo carinho, incentivo e amizade.

À minha cachorrinha Luma, que é considerada um membro da família e é minha companheira e amiga que tornou meus momentos durante o período do Mestrado mais felizes, ao sempre me receber com alegria infinita ao fim do dia, e menos solitários, principalmente, durante as madrugadas de estudos.

Aos meus parentes, pelo apoio e incentivo, em especial à minha madrinha e tia Zélia por cuidar de mim enquanto longe da minha família.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Rita Queiroga, pela colaboração intelectual e emocional e pela disposição em sanar qualquer dificuldade durante a execução deste trabalho. Obrigada pela confiança e amizade, pelos incentivos nos momentos de estresses e, não poderia deixar de mencionar, pelos biscoitos e cafezinhos que abrandaram a fome em dias de experimento!

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Elieidy, pela dedicação, confiança, auxílio, paciência (e muita!!) e pela profissional competente, um exemplo a ser seguido!

À Prof^a Dr^a Marciane, pela dedicação ao artigo e por ser sempre tão solícita.

À Prof^a Dr^a Lúcia da Conceição, pelos ensinamentos e juntamente com o Prof. Dr. Evandro Leite por permitirem a execução dos experimentos no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos DN/CCS/UFPB;

À PIBIC Thais Santana pela grande ajuda em todos os momentos, pela amizade, paciência e dedicação. Minha companheira de horas e horas no laboratório que eu espero poder trabalhar em outra oportunidade!

Às companheiras de laboratório: Winnie Alencar, Laiane Alves, Caroline Junqueira, Rayssa Carvalho, Geany Targino, Jéssica Bezerra, Vanessa Honório, Quênia Gramile e pela ótima convivência, auxílio nas horas difíceis e valiosos favores, em especial à Estefânia Garcia, Jossana Sousa e Danilo Elias!

Às amigas: Isabella Medeiros (por também ser minha companheira de laboratório, por estar sempre disposta a ajudar), Ana Caroliny e Suênia Félex pela amizade verdadeira, apoio emocional e incentivo, momentos de alegrias e descontração. Amigas que eu tive o prazer de conhecer no Mestrado e que eu quero sempre presentes em minha vida!

Aos companheiros da turma de Mestrado, pela convivência, onde compartilhamos momentos de alegrias e de muito estudo ao longo das disciplinas, em especial, à Tamires, pela amizade, apoio em todos os momentos e parceria nos trabalhos e seminários das disciplinas.

Aos componentes da minha banca examinadora, Prof^ª. Dr^ª Marciane Magnani, Prof. Dr. Juscelio Donizete Cardoso e Prof^ª Dr^ª Teresa Pacheco, pelas valiosas considerações para o aperfeiçoamento dessa Dissertação.

Aos funcionários e colaboradores dos laboratórios e à colaboradora da secretaria da pós-graduação, Lindalva, pela presteza e sempre trabalhando com muito bom humor.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, à coordenadora, professora Dr^ª Marta Madruga pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado. Agradeço também a todos os professores pelos ensinamentos ao longo do curso que foram essenciais à minha formação.

Às Instituições da EMBRAPA, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro;

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica o meu agradecimento.

"A persistência é o menor caminho do êxito".

Charles Chaplin

RESUMO

A exigência por alimentos com composição nutricional equilibrada e que possam oferecer benefícios adicionais à saúde é requisitada pelos consumidores atuais. Esses produtos são denominados alimentos funcionais, onde podem ser incluídos os probióticos, isto é, alimentos adicionados de culturas de micro-organismos que atuam como agentes tecnológicos e como agentes terapêuticos. Para proporcionar benefícios, esses micro-organismos devem se adequar a alguns critérios como sobrevivência ao longo do trato gastrointestinal. Outros critérios incluem a não-patogenicidade e não-toxicidade do micro-organismo e capacidade para prevenir ou inibir o crescimento de organismos nocivos à saúde. Os alimentos são considerados como um veículo ideal para o fornecimento de probióticos ao trato gastrointestinal humano pelo efeito protetor sobre as cepas probióticas durante a passagem até o seu local de ação, o intestino. Assim, os micro-organismos devem ser compatíveis com a matriz do produto: processamento, condições de armazenamento, ingredientes, propriedades físico-químicas e presença de micro-organismos competidores e inibidores, para manterem a viabilidade e as propriedades desejadas. Os produtos lácteos são as principais matrizes alimentares suplementadas com probióticos como iogurtes, leites fermentados, queijos, bebidas lácteas e sobremesas lácteas. Os queijos possuem vantagens como: maior valor do pH, maior capacidade de tamponamento, disponibilidade de nutrientes, baixo teor de oxigênio. No artigo de revisão, o presente estudo abordou características referentes aos probióticos dando ênfase às pesquisas relacionadas ao uso de queijos como matriz e as avaliações *in vitro* ou *in vivo* relativas ao tema. Essa pesquisa também inclui um artigo que avaliou a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 incorporado em queijo de coalho caprino quando exposta a condições gastrointestinais simuladas. Os efeitos inibitórios da cepa contra bactérias patogênicas em queijo de coalho durante 21 dias de armazenamento refrigerado também foi avaliado. Ao final da digestão *in vitro*, não houve alteração ($p > 0,05$) na contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* (6,75 log UFC/g) em relação à contagem antes da exposição às condições da boca (6,55 log UFC/g). Quando avaliada contra *S. aureus*, *L. rhamnosus* apresentou taxas de inibição de 1,55%, 1,7% e 21,66% aos 7, 14 e 21 dias de armazenamento, respectivamente; contra *Salmonella* Enteritidis as taxas de inibição foram de 4,36%, 5,33% e 5,51% aos 7, 14 e 21 dias de armazenamento, respectivamente; contra *Escherichia coli*, aos 7 dias de armazenamento foi de 7,98% e, contra *Listeria monocytogenes* foi de 2,62%, 1,57% e 10,23% nos dias 7, 14 e 21, respectivamente. Esses resultados indicam o queijo de coalho caprino tem efeito protetor sobre a viabilidade de *L. rhamnosus* EM1107 na exposição às condições gastrointestinais simuladas. Além disso, a cepa poderia ser usada como cultura protetora para retardar o crescimento de bactérias patogênicas, em particular, *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: Alimentos funcionais lácteos, queijo de coalho caprino, probióticos, *Lactobacillus rhamnosus*.

ABSTRACT

The demand for foods with balanced nutritional composition and that may also provide additional health benefits is required by today's consumers. These are called functional food product, that includes the probiotics, i.e., foods added from cultures of micro-organisms which act as processing therapeutic agents. To provide benefits, these micro-organisms must be suitable to certain criteria such as survival throughout the gastrointestinal tract. Other criteria include non-toxic and non-pathogenic micro-organisms and ability to prevent or inhibit the growth of organisms harmful to health. Foods are considered as an ideal instrument for the supply of probiotics to the human gastrointestinal tract by a protective effect on the probiotic strains during passage to its site of action, the intestine. Thus, the micro-organisms must be compatible with the matrix product: processing, storage conditions, ingredients, physical and chemical properties and the presence of competing micro-organisms and inhibitors, to maintain viability and desired properties. Dairy products are the main food matrices supplemented with probiotics such as yogurt, fermented milks, cheeses, dairy beverages and dairy desserts. Cheese have advantages such as: high pH, increased buffering capacity, nutrient available, low oxygen content. In the review article, the present study approached features associated to probiotics emphasizing research related to the use of cheese as a matrix and evaluation *in vitro* or *in vivo* about the topic. This research also includes an article that evaluated the viability of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 that was added to semi-hard goat cheese (Coalho) when exposed to simulated gastrointestinal conditions. The inhibitory effects of this strain against pathogenic bacteria in goat Coalho cheese were also evaluated during 21 days of refrigerated storage. After *in vitro* digestion, no change in the viable cell count of *L. rhamnosus* (6.75 log CFU/g) was observed compared with the count before exposure to oral conditions (6.55 log CFU/g). When evaluated against *S. aureus*, *L. rhamnosus* exhibited the inhibition rates of 1.55%, 1.7% and 21.66% at 7, 14 and 21 days of storage, respectively. Furthermore, against *Salmonella* Enteritidis, the inhibition rates were 4.36%, 5.33% and 5.51% at 7, 14 and 21 days of storage, respectively; against *Escherichia coli* at 7 days of storage, the inhibition rate was 7.98%; and against *Listeria monocytogenes*, the inhibition rates were 2.62%, 1.57% and 10.23% at 7, 14 and 21 days of storage, respectively. These results indicate that goat Coalho cheese has a protective effect on the viability of *L. rhamnosus* EM1107 during artificial digestion. In addition, this strain could be used as a protective culture to delay the growth of pathogenic bacteria, particularly *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

Keywords: Functional dairy foods, goat coalho cheese, probiotics, *Lactobacillus rhamnosus*.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS - DISSERTAÇÃO

- Figura 1** Queijos embalados à vácuo. Fonte: o autor (2014). 40
- Figura 2** Representação esquemática da adição das substâncias de cada etapa nas amostras que foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas. 44
- Figura 3** Desenho esquemático das amostras utilizadas no ensaio inibitório de *L. rhamnosus* contra bactérias patogênicas. 46

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO 1

- Fig 1** The viable cell counts (average± standard deviation) of *L. rhamnosus* EM1107, when inoculated in MRS broth (○,●) or in cheese (□,■), and either exposed (●,■) or not (○,□) the simulated gastrointestinal conditions over different incubation times. The pH values that the bacteria were exposed to are indicated in the upper left corner. 62
- Fig. 2** Time course of inhibition (inhibition rate expressed as average ± standard deviation) of *S. aureus* (A), *S. Enteritidis* (B), *E. coli* (C) and *L. monocytogenes* (D) brought about by *L. rhamnosus* EM1107, in goat coalho cheese, during 21 days of storage at 7 °C. 65

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS - ARTIGO DE REVISÃO

Quadro 1	Micro-organismos utilizados como probióticos	21
-----------------	--	----

LISTA DE QUADROS - DISSERTAÇÃO

Quadro 1	Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada	42
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS - ARTIGO DE REVISÃO

Tabela 1	Pesquisas sobre avaliação da sobrevivência de probióticos em queijos durante o seu processamento e período de armazenamento	27
Tabela 2	Pesquisas sobre avaliação das condições gastrointestinais simuladas em queijos	29
Tabela 3	Pesquisas sobre avaliação <i>in vivo</i> do potencial probiótico de queijos	31

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 1

Table 1	The conditions used during each stage of the simulated digestion.	59
----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bactérias Ácido-Láticas
BHI	Brain Heart Infusion
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GALT	Sistema linfático associado ao intestino
IECs	Células Epiteliais Intestinais
IFN-γ	Inteferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
NK	Natural Killer
PP	Placas de Peyer
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 ARTIGO DE REVISÃO	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 QUEIJO DE COALHO	40
3.2 CEPAS TESTE E PREPARO DOS INÓCULOS	40
3.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE <i>L. rhamnosus</i> EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS	41
3.4 ENSAIO DE EFEITO INIBITÓRIO DE <i>L. rhamnosus</i> CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	45
3.5 ANÁLISE DOS DADOS	47
4 REFERÊNCIAS	48
5 RESULTADOS	52
5.1 ARTIGO ORIGINAL	53

1 INTRODUÇÃO

Os produtos funcionais são alimentos enriquecidos que têm um potencial efeito benéfico sobre a saúde quando consumidos como parte de uma dieta equilibrada (KUMAR, et al., 2015). Dentre esses alimentos, estão incluídos os produtos probióticos, os quais estão disponíveis, principalmente, em matrizes lácteas (LIMA et al., 2014), cujo mercado vem crescendo em todo o mundo, considerando o fato de que novos produtos funcionais, com tais características, estão sendo lançados no mercado continuamente (BIGLIARDI; GALATI, 2013).

A utilização de queijos como veículos de probióticos tem sido abordada em alguns estudos (PITINO et al., 2012; ZHANG et al., 2013; ABADÍA-GARCÍA et al., 2013), entretanto, no Brasil, o mercado de produtos fermentados ainda tem espaço para ampliar as tecnologias para aplicação destes produtos (OLIVEIRA et al., 2012). O queijo de "Coalho" artesanal é um produto brasileiro tipicamente nordestino e popular, amplamente consumido pela população local e em todo o Brasil. As principais características deste queijo são o seu sabor levemente salgado e ácido, e resistência ao calor sem derretimento. Este queijo tem uma participação considerável na economia da região nordeste, sendo significativo na renda dos fornecedores de leite, especialmente aqueles que não têm acesso a instalações de processamento de leite (SILVA et al., 2012).

Os alimentos são sistemas de entrega que podem ser desenvolvidos para carrear componentes bioativos, entre eles os probióticos, até um local específico no trato gastrointestinal (TGI), podendo sofrer a ação do pH, forças iônicas ou atividade de enzimas (HUR et al., 2011). Desta forma, a matriz pode fornecer alguma proteção para os probióticos, reduzindo a sua exposição ao ambiente físico gastrointestinal desfavorável ao micro-organismo (RANADHEERA et al., 2012). Nesse contexto, a avaliação preliminar *in vitro* do produto probiótico frente às condições gastrointestinais simuladas torna-se obrigatória (FAO/WHO, 2002). Testar a eficácia da ação probiótica de alimentos recém-desenvolvidos depende da disponibilidade de modelos de digestão, que simulem com precisão os eventos físico-químico e fisiológico que ocorrem no TGI humano (HUR et al., 2011).

Outra análise *in vitro* utilizada para avaliar um produto probiótico refere-se ao potencial inibitório da cepa adicionada ao queijo, frente a uma possível contaminação por bactérias patogênicas. A eficácia dos probióticos foi demonstrada para o tratamento

de distúrbios gastrointestinais, infecções respiratórias e sintomas alérgicos (ISOLAURI; SALMINEN, 2008; SALVA; VILLENA; ALVAREZ, 2010; WOHLGEMUTH; LOH; BLAUT, 2010). Assim, a utilização de probióticos tem sido uma área de estudo em ascensão para o controle de infecções de origem alimentar (MOORE et al. 2013). As doenças infecciosas estão entre os maiores problemas de saúde em humanos, sendo que, todos os anos, as infecções gastrointestinais são responsáveis por significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO, 2004). As bactérias probióticas possuem atividade antagonista contra agentes de doenças transmitidas por alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens* (KASIMOZLU; AKGÜN, 2004; KARAGOZLU et al., 2007; MILLETTE et al., 2007). Desta forma, a veiculação de micro-organismos probióticos em queijos, pode contribuir para a conservação deste alimento, devido ao potencial antimicrobiano dessas bactérias criado pela ação de diferentes compostos por elas sintetizados na matriz alimentar (DE VUYST et al., 2004)

A busca pelo isolamento de novas cepas probióticas autóctones tem sido impulsionada diante da crescente demanda por alimentos probióticos e a comprovação de seus benefícios. Ao se selecionar uma nova cepa com potencial probiótico, vários estudos devem ser realizados para que ela seja considerada um micro-organismo probiótico e possa ser usada com segurança a nível industrial. Para confirmar essa viabilidade, uma série de testes *in vitro* deve ser realizada a princípio, como: análises de identificação e caracterização da cepa, testes de segurança, avaliação quanto às suas propriedades tecnológicas e propriedades antagonistas, além de testes de sobrevivência do micro-organismo na matriz alimentar ao longo das condições gastrointestinais simuladas. Considerando estes aspectos o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 em queijo de coalho caprino exposto a condições gastrointestinais simuladas. O potencial de inibição de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, em queijo de coalho caprino ao longo do armazenamento refrigerado também foi avaliado.

2 ARTIGO DE REVISÃO

DESTAQUES EM PESQUISAS COM PROBIÓTICOS EM QUEIJOS

Será submetido à CyTA - Journal of Food

Qualis B2; Fator de impacto: 0.495

Destaques em pesquisas com probióticos em queijos

Fernanda Rodrigues Leite Rolim^a, Marciane Magnani^b, Maria Elieidy Gomes de Oliveira^c, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga^{d*}

^a *Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil*

^b *Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil*

^c *Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Brasil*

^d *Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil*

*E-mail address: rcqueiroga@uol.com.br (R.C.R.E. Queiroga)

Resumo

A demanda por alimentos probióticos é crescente devido à busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis. Probióticos são micro-organismos que promovem efeitos benéficos à saúde e, para tal, devem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, aderir e colonizar o epitélio intestinal. Os alimentos são veículos que os protegem durante essa passagem, sendo que os queijos possuem vantagens como: maior valor do pH, maior capacidade de tamponamento, disponibilidade de nutrientes e baixo teor de oxigênio. Avaliações *in vitro* da viabilidade das cepas durante a vida de prateleira do produto, sobrevivência e tolerância às condições gastrointestinais, e ensaios *in vivo* para verificar as propriedades funcionais e mecanismo de ação das cepas, são realizadas para comprovação da eficácia do produto probiótico. Essa revisão tem como objetivo abordar características referentes aos probióticos dando ênfase às pesquisas relacionadas ao uso de queijos como matriz e as avaliações *in vitro* ou *in vivo* relativas ao tema.

Palavras-chave: Alimentos funcionais lácteos, queijo de coalho, *Lactobacillus*.

1. Introdução

O consumo de probióticos através de produtos alimentares é a forma mais popular de ingestão, atualmente. A demanda por alimentos probióticos está crescendo rapidamente devido ao aumento da conscientização dos consumidores em busca de alimentos mais saudáveis (Tripathi & Giri, 2014). Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que atuam como agentes tecnológicos melhorando as características da matriz alimentar e, como agentes terapêuticos promovendo os efeitos benéficos aos indivíduos que os ingerem (FAO/WHO, 2002). As bactérias probióticas são incorporadas principalmente como ingredientes em produtos lácteos como iogurtes, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvetes, sobremesas lácteas, e queijos (Granato, Branco, Cruz, Faria, & Nazarro, 2010; Ranadheera, Baines, & Adams, 2010).

Diversos estudos têm abordado o desenvolvimento de queijos probióticos, sendo demonstrado que os queijos apresentam um grande potencial como veículo para fornecer bactérias probióticas ao consumidor (Zhang et al., 2013; Lollo et al., 2012; Santillo et al., 2014). Os queijos possuem vantagens em suas características comparados a outros produtos, como leites fermentados: maior valor do pH, maior capacidade de tamponamento, disponibilidade de nutrientes, baixo teor de oxigênio e matriz sólida (Karimi, Mortazavian, & Cruz, 2011; Pitino et al., 2012). Essas características contribuem para ampliar o efeito protetor das cepas durante a vida de prateleira do produto e durante a sua passagem através do trato gastrointestinal após ingestão (Karimi, Mortazavian, & Cruz, 2011).

Quando os micro-organismos probióticos são adicionados em um novo alimento ou bebida, muitas variáveis importantes devem ser consideradas a fim de garantir a sua viabilidade, o que é considerado essencial para seus benefícios de saúde (Ouweland & Salminen, 1998). Nesse contexto, a incorporação dos micro-organismos probióticos aos alimentos e a manutenção de sua viabilidade durante a vida de prateleira constitui-se um desafio significativo, visto que, a viabilidade pode ser perdida durante o processo de fabricação, armazenamento ou transporte do produto probiótico (Vesterlund, Salminen, & Salminen, 2012). Além disso, uma investigação cuidadosa da interação de diferentes probióticos e componentes alimentares devem ser consideradas no desenvolvimento de um alimento probiótico funcional (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010).

Assim, diferentes matrizes podem afetar o crescimento, a viabilidade, a sobrevivência e a tolerância ao ácido gástrico e bile, bem como as suas propriedades

funcionais. A performance de cada cepa probiótica deve ser adequadamente testada no alimento e o seu desempenho não pode ser extrapolado para cepas semelhantes, pois, os seus efeitos no hospedeiro e o seu comportamento na matriz alimentar são considerados cepa-específicos (Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2012). Testes *in vitro* de viabilidade dos probióticos no produto durante o seu armazenamento devem ser realizados e a avaliação da sobrevivência da cepa às condições do trato gastrointestinal (TGI) simuladas (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010). Além dos testes *in vitro*, estudos experimentais, em animais e humanos, são fundamentais e objetivam avaliar cepas probióticas para verificar suas propriedades específicas e demonstrar seu mecanismo de ação (Servin & Coconnier, 2003). Esses ensaios clínicos e experimentais com produtos probióticos são obrigatórios antes que a sua utilização possa ser recomendada para consumo no mercado (Vandenplas, Huys, & Daube, 2015).

Neste contexto, essa revisão teve como objetivo abordar sobre as pesquisas existentes na literatura científica referentes à avaliação da viabilidade de cepas probióticas quando adicionadas em diversos tipos de queijos durante o processamento, vida de prateleira e trânsito gastrointestinal simulado, além de estudos em animais e humanos de verificação dos efeitos benéficos dessas cepas ao chegarem viáveis em seu local de ação. Também foram abordados os aspectos relacionados às características gerais, propriedades funcionais e mecanismos de ação desses micro-organismos.

2. Probióticos

2.1 Aspectos gerais e características

Diversas definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos, sendo aceita internacionalmente, aquela que caracteriza os probióticos como micro-organismos vivos que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Para serem eficazes, os probióticos necessitam estar presentes em uma concentração mínima no produto durante a sua vida de prateleira (Kailasapathy, 2002). Neste contexto, um produto lácteo deve conter pelo menos 10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama ou mililitro de alimento, no momento de seu consumo (Vinderola, Prosello, Ghiberto, & Reinheimer, 2000; Plessas, Bosnea, Alexopoulos, & Bezirtzoglou, 2012). No momento em que são incorporados em alimentos, a viabilidade celular é rotineiramente usada para o monitoramento da funcionalidade durante o armazenamento por meios de contagem em

placas (Vinderola et al., 2012). Nos produtos onde uma alegação de saúde é anunciada, a dose necessária para o efeito à saúde deve ser rotulada no produto, o que também deve incluir o número de micro-organismos viáveis encontrados no final do produto de vida de prateleira, ao invés de apenas no início do mesmo (FAO/WHO, 2002).

Lactobacillus e *Bifidobacterium* são os gêneros mais frequentemente utilizados como probióticos (Fontana, Bermudez-brito, Plaza-diaz, Munoz-quezada, & Gil, 2013), principalmente cepas bacterianas de membros do grupo heterogêneo de bactérias ácido-láticas (BAL): *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* e *Enterococcus*, entre outros (Binns & Lee, 2010; Maragkoudakis, Chingwaru, Gradisnik, Tsakalidou, & Cencic 2010). A maioria das espécies utilizadas como probióticos receberam o status de Presunção Qualificada de Segurança (QPS) pela EFSA (Agência Européia de Segurança Alimentar), que avalia o uso com segurança de agentes biológicos em alimentos. Após um longo histórico de uso com segurança, os micro-organismos são considerados como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) (EFSA, 2013; Mattia & Merker, 2008).

A origem dos micro-organismos é variável, os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, por exemplo, geralmente são provenientes do intestino humano. Os probióticos podem ainda ser isolados de leite bovino e derivados, colostro humano, além de produtos de origem vegetal, como frutas (Salva, Villena, & Alvarez, 2010; Douillard et al., 2013). Estes micro-organismos são encontrados como comensais no TGI humano, têm uma longa história de segurança e demonstráveis propriedades benéficas. O microbioma intestinal de voluntários saudáveis, portanto, poderia ser uma boa fonte de probióticos (Nuño-palop & Nrabad, 2011). O Quadro 1 resume alguns micro-organismos com potencial para serem utilizados como probióticos.

A seleção de probióticos deve considerar aspectos de seguridade, funcionalidade e tecnológicos. Assim, os critérios para a escolha de um probióticos incluem: a sua identificação taxonômica exata; sua capacidade de sobreviver, proliferar e estimular a atividade metabólica no TGI. Possuir características de aderência e colonização; ter a capacidade de competir com o microbioma residente ou espécie específica; ser resistente ao suco gástrico e à bile; apresentar propriedade imuno-estimulatória; não ser tóxico e/ou patogênico. Os efeitos benéficos à saúde devem ser documentados e validados clinicamente assim como ser geneticamente estável. Devem apresentar resistência ao processamento (concentração, congelamento, desidratação, estocagem e distribuição) e fornecer qualidades sensoriais desejáveis ao consumidor (Maróstica Júnior, Cazarin, Lima, & Vieira, 2013).

Quadro 1. Micro-organismos utilizados como probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido-láticas	Outros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>cepa Nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>B. cereus</i> var. Toyo
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>S. diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. salivarius</i>			

Fonte: Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, & Bressollier, 2013; Binns & Lee, 2010; Maragkoudakis, Chingwaru, Gradisnik, Tsakalidou, & Cencic 2010; Mummy, Chen, Kelly, & McCormick, 2008; EFSA, 2013.

2.2 Propriedades funcionais

Probióticos têm sido demonstrados por promover uma variedade de efeitos biológicos em condições fisiológicas e patológicas (Fontana, Bermudez-brito, Plaza-diaz, Munoz-quezada, & Gil, 2013). Cada cepa probiótica tem propriedades específicas e seus efeitos sobre a saúde dos hospedeiros não podem ser generalizados (Servin & Coconnier, 2003; Guarner & Malagelada, 2003), de modo que, a seleção apropriada de cepas é muito importante de acordo com a sua aplicação terapêutica (Salva, Villena, & Alvarez, 2010).

As propriedades funcionais, que os probióticos podem proporcionar aos indivíduos que os ingerem, incluem: a modulação da microflora intestinal (Savard et al., 2011), a modulação do sistema imune (Lollo et al., 2012; Ibrahim et al., 2010), o controle de infecções intestinais (Basu, Paul, Ganguly, Chatterjee, & Chandra, 2008; Heenan, Adams, Hosken, & Fleet, 2004), a redução dos níveis de colesterol (Kumar et al., 2011), o efeito anticancerígeno (Commane, Hughes, Shortt, C., & Rowland, 2005; Heenan, Adams, Hosken, & Fleet, 2004), o alívio da Síndrome do intestino irritado (Okada et al., 2009), a redução de alergias (Isolauri & Salminen, 2008), a síntese de vitaminas e atividades anti-bacterianas (Heenan, Adams, Hosken, & Fleet, 2004).

É importante salientar que a eficácia dos probióticos sobre o estado de saúde e nutrição do hospedeiro é dependente das mudanças que eles promovem na composição e na atividade metabólica do microbioma residente (Buddington, 2009). A influência dos probióticos sobre o microbioma intestinal humano inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (Puupponen-Pimiä et al., 2002).

2.3 Mecanismos de ação

Os mecanismos e a eficácia de um efeito probiótico muitas vezes dependem das interações com o microbioma específico do hospedeiro ou com as células imunocompetentes da mucosa intestinal. O intestino ou sistema linfático associado ao intestino (GALT) é o maior órgão imunologicamente competente no corpo e a maturação e desenvolvimento ótimo do sistema imune, desde o nascimento, depende da composição do microbioma (Guarner & Malagelada, 2003). O microbioma saudável é definido como o microbioma normal que conserva e promove o bem estar e a ausência de doenças (Isolauri, Salminen, & Ouwehand, 2004). Esse, exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que micro-organismos potencialmente patogênicos nele presentes exerçam seus efeitos. Por outro lado, o seu desequilíbrio pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana (Ziemer & Gibson, 1998). A correção das propriedades do microbioma autóctone desbalanceado constitui a racionalidade da terapia por probióticos (Isolauri, Salminen, & Ouwehand, 2004). A

busca de uma melhor compreensão dos mecanismos de ação das cepas probióticas, impulsionou um enorme interesse nos processos moleculares fundamentais nas interações hospedeiro-micro-organismo (Wohlgemuth, Loh, & Blaut, 2010).

Os mecanismos sugeridos pelos quais os probióticos podem exercer os seus efeitos de proteção ou terapêuticos contra patógenos entéricos incluem mecanismos não imunes e imunes. Os mecanismos não imunes incluem a estabilização da barreira mucosa do intestino, competição por sítios de adesão, competição por nutrientes e secreção de substâncias antimicrobianas (Delgado, O'Sullivan, Fitzgerald, & Mayo, 2007; Liu et al., 2011). No TGI de humanos e animais, a barreira da mucosa separa o meio interno do ambiente luminal e protege o epitélio do contato direto com os conteúdos luminiais, de forma a evitar a invasão por organismos patogênicos. A proteção local da superfície da mucosa é mediada pelos produtos de secreção epitelial, tais como, o muco, peptídeos antimicrobianos (defensinas) e células secretoras de anticorpos, principalmente de imunoglobulina A (IgA). O muco é composto por glicoproteínas, as mucinas, que são sintetizadas e secretadas por células caliciformes na resposta a estímulos fisiológicos (microbiota normal) ou patológicos (patógenos entéricos) (Hooper & Macpherson, 2010), inclusive, por meio da ingestão de probióticos (Macfarlane & Cummings, 2002).

Tem sido amplamente relatado que a adesão de BAL à mucosa diminui a adesão de micro-organismos patogênicos (Lee, Puong, Ouwehand, & Salminen, 2003). O efeito anti-adesão poderia resultar da concorrência entre probiótico e patógeno para um mesmo receptor (sítio de ligação no epitélio intestinal) ou através da indução por probióticos de mucinas (Oelschlaeger, 2010). Ainda sobre os mecanismos não imunes, várias cepas probióticas são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias antimicrobianas. Os mais comuns são os ácidos orgânicos (ácido lático e ácido acético), que induzem uma redução no pH fecal (Wohlgemuth, Loh, & Blaut, 2010), o peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e compostos antibacterianos, incluindo bacteriocinas e não-bacteriocinas e moléculas de ácido não-lático (Marianelli, Cifani, & Pasquali, 2010). Há muitos relatos onde bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido-láticas probióticas contribuem para a saúde do trato gastrointestinal (Gillor, Etzion, & Riley, 2008); no entanto, as aplicações de bacteriocinas probióticas produzidas por bactérias Gram-positivas no trato gastrointestinal são limitadas porque raramente inibem bactérias enteropatogênicas comumente encontradas tais como *Salmonella*,

Enterobacter ou *Klebsiella* (Castillo, De moreno De Leblanc, Galdeano, & Perdígón, 2012).

Probióticos exercem também seu efeito como adjuvante imunológico através da modulação da mucosa e resposta do sistema imune (Galdeano et al., 2007). Células epiteliais intestinais (IECs) estão em contato direto com a microbiota no lúmen intestinal. Eles participam do início da regulação da resposta imune da mucosa para bactérias, especialmente agentes patogênicos, por interação com as células do sistema imunológico, as Placas de Peyer (PP), o tecido linfóide na lâmina própria do intestino e os linfócitos intra-epiteliais (Kagnoff & Eckmann, 1997). Os micro-organismos probióticos podem primeiramente interagir com receptores expressos na superfície de IECs e, assim, desencadear uma cascata de mecanismos de defesa imunológica ou podem ser transportados por células localizadas em folículos associados ao epitélio que recobre as PP das células imunitárias na região subepitelial. A captação de antígenos e micro-organismos também pode ocorrer através do transporte vesicular trans-epitelial ativo em enterócitos e células M (Snoeck, Goddeeris, & Cox, 2005).

Finalmente, células dendríticas na lâmina própria podem estender ativamente seus dendritos através de junções epiteliais e, assim, entram em contato diretamente com o probiótico no lúmen intestinal (Marco, Pavan, & Kleerebezem, 2006; Rescigno et al., 2001) e moléculas antigênicas, após o seu transporte através da barreira intestinal, estimulando o sistema imune inato ou adaptativo. Probióticos podem melhorar as funções do sistema imunológico inato, incluindo atividade fagocitária de neutrófilos e atividade citotóxica das células natural killer (NK) (Galdeano et al., 2007). Na imunidade adaptativa, muitas bactérias probióticas são capazes de estimular a secreção de IgAs pelos linfócitos B e a ativação de linfócitos T (Th1/Th2) e macrófagos, modulando a produção de citocinas (TNF- α (fator de necrose tumoral), IFN- γ (Inteferon gama), IL-2, IL-8, IL-6, IL-4, IL-5, IL-12), as quais são as moléculas envolvidas na comunicação entre linfócitos, macrófagos e outras células envolvidas na reações inflamatórias e as respostas imunes. Além disso, há uma grande variação na resposta de citocinas induzidas por diferentes cepas ou espécies de probióticos (Arseneau, Tamagawa, Pizarro, & Cominelli, 2007). O efeito anti-inflamatório de certas bactérias probióticas pode ser também relacionado com a proteção desses micro-organismos contra patógenos. A defesa do hospedeiro contra infecção ativa a resposta inflamatória imune que pode conduzir a danos nos tecidos (Castillo, De moreno De Leblanc, Galdeano, & Perdígón, 2012). Obter conhecimentos sobre os mecanismos de ação de

probióticos não só pode ajudar a melhorar a credibilidade do conceito de probióticos, mas, também para o desenvolvimento de estratégias sob medida para a prevenção ou tratamento de várias doenças (Wohlgemuth, Loh, & Blaut, 2010).

3. Queijos como matriz alimentar para veiculação de probióticos

Uma etapa necessária para o sucesso de um produto funcional probiótico é o de assegurar a sua sobrevivência na matriz alimentar, considerando seus constituintes, as condições de processamento e armazenamento. Com isso, vários parâmetros devem ser combinados e considerados, tais como: tipo de cultura probiótica, dose de adição necessária para obter uma resposta fisiológica, sobrevivência durante o processamento do produto, estabilidade ao longo do armazenamento e os possíveis efeitos das cepas sobre as propriedades sensoriais (Corbo, Albenzio, De Angelis, Sevi, & Gobbetti, 2001; Reid, Champagne, Gardner, Fustier, & Vuilleumard, 2007). Para a viabilidade dos microorganismos probióticos ainda devem ser levadas em conta as propriedades intrínsecas e extrínsecas dos produtos alimentares, tais como o teor de gordura, concentração e tipo de proteínas e açúcares, pH, nível de oxigênio, atividade de água, presença de microorganismos inibidores e competidores (Shah, 2007; Vesterlund, Salminen, & Salminen 2012).

Além disso, a tolerância de cepas probióticas ao ácido gástrico e bile no TGI podem ser melhoradas escolhendo-se uma matriz alimentar transportadora apropriada que pode fornecer alguma proteção para os probióticos, reduzindo a sua exposição ao ambiente físico gastrointestinal severo (Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2012). Assim, uma investigação cuidadosa sobre a interação de diferentes probióticos e componentes alimentares deve ser considerada no desenvolvimento de alimentos probióticos funcionais (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010). Dentre os alimentos que são utilizados para carrear os probióticos, os produtos lácteos são os pioneiros como matrizes alimentares, e, atualmente, constituem-se no principal veículo de administração de culturas probióticas (Sanchez, Reyes-Gavilan, Margolles, & Gueimonde, 2009).

O queijo é considerado um veículo adequado para o fornecimento de bactérias viáveis em quantidade suficiente para produzir efeitos de promoção da saúde em humanos (Ribeiro, Simões, & Jurkiewicz, 2009). Diversos estudos com diferentes variedades de queijos, como portadores de culturas probióticas, concluíram que essa matriz pode oferecer algumas vantagens em relação a outros produtos lácteos (Hayes et

al., 2006; Karimi, Mortazavian, & Cruz, 2011; Vinderola, Mocchiutti, & Reinheimer, 2002). A alta capacidade de tamponamento dos queijos gera um ambiente anaeróbio que é promovido pela combinação da densidade de proteína da matriz e o alto conteúdo de lipídios e podem oferecer maior proteção às células microbianas durante a passagem através do estômago para o intestino. O pH mais elevado do queijo em relação aos leites fermentados, pode ajudar a sustentar a viabilidade do probiótico durante o armazenamento refrigerado (Mirzaei, Pourjafar, & Homayouni, 2012; Cruz, Buriti, De Souza, Faria, & Saad, 2009; Hayes et al., 2006). Várias pesquisas, com diferentes variedades de queijos, estudaram a viabilidade das cepas probióticas testadas após o processamento, levando em consideração o tempo de maturação do produto ou ao longo da vida de prateleira, como está apresentado na Tabela 1. Esses trabalhos demonstraram que os queijos foram boas matrizes ao manterem as culturas bacterianas viáveis ao nível mínimo de 10^6 UFC/g durante do período estudado.

Para alegação de que um alimento tem um efeito probiótico, algumas diretrizes devem ser seguidas para avaliação desse produto, que incluem os testes *in vitro* e *in vitro* (FAO/WHO, 2002). O principal teste *in vitro* realizado é o de simulação das condições do trato gastrointestinal e, em seguida, ensaios *in vivo*, clínicos e experimentais, são realizados em animais e, por fim, em humanos. Estudos experimentais têm como finalidade verificar as propriedades funcionais da cepa probiótica, além de investigar qual o possível mecanismo de ação utilizado pelo micro-organismo para promover o benefício à saúde, fornecendo uma base científica para a prevenção ou tratamento de várias doenças (Servin & Coconnier, 2003; Castillo, De moreno De Leblanc, Galdeano, & Perdígón, 2012).

3.1 Ensaios *in vitro* e *in vivo*

Dentre os ensaios *in vitro* que são frequentemente sugeridos para a avaliação do potencial de cepas probióticas está a resistência às condições gastrointestinais simuladas (Buriti, Castro, & Saad, 2010; Reale et al., 2015). Modelos *in vitro* de digestão fornecem uma rápida triagem de avaliação de produtos alimentares. Um método *in vitro* de digestão ideal pode fornecer resultados precisos em um curto tempo (Coles, Moughan, & Darragh, 2005). No entanto, não há consenso internacional até agora sobre um protocolo padronizado para avaliar a resistência para as condições encontradas no

Tabela 1. Pesquisas sobre avaliação da sobrevivência de probióticos em queijos durante o seu processamento e período de armazenamento

Tipo de queijo	Cepa avaliada	Período avaliado (dias)	Estudo
Creme de queijo	<i>L. paracasei</i> LPC-37	21	Santini et al. (2012)
Queijo Prato	<i>L. rhamnosus</i>	90	Cichoski, Cunico, Luccio, Zitkoski, & Carvalho,(2008)
Petit-suisse	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	21	Cardarelli, Buriti, Castro, & Saad, (2008); Maruyama, Cardarelli, Buriti, & Saad, (2006)
Petit-suisse	<i>L. casei</i> BGP 93	30	Barros & Delfino (2014)
Cheddar	<i>L. plantarum</i> K25	84	Zhang et al. (2013)
Queijo maturado	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. bulgaricus</i> 2772	28	González-Olivares et al. (2014)
Argentino	<i>L. paracasei</i> A13	6	Vinderola, Prosello, Molinari, Ghiberto, & Reinheimer (2009)
Argentino	<i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb12	Processamento	Perotti et al. (2014)
Minas frescal	<i>L. paracasei</i> LBC-82	21	Buriti, Rocha, Assis, & Saad (2005a)
Minas frescal	<i>L. paracasei</i> LBC-82 e <i>L. acidophilus</i> La-5	21	Buriti, Rocha, & Saad (2005b)
Minas frescal	<i>L. acidophilus</i> La-5 + <i>S. thermophiles</i>	21	Souza & Saad (2009)
Cottage	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG	28	Abadía-García et al., 2013

Continuação...

Continuação...

Tipo de queijo	Cepa avaliada	Período avaliado (dias)	Estudo
Coalho	<i>L. acidophilus</i> LA-5; <i>L. paracasei</i> <i>L. casei</i> 01; <i>B. lactis</i> BB12	21	Oliveira, Garcia, Queiroga, & Souza (2012)
Coalho	<i>L. acidophilus</i> LA-5	60	Dos Santos et al. (2012)
Caciotta, Pecorino e Buscion	<i>L. rhamnosus</i> IMC 501® e <i>L. paracasei</i> IMC 502®	60 (Caciotta, Pecorino) 21 (Buscion)	Coman et al. (2012)
Pecorino	<i>L. acidophilus</i> ; <i>B. longum</i> e <i>B. lactis</i> ;	120	Santillo et al. (2014)
Scamorza	<i>L. acidophilus</i>	Processamento	Albenzio et al.(2013)

trato gastrointestinal (Burns, Lafferriere, Vinderola, & Reinheimer, 2014). Testar a eficácia de alimentos recém-desenvolvidos depende da disponibilidade de modelos de digestão que simulam com precisão o complexo físico-químico e fisiológico de eventos que ocorrem no TGI humano.

Assim, as características de digestão *in vitro* tais como o tempo de digestão, o conteúdo ou composição de enzimas, devem ser ajustadas de acordo com as características da amostra. Por exemplo, se a concentração da substância alvo (proteína, lipídeo ou carboidrato) é aumentada, então a concentração de enzimas ou o tempo de digestão devem ser aumentados, mesmo se os outros passos do procedimento de digestão *in vitro* são mantidos os mesmos (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011). Em vista disso, o tempo de digestão em cada etapa (por exemplo, boca, estômago e intestino delgado) é um fator importante ao se determinar um modelo *in vitro* (McClements, Decker, & Park, 2009). Em modelos de digestão geralmente não se leva em consideração o intestino grosso, porque a absorção de compostos ocorre principalmente no intestino delgado (Brandon et al., 2006). A Tabela 2 expõe algumas pesquisas referentes aos modelos utilizados de avaliação das condições gastrointestinais simuladas.

Tabela 2. Pesquisas sobre avaliação das condições gastrointestinais simuladas em queijos

Tipo de queijo	Cepa avaliada	Modelo simulado	Estudo
Queijo de soro de leite	<i>L. casei</i> LAFTI®L26, <i>L. acidophilus</i> LAFTI®L10 ou <i>B. animalis</i> Bo	α -amilase por 2 min; pepsina por 60 min; sais biliares e pancreatina por 60 min	Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata, (2011)
Coalho	<i>L. acidophilus</i> ; <i>L. paracasei</i> ; <i>B. lactis</i>	α -amilase por 2 min; pepsina por 60 min; sais biliares e pancreatina por 60 min	Oliveira et al. (2014)
Cottage	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG	Pepsina por 180 min; pancreatina e sais de bile por 240 min	Abadía-García et al. (2013)
Pasta filata	<i>L. rhamnosus</i> (D44, F17, H12, H25, N24, R61)	Pepsina e lipase por 78 min; lecitina hepática, lipase pancreática, colipase, tripsina, quimiotripsina e α -amilase por 60 e 120 min	Pitino et al. (2012)

Métodos *in vivo*, utilizando animais ou seres humanos, geralmente fornecem resultados mais precisos quando comparados aos testes *in vitro*, porém, são mais demorados e caros (Coles, Moughan, & Darragh, 2005). Contudo, a busca de uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dessas cepas probióticas, impulsionou um enorme interesse nos processos moleculares fundamentais nas interações hospedeiro-microrganismo (Fontana, Bermudez-brito, Plaza-diaz, Munoz-quezada, & Gil, 2013). A base científica das maneiras através das quais os probióticos conferem esses efeitos benéficos deve ser bem estabelecida (Castillo, De moreno De Leblanc, Galdeano, & Perdígón, 2012) por meio de dados obtidos numa cadeia coerente de estudos experimentais e clínicos bem desenhados antes de serem extrapolados para humanos (Servin & Coconnier, 2003).

Modelos animais fornecem comprovação de efeitos da avaliação *in vitro* e, seu principal resultado deve ser confirmado por meio de ensaios em humanos. Esses resultados podem ser: a melhoria significativa na condição fisiológica dos indivíduos, isto é, de sintomas, bem-estar e qualidade de vida; redução do risco de doenças ou o adiamento de sua recorrência; ou recuperação mais rápida da doença. Cada um deve ter uma relação comprovada com o probiótico testado (FAO/WHO, 2002). A Tabela 3 expõe algumas pesquisas sobre a avaliação de queijos probióticos em modelos animais e em humanos para investigação das propriedades funcionais das cepas e o seu mecanismo de ação para obtenção de efeito benéfico. Determinada cepa probiótica, quando testada em diferentes situações clínicas, poderá exercer efeito benéfico, não mostrar nenhum efeito ou, ainda, resultar em um efeito adverso. Efeitos negativos ou adversos, em determinadas situações, não atestam contra a condição (*status*) probiótica desta cepa. Entretanto, esses resultados devem ser documentados especificando-se sobre os seus possíveis efeitos e enfatizando-se o seu uso livre de riscos à saúde (Cruz et al., 2011).

5. Considerações Finais

O crescente número de pesquisas científicas voltadas para a aplicação de probióticos em queijos e a relação desses produtos com os benefícios à saúde do consumidor aliado aos atrativos sensoriais, torna o mercado desses produtos cada vez mais competitivo no mercado. Eles atuam como matrizes protetoras para carreamos os

Tabela 3. Pesquisas sobre avaliação *in vivo* do potencial probiótico de queijos

Tipo de queijo	Cepa avaliada	Grupo avaliado/ tempo	Propriedade funcional	Mecanismo de ação	Estudo
Gouda	<i>L. rhamnosus</i> HN001 e <i>L. acidophilus</i> NCFM	21 mulheres e 10 homens idosos/ 4 semanas	Estímulo da resposta imune inata	Melhoria na capacidade de células NK (Natural Killer) atuarem contra células tumorais e atividade de fagocitose dos granulócitos e monócitos	Ibrahim et al. (2010)
Minas Frescal	<i>L. acidophilus</i> LA14 e <i>B. longum</i> BL05	Ratos Wistar adultos imunossuprimidos por excesso de esforço físico/ 2 semanas	Modulação do sistema imune	Aumento de leucócitos (monócitos, linfócitos)	Lollo et al. (2012)
Cheddar	<i>L. plantarum</i> K25	Camundongos Kunming/ 4 semanas	Redução do risco de doenças cardiovasculares	Redução de colesterol total e LDL	Zhang et al. (2013)
Queijo Fresco	<i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>L. paracasei</i>	Camundongos BALB/c 2, 5 e 7 dias	Modulação do sistema imune	Aumento da atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais, do número de células produtoras de IgA+ e da relação CD4+/CD8+ no intestino delgado após 5 dias de tratamento	Medici, Vinderola, Perdígón (2004)

probióticos, pois alguns de seus ingredientes podem contribuir para manter a viabilidade dos micro-organismos, principalmente, a gordura e proteínas que formam uma matriz sólida com alta capacidade de tamponamento, baixo teor de oxigênio e alto valor de pH. É importante que os micro-organismos estejam em quantidades apropriadas no alimento para proporcionarem o efeito terapêutico esperado nos indivíduos que os ingerem.

Assim, ensaios *in vitro* e *in vivo* são obrigatórios para avaliação de um produto funcional. Ensaios *in vitro* avaliam a viabilidade das cepas nos produtos durante o seu processamento, vida de prateleira, bem como, durante a sua passagem ao longo do trato gastrointestinal (TGI) até a chegada em seu local de ação, o intestino. Avaliações *in vivo* são importantes para comprovar os resultados de análises *in vitro*, por meio de uma investigação mais precisa dos efeitos benéficos e mecanismos de ação das cepas.

Referências

Abadía-García, L., Cardador, A.; Campo, S. T. M. del, Arvízu, S. M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., ... Amaya-Llano, S. L. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33, 191-197.

Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Ruggieri, D., Napolitano, F., & Sevi, A. (2013) Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. *Journal of Dairy Science*, 96, 2781-2791.

Arseneau, K. O., Tamagawa, H., Pizarro, T. T., & Cominelli, F. (2007). Innate and adaptive immune responses related to IBD pathogenesis. *Current Gastroenterology Reports*, 9, 508-512.

Barros, L. S. S., Delfino, N. C. (2014). Petit-Suisse Cheese Production with Addition of Probiotic *Lactobacillus casei*. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1756-1764.

Basu, S., Paul, D. K., Ganguly, S., Chatterjee, M., & Chandra, P. K. (2008). Efficacy of High-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhoea in Indian children: a randomized controlled trial. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43, 208-213.

Binns, C. & Lee, M. K. (2010). The use of probiotics to prevent diarrhea in young children attending child care centers: A review. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 2, 269-273.

Brandon, E. F. A., Oomen, A. G.; Rompelberg, C. J. M.; Versantvoort, C. H. M.; Van engelen, J. G. M.; Sips, A. (2006). Consumer product *in vitro* digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 161-171.

- Buddington, R. (2009). Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (1), *Prebiotics and probiotics science and technology* (pp. 1-32). New York, NY: Springer.
- Buriti, F. C. A., Castro, I., & Saad, S. M. I. (2010). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *137*, 121-129.
- Buriti, F. C. A., Rocha, J. S., Assis, E. G., & Saad, S. M. I. (2005a). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *38*, 173-180.
- Buriti, F. C. A., ROCHA, J. S., & SAAD, S. M. I. (2005b). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, *15*, 1279-1288.
- Burns, P., Lafferriere, L., Vinderola, G., & Reinheimer, J. (2014). Influence of dairy practices on the capacity of probiotic bacteria to overcome simulated gastric digestion. *International Journal of Dairy Technology*, *67*, 448-457.
- Castillo, N. A.; De moreno De Leblanc, A.; Galdeano, C. M.; & Perdigón, G. (2012). Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, *114*, 861-876.
- Cardarelli, H. R., Buriti, F. C. A., Castro, I. A., & Saad, S. M. I. (2008). Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic pettit-suisse cheese. *LWT- Food Science and Technology*, *41*, 1037-1046.
- Cichoski, A. J., Cunico, C., Luccio, M., Zitkoski, J. L., & Carvalho, R. T. (2008). Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *28*, 214-219.
- Coman, M. M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2012). Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology*, *157*, 346-352.
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., & Rowland, I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research*, *591*, 276-289.
- Corbo, M. R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A., & Gobbetti, M. (2001). Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, *84*, 3, 551-561.

- Cruz, A., Buriti, F. C. A., De Souza, C. H. B., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 8, 344-354.
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Faria, J. A. F., Chaves, A. C. S. D., Carvalho, L. M. J. de, & Saad, S. M. I. (2011). Leites fermentados e iogurtes probióticos e prebióticos. In Saad, S. M. I., Cruz, A. G. da, & Faria, J. de A. F. (1), *Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas* (pp. 271-304). São Paulo, SP: Livraria Varela.
- Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Food Science and Technology*, 123-124, 421-444.
- Delgado, S., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G., & Mayo, B. (2007). Subtractive screening for probiotic properties of lactobacillus species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *Journal of Food Science*, 72, 310-315.
- Dos Santos, K. M. O., Bomfim, M. A. D., Vieira, A. D.S., Benevides, S. D., Saad, S. M. I., Buriti, F. C. A., & Egito, A. S. (2012). Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. *International Dairy Journal*, 24, 107-112.
- Douillard, F. P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T. E., Järvinen, H. M., Messing, M., ... Vos, W. M. (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genetics*, 9, 1-15.
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11):3449, 1-105.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. World Health Organization, London Ontario, Canada.
- Fontana, L., Bermudez-brito, M., Plaza-diaz, J., Munoz-quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 35-50.
- Galdeano, C. M., De Moreno De Leblanc, A., Vinderola, G., Bonet, M. E. & Perdígón, G. (2007). Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 485-492.
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., & Nazarro F. (2010). Functional foods and non-dairy probiotic food development: Trends, concepts and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 292-302.
- Gillor, O., Etzion, A., & Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti-andprobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 591-606.

González-Olivares, L. G., López-Cuellar, Z. L., Añorve-Morga, J., Franco-Fernández, M. J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., ... Rodríguez-Serrano, G. M. (2014). Viability and Proteolytic Capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during Cheese Ripening *Journal of Biosciences and Medicines*, 2, 7-12.

Guarner, F. & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 360, 512-518.

Hayes, M., Coakley, M. E., O'Sullivan, L., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., ... Ross, R. P. (2006). Cheese as a delivery vehicle for probiotic and biogenic substances. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 132-141.

Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., & Fleet, G. H. (2004). Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT - Food Science and Technology*, 37, 461-466.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.

Ibrahim, F., Ruvio, S., Granlund, L., Salminen, S., Viitanen, M., & Ouwehand, A. C. (2010). Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59, 53-59.

Isolauri, E.; Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2004). Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18, 299-313.

Isolauri, E. & Salminen, S. (2008). Probiotics: use in allergic disorders: a nutrition, allergy, mucosal immunology, and intestinal microbiota (NAMI) research group report. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42, 91-96.

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Application. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3, 39-48.

Karimi, R., Mortazavian, A. M., & Cruz, A. G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science and Technology*, 91, 283-308.

Kumar, R., Grover, S., & Batish, V. K. (2011). Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase- producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. *British Journal of Nutrition*, 105, 561-573.

Lee, Y. K., Puong, K. Y., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 925-930.

Liu, G., Griffiths, M. W., Wu, P., Wang, H., Zhang, X., & Li, P. (2011). *Enterococcus faecium* LM-2, a multi-bacteriocinogenic strain naturally occurring in "Byaslag", a traditional cheese of Inner Mongolia in China. *Food Control*, 22, 2, 283-289.

- Lollo, P. C. B., Cruz, A. G., Morato, P. N., Moura, C. S., Carvalho-Silva, L. B., Oliveira, C. A. F., ... Amaya-Farfan, J. (2012). Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *Journal of Dairy Science*, *95*, 3549-3558.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, *44*, 465-470.
- Maragkoudakis, P. A., Chingwaru, W., Gradisnik, L., Tsakalidou, E., & Cencic, A. (2010). Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *International Journal of Food Microbiology*, *141*, 91-97.
- Marco, M. L., Pavan, S., Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, *17*, 204-210.
- Maróstica Júnior, M. R., Cazarin, C. B. B., Lima, C. L., Vieira, V. C. C. (2013). Prebióticos, probióticos e simbióticos. In Pastore, G. M., Bicas, J. L., & Maróstica Júnior, M. R. *Biocientífica de alimentos* (pp. 389-402). São Paulo, SP: Editora Atheneu.
- Maruyama, L. Y., Cardarelli, H. R., Buriti, F. C. A., & Saad, S. M. I. (2006). Textura instrumental de Queijo Petit-Suisse potencialmente probiótico: Influência de diferentes combinações de gomas. *Revista Ciência Tecnologia de Alimentos*, *26*, 386-388.
- Marianelli, C., Cifani, N., & Pasquali, P. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*, *161*, 673-680.
- Mattia, A. & Merker, R. (2008). Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: pre-market approval or "Generally Recognized as Safe" notification. *Clinical Infectious Diseases*, *46*, 115-118.
- Mcclements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. (2009). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*, 48-67.
- Medici, M., Vinderola, C. G., & Perdígón, G. (2004). Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal*, *14*, 611-618.
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., & Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*, *132*, 1966-1970.
- Mumy, K. L., Chen, X., Kelly, C. P., & McCormick, B. A. (2008). *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by postinvasion signaling events. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, *294*, 599-609.

- Nueno-Palop, C., & NARBAD, A. (2011). Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 390-394.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 57-62.
- Okada, Y., Tsuzuki, Y., Hokari, R., Komoto, S., Kurihara, C., Kawaguchi, A., & Miura, S. (2009). Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-I κ B and SOCS gene expression. *International Journal of Experimental Pathology*, 90, 131-140.
- Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Oliveira, C. E. V., Gomes A. M. P., Pintado, M. M. E., Madureira, A. R. M. F.; ... Souza, E. L. (2014). Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Research International*, 64, 241-247, 2014.
- Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Queiroga, R. C. R. E., & Souza, E. L. (2012). Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola*, 69, 370-379.
- Ouwehand, A. C. & Salminen, S. J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 749-758.
- Perotti, M. C., Wolf, I. V., Addis, M., Comunian, R., Paba, A., & Meinardi, C. A. (2014). Incorporation of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp.) in Argentinean ovine cheese. *Dairy Science and Technology*, 94, 255-267.
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Cross, K. L., Parker, M. L., Bisignano, C., Wickham, M. S. J., ... Caggia, C. (2012). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. *Food Microbiology*, 31, 57-63.
- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, A. (2012). Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12, 433-440.
- Puupponen-Pimiä, R., Aura, A. M., Oksman-Caldentey, K. M., Myllärinen, P., Saarela, M.; Mattila-Sanholm, T.; & Poutanen, K. (2002). Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Foods Science and Technology*, 13, 2-11.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49, 619-625.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43, 1-7.

- Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M. ...Coppola, R. (2015). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastrointestinal tract. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 721-728.
- Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J.C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, 72, 31-37.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R... Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2, 361-367.
- Ribeiro E. P., Simões, L. G., & Jurkiewicz, C. H. (2009). Desenvolvimento de queijo Minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 19-23.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 1-16.
- Salva, S., Villena, J., & Alvarez, S. (2010). Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 82-89.
- Sanchez, B., Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., & Gueimonde, M. (2009). Probiotic Fermented Milks: present and future. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 1-10.
- Santillo, A., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sevi, A., Sinigaglia, M., & Albenzio, M. (2014) Functional Pecorino cheese production by using innovative lamb rennet paste. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 389-396.
- Santini, M. S. S., Koga, E. C., Aragon, D. C., Santana, E. H. W., Costa, M. R.; Costa, G. N.; & Aragon-Alegro, L. C. (2012). Dried Tomato-Flavored Probiotic Cream Cheese with *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Food Science*, 77.
- Servin, A. L. & COCONNIER, M. -H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17, 741-754.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262-1277.
- Snoeck, V., Goddeeris, B., & Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infection*, 7, 997-1004.
- Souza, C. H. B., & Saad, S. M. I. (2009). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physic-

chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 633-40.

Tripathi, M. K. & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.

Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 319-321.

Vinderola, C. G., Mocchiutti, P., & Reinheimer, J. A. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal Dairy Science*, 85, 721-729.

Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D. & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *L. acidophilus* and *L. casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 83, 1905-1911.

Vinderola, G., Zacarías, M. F., Bockelmann, W., Neve, H., Reinheimer, J., & Heller, K. J. (2012). Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology*, 30, 274-280.

Vinderola, G., Prosello, W., Molinari, F., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. (2009). Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 171-174.

WHO - The World Health Organization (WHO). (2004) Disponível em http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part2.pdf. Acesso: 02 dez 2014.

Wohlgemuth, S., Loh, G., & Blaut, M. (2010). Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 3-10.

Ziemer, C. J., & Gibson, G. R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8, 473-479.

Zhang, L., Zhang, X., Liu, C., Li, C., Li, S., Li, T... Yang, Z. (2013). Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 127-135.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA E LOCAL DE EXECUÇÃO

A produção de leite caprino e fabricação dos queijos de Coalho (Dos Santos et al., 2012) foram conduzidos na Embrapa Caprinos e Ovinos/Sobral, Brasil, sendo acondicionados em recipientes de isopor e mantidos refrigerados a 10 °C durante o transporte para a realização das análises *in vitro* (Figura 1). Para a análise de simulação das condições gastrointestinais utilizou-se o queijo adicionado da cepa de *L. rhamnosus* EM1107 a uma contagem inicial de células viáveis de 6,53 log UFC/g. A cepa também atuou como cultura starter para a fermentação do queijo. Para o ensaio de inibição das bactérias patogênicas foi utilizado queijo de coalho fabricado sem a adição da cultura bacteriana testada. As análises *in vitro* foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.



Figura 1. Queijos embalados à vácuo. Fonte: o autor (2014).

3.2 CEPAS TESTE E PREPARO DOS INÓCULOS

A cultura probiótica liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 foi obtida da "Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical" da Embrapa Agroindústria Tropical /Fortaleza, Ceará, Brasil. Os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foram

adquiridos da Coleção de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil); já a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis UFPEDA 414 e *Escherichia coli* UFPEDA 224 foram obtidas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Para a preparação dos inóculos, foram feitos repiques em ágar MRS (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA), para a cepa probiótica e em ágar BHI (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL), para as bactérias patogênicas, sendo incubadas por 24 h a 37 °C. Em seguida, as cepas probióticas e patogênicas foram inoculadas em caldo MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) e BHI (Sigma-Aldrich), respectivamente, para crescimento durante 18 h a 37 °C. Após esse período, as cepas foram centrifugadas (4500 g, 15min, 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (NaCl, 0,85%) e ressuspensas em solução salina estéril.

Para verificar os níveis desejados do inóculo de *L. rhamnosus* (8 log UFC/mL) e das bactérias patogênicas (*S. aureus*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* e *E. coli*) (6 UFC/mL), foi realizada a leitura da densidade óptica em um comprimento de onda de 625 nm (DO₆₂₅) por meio do espectrofotômetro (SF200DM- UV-Vís, Bel Engineering, Monza, Italy). Anteriormente, foi realizada a padronização da leitura no espectrofotômetro. Para essa padronização, a suspensão de cada uma das bactérias testadas foi diluída (de 10⁻¹ a 10⁻⁷) em solução salina estéril (NaCl, 0,85%), seguida das leituras no espectrofotômetro. As diluições foram subsequentemente plaqueadas e realizadas as contagens de células viáveis das bactérias, utilizando o método de Miles, Misra, Irwin (1938), em ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) e incubadas em condições anaeróbicas (BD Sistema de contentores GasPak™ EZ Anaerobe, Becton, Dickinson and Company, EUA) durante 48 h a 37 °C para o *Lactobacillus* e em ágar BHI (Sigma-Aldrich) incubadas sob condições aeróbicas por 24 h a 37 °C para as bactérias patogênicas.

3.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *L. rhamnosus* EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

O delineamento experimental para avaliação da sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas foi constituído por 4 grupos: dois grupos contendo amostras de queijo com *Lactobacillus rhamnosus*: Q1 e Q2 (com contagens iniciais de células

viáveis de 6,53 log UFC/g); e dois grupos do inóculo de *L. rhamnosus* em caldo MRS suplementado com cisteína a 5% (com contagens iniciais de células viáveis de 8 log UFC/mL): C1 e C2. Os grupos Q1 e C1 não foram expostos às condições gastrointestinais simuladas e os grupos Q2 e C2 foram expostos a essas condições. As amostras dos grupos acima mencionados foram acondicionadas em frascos de vidro (de 340 mL) esterilizados. Nos frascos dos grupos Q1 e Q2, os queijos foram macerados e distribuídos em quantidades de 25 g; nos frascos dos grupos C1 e C2, 1 mL do inóculo foi distribuído juntamente com 25 mL de caldo MRS. Todos os passos das condições gastrointestinais simuladas estão descritos na Quadro 1, incluindo as enzimas e pH dos compartimentos, o intervalo de tempo e as intensidades de agitação que foram usadas para simular os movimentos peristálticos.

Quadro 1. Condições utilizadas em cada etapa de digestão simulada

Etapa	Compartimento	Condições	Agitação (rpm)	pH Final	Tempo de exposição (min)
1	Antes da simulação	-	-	-	-
2	Boca	Solução de saliva (α -amilase)	200	6,9	2
3	Esôfago-estômago	Solução estomacal (pepsina)	130	5,5	10
4				4,6	10
5				3,8	10
6				2,8	20
7				2,3	20
8				2,0	20
9	Duodeno	Solução intestinal (pancreatina + sais biliares)	45	5,0	30
10	Íleo		45	6,5	60

Antes do início da simulação, foi feito o ajuste do pH em todos os estágios da digestão, utilizando uma amostra de queijo (25 g), bem como, uma amostra da bactéria (1 mL do inóculo a 8 log UFC/mL) em caldo MRS (25 mL de caldo). O pH de cada

amostra foi medido em cada etapa das condições gastrointestinais simuladas utilizando um potenciômetro (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil). Após acondicionamento das amostras nos frascos de vidro, todos os grupos foram mantidos durante 7 dias em armazenamento refrigerado a $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ que correspondeu ao tempo mínimo de vida de prateleira do queijo de coalho. A simulação consistiu em 10 etapas (Madureira et al., 2011a):

- **Etapa 1** (Antes da simulação): o queijo foi avaliado sob condições antes de sua ingestão.
- **Etapa 2** (Boca): a mastigação foi simulada utilizando uma solução de saliva preparada com 100 U/mL de α -amilase (Sigma, St. Louis MO, USA) diluída em solução de CaCl_2 a 1 mM. A solução de saliva foi adicionada em 25 g das amostras a uma taxa de 0,6 mL/min, durante 2 min. O pH foi ajustado para 6,9, utilizando solução de NaHCO_3 a 0,1M.
- **Etapas 3 a 8** (Esôfago-estômago): a solução de pepsina foi adicionada a uma taxa de 0,05 mL/mL para um total de 90 min. A solução de pepsina (Sigma) foi preparada em HCl a 0,1 N numa proporção de 25 mg/mL (AURA, 2005). Os pHs dessas etapas foram ajustados de acordo com o Quadro 1, utilizando solução de HCl a 1M.
- **Etapa 9** (Duodeno): foi adicionado solução intestinal a uma taxa de 0,25 mL/mL (LAURENT; BESANCON; CAPORICCIO, 2007). Essa solução foi preparada utilizando 2 g/L de pancreatina (Sigma) e 12 g/L de sais biliares (Sigma, St. Louis MO, USA), diluídos em solução de NaHCO_3 a 0,1 M. Para o ajuste do pH, adicionou-se solução de NaHCO_3 a 0,1 M.
- **Etapa 10** (Íleo): foi adicionado solução de NaHCO_3 a 0,1 M para um aumento do pH para 6,5 utilizando.

A simulação foi contínua, de modo que o volume de trabalho total aumentou em cada etapa (como acontece durante uma digestão real). Todas as soluções das enzimas foram preparadas em frascos e esterilizadas por filtração, utilizando membrana filtrante de 0,22 μm (Milipore, Billerica MA, USA) antes de serem utilizadas. Após esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação. Uma câmara de incubação (TE-424 TECNAL, Orbital Shaker Incubadora, São Paulo, SP, Brasil) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação mecânica foi usada para simular a temperatura do corpo humano e os movimentos peristálticos, com intensidades

semelhantes às atingidas em cada compartimento digestivo. A Figura 2 representa um esquema referente à adição das substâncias de cada etapa nas amostras que foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas.

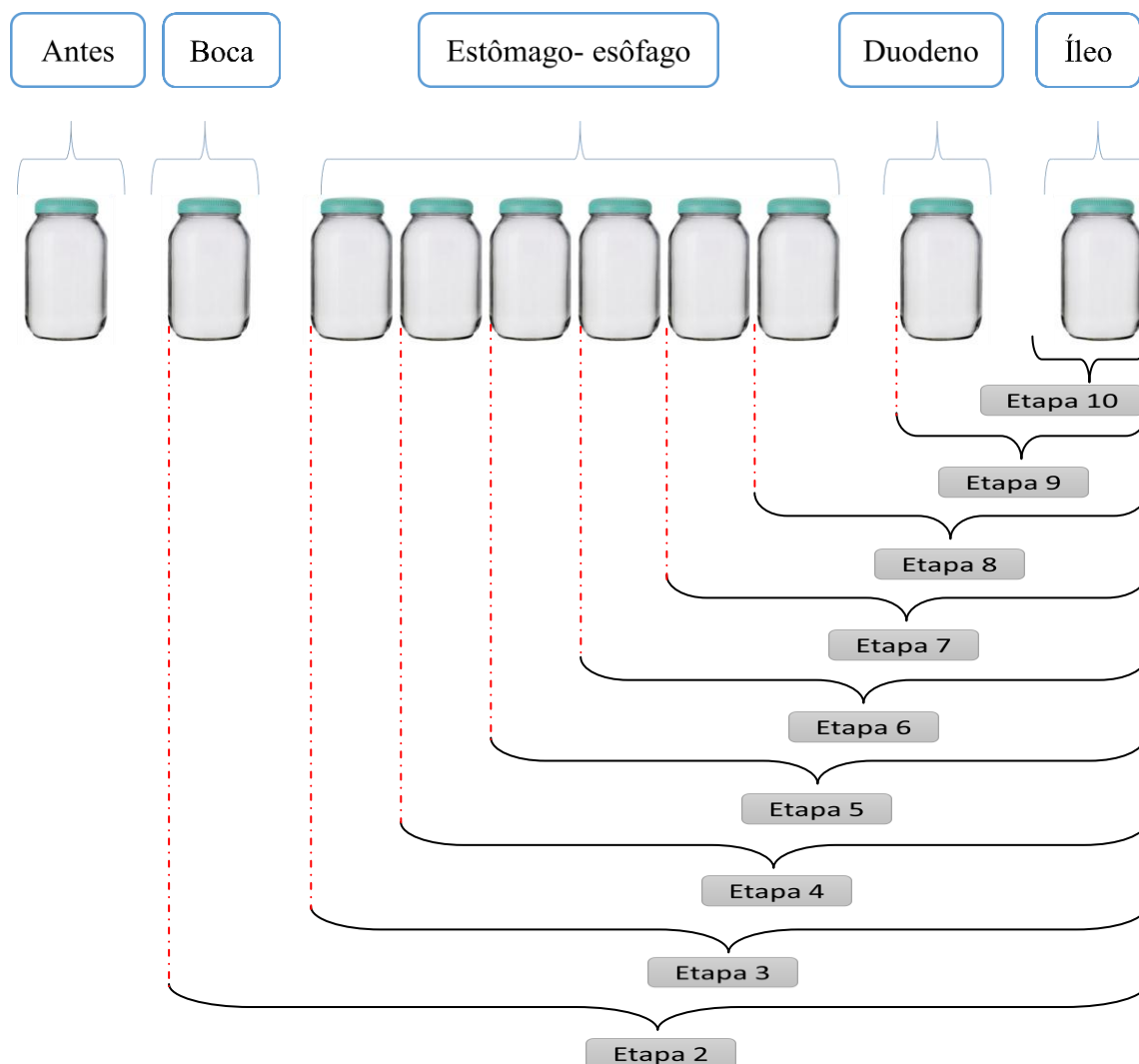


Figura 2. Representação esquemática da adição das substâncias de cada etapa nas amostras que foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas.

Ao final de cada etapa da exposição à digestão artificial, diluiu-se as amostras com 225 mL de água peptona [0,1 g/100 ml (Sigma, St. Louis, MO, EUA)] (diluição 1) e, em seguida, uma alíquota de 1 ml dos conteúdos, que representa cada condição no trato gastrointestinal, foram assepticamente recolhidas, para as subseqüentes diluições em série e submetidas à contagem de células viáveis de bactérias probióticas utilizando o método de Miles, Misra, Irwin (1938). *L. rhamnosus* foi plaqueado em ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) e incubado sob

condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h. Os resultados foram expressos como o log das unidades formadoras de colônias por cada grama de queijo (log de UFC/g). As contagens de células viáveis da bactéria testada foram realizadas pela técnica da microgota, conforme descrito por Oliveira et al. (2014).

3.4 ENSAIO DE EFEITO INIBITÓRIO DE *L. rhamnosus* CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Cerca de 25 g de queijo foram distribuídos em frascos de vidro (340 mL) estéreis. Para os grupos controles, foi elaborado um queijo controle positivo, adicionado apenas do inóculo contendo as bactérias patogênicas isoladas, assim como um queijo controle negativo, contendo apenas a bactéria probiótica isolada, além de uma amostra controle sem adição de nenhuma bactéria, totalizando 6 amostras controles. As amostras de queijos experimentais consistiram nos queijos adicionados de culturas mistas: inóculo da bactéria probiótica e inóculo da bactéria contaminante isolada, resultando em 4 amostras (cepa probiótica x 4 cepas patogênicas). As bactérias contaminantes foram inoculadas numa proporção de 1 mL de inóculo (contendo 6 log UFC/mL), para cada 25 g de queijo. A bactéria probiótica foi inoculada numa proporção de 1 mL de inóculo (contendo 8 log UFC/mL), para cada 25 g de queijo. Ao serem adicionadas ao queijo, essas contagens iniciais tem redução em torno de 2 log UFC/g, sendo que as contagens de células viáveis das bactérias probióticas apresentaram 6 log UFC/g e as contagens de células viáveis das bactérias patogênicas apresentaram 4 log UFC/g. Essas contagens para bactérias patogênicas foram utilizadas para simular os níveis de contaminação que podem ser encontrados para essa matriz alimentar, de acordo com estudos anteriores (FEITOSA et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2010; MENEZES et al., 2012).

Após a inoculação, todas as amostras de queijo inoculadas foram agitadas em misturador elétrico (Kenwood, UK) durante 5 min e armazenadas a 7 °C, durante 21 dias, correspondendo a um total de 40 amostras (10 amostras x 4 tempos de armazenamento) (Figura 3). Cada amostra foi submetida à contagem de células viáveis de bactérias probióticas e contaminantes no 1º, 7º, 14º e 21º dia de armazenamento refrigerado, utilizando-se a técnica da microgota. Para as contagens de células viáveis de *L. rhamnosus*, utilizou-se Ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL), que foi incubado em condições anaeróbicas (BD Sistema de

contentores GasPak™ EZ Anaerobe, Becton, Dickinson and Company, EUA), durante 48 h a 37 °C. Para *S. aureus*, utilizou-se Ágar de Manitol-cloreto de sódio-vermelho de fenol (MERK); para *S. Enteritidis*, Ágar Salmonella-Shigella (HIMEDIA Laboratories, Índia); para *L. monocytogenes*, Ágar Base Seletivo Listeria suplementado com Suplemento Seletivo Listeria (HIMEDIA Laboratories, Índia) e para *E. coli*, Ágar EMB, Levine (HIMEDIA Laboratories, Índia), todas incubadas durante 24 h a 37 °C (VANDERZANT; SPILTTSTOESSER, 1992). Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em log UFC. Para cada tempo de armazenamento, o grau de inibição (taxa de inibição) foi calculado como:

$$\text{Taxa de inibição} = [(N_{\text{controle}} - N_{\text{patógeno}}) / N_{\text{controle}}] * 100,$$

onde N_{controle} é o log (UFC/g) da bactéria patogênica adicionada isoladamente, e $N_{\text{patógeno}}$ é o log (UFC/g) da bactéria patogênica adicionada na presença da bactéria probiótica (MADUREIRA et al., 2011b).

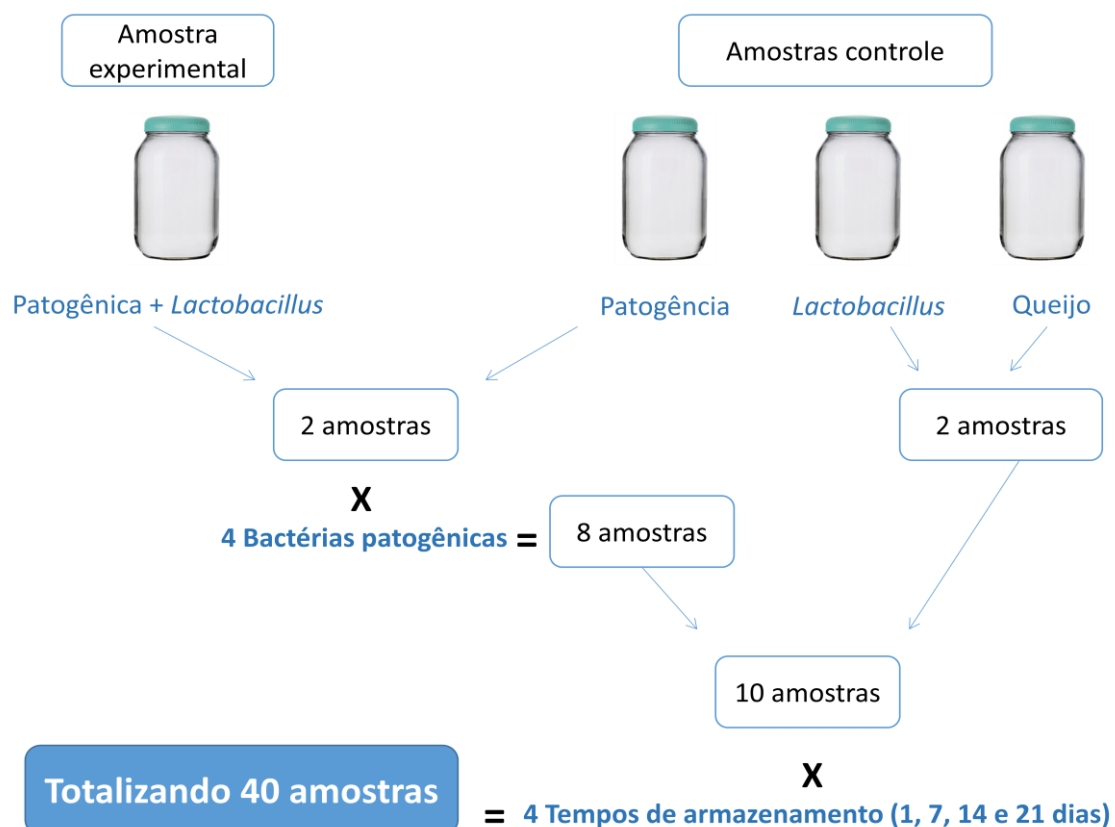


Figura 3. Desenho esquemático das amostras utilizadas no ensaio inibitório de *L. rhamnosus* contra bactérias patogênicas.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

O software Statistical Analysis System (SAS, 1999) foi utilizado para as análises estatísticas. Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey considerando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

AURA, A. -M. *In vitro* digestion models for dietary phenolic compounds. (PhD Thesis). Espoo, Finland: Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology, 2005.

BIGLIARDI, B.; GALATI, G. Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 118-129, 2013.

FAO/WHO, 2002. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. World Health Organization, London Ontario, Canada.

DE VUYST, L.; MAKRAS, L.; AVONTS, L.; HOLO, H.; YI, Q.; SERVIN, A.; FAYOL-MESSAOUDI, D.; BERGER, C.; ZOUMPOPOULOU, G.; TSAKALIDOU, E.; SGOURAS, D.; MARTINEZ-GONZALES, B.; PANAYOTOPOULOU, E.; MENTIS, A.; SMARANDACHE, D.; SAVU, L.; THONART, P.; NES, I. Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria. The first results of the international European research project PROPATH of the PROEUHEALTH cluster. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 16, n. 2-3, p. 125-130, 2004.

DOUILLARD, F. P.; RIBBERA, A.; KANT, R.; PIETILÄ, T. E.; JÄRVINEN, H. M.; MESSING, M.; RANDAZZO, C. L.; PAULIN, L.; LAINE, P.; RITARI, J.; CAGGIA, C.; LÄHTEINEN, T.; BROUNS, S. J. J.; SATOKARI, R.; OSSOWSKI, I. V.; REUNANEN, J.; PALVA, A.; VOS, W. M. Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 8, p. 1-15, 2013.

FEITOSA T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO É. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 162-165, 2003.

HASLER, C. M.; BROWN, A. C. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 4, p. 735-746, 2009.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Probiotics: use in allergic disorders: a nutrition, allergy, mucosal immunology, and intestinal microbiota (NAMI) research group report. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42 (Suppl. 2), p. 91-96, 2008.

KARAGOZLU, N.; KARAGOZLU, C.; ERGONUL, B. Survival Characteristics of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during Kefir Fermentation. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 25, n. 4, p. 202-207, 2007.

KASIMOZLU, A.; AKGÜN, S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, n. 5, p. 563-568, 2004.

KUMAR, H.; SALMINEN, S.; VERHAGEN, H.; ROWLAND, I.; HEIMBACH, J.; BAÑARES, S.; YOUNG, T.; NOMOTO, K.; LALONDE, M. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 99-103, 2015.

LAURENT, C.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1704-1712, 2007.

LIMA, J. R.; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; LUNA-FINKLER, C. L. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. **Revista Ciência & Saúde**, v. 7, n. 1, p. 27-34, 2014.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465-470, 2011a.

MADUREIRA, A.R.; PINTADO, M. E.; GOMES, A.M.; MALCATA, F. X. Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: Decreasing the risk of microbial contamination. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 1194-1199, 2011b.

MENESES, R. B.; CARDOSO, R. C. V.; GUIMARÃES, A. G.; GÓES, J. A. W.; SILVA, A. S.; ARGOLO, S. V. O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 381-392, 2011.

MILES, O.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 45, p. 41-45, 1938.

MILLETTE, M.; LUQUET, F. M.; LACROIX, M. *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 314-319, 2007.

MOORE, T.; GLOBALA, L.; BARBAREE, J.; VODYANOY, V.; SOROKULOVA, I. Antagonistic activity of *Bacillus* Bacteria against food-borne pathogens. **Journal of Probiotics & Health**, v. 1, n. 3, p. 1-6, 2013.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

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

OLIVEIRA, O. M. A. B.; BASTOS, M. S. R.; FONTENELE, M. A.; OLIVEIRA, C. W.; SILVA, A. P. V. Adequação da produção de leite para queijo coalho, conforme a Instrução Normativa nº 51. **Revista Higiene Alimentar**, v. 24, n. 182, p. 97-102, 2010.

PITINO, I.; RANDAZZO, C. L.; CROSS, K. L.; PARKER, M. L.; BISIGNANO, C.; WICKHAM, M. S. J.; MANDALARI, G.; CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 57-63, 2012.

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

SALVA, S.; VILLENA, J.; ALVAREZ, S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections, **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 82-89, 2010.

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

VANDERZANT, C.; SPILTTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: APHA, 1992.

WHO - The World Health Organization (WHO). (2004) Disponível em http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part2.pdf. Acesso: 15 jan 2015.

WOHLGEMUTH, S.; LOH, G.; BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 3-10, 2010.

ZHANG, L.; ZHANG, X.; LIU, C.; LI, C.; LI, S.; LI, T.; LI, D.; ZHAO, Y.; YANG, Z. Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 127-135, 2013.

5 RESULTADOS

A partir desse estudo, foram elaborados dois artigos:

- O artigo de revisão, situado nas páginas 16 a 39, intitulado "**Destaques em pesquisas com probióticos em queijos**" será submetido à *CyTA - Journal of Food* (online). Esta Revista apresenta fator de impacto de 0.495, sendo classificada como Qualis B2 na área de Ciência de Alimentos, pela CAPES.
- O artigo original, situado nas páginas 53 a 69, intitulado "**Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese**" foi enviado para a Revista *LTW - Food Science & Technology*, que apresenta fator de impacto de 2.468, sendo classificada como Qualis A2 na área de Ciências de Alimentos, pela CAPES.

5.1 ARTIGO ORIGINAL

SURVIVAL OF *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 IN SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS AND ITS INHIBITORY EFFECT AGAINST PATHOGENIC BACTERIA IN SEMI-HARD GOAT CHEESE

Submetido à Revista *LTW - Food Science & Technology*

Qualis A2; fator de impacto 2.468

Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese

Fernanda Rodrigues Leite Rolim^a, Karina Maria Olbrich dos Santos^b, Samuel Carneiro de Barcelos^b, Antônio Sílvio do Egito^b, Thais Santana Ribeiro^c, Maria Lúcia da Conceição^c, Marciane Magnani^d, Maria Elieidy Gomes de Oliveira^e, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga^{c*}

^a *Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil*

^b *Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, Brasil*

^c *Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil*

^d *Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil*

^e *Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Brasil*

*Endereço para correspondência. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil. Tel.: + 55 83 32167826.

E-mail address: rcqueiroga@uol.com.br (R.C.R.E. Queiroga)

Abstract

This study evaluated the viability of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 that was added to semi-hard goat cheese (Coalho) when exposed to simulated gastrointestinal conditions. The inhibitory effects of this strain against pathogenic bacteria in goat Coalho cheese were also evaluated during 21 days of refrigerated storage. After *in vitro* digestion, no change in the viable cell count of *L. rhamnosus* (6.75 log CFU/g) was observed compared with the count before exposure to oral conditions (6.55 log CFU/g). When evaluated against *S. aureus*, *L. rhamnosus* exhibited the inhibition rates of 1.55%, 1.7% and 21.66% at 7, 14 and 21 days of storage, respectively. Furthermore, against

Salmonella Enteritidis, the inhibition rates were 4.36%, 5.33% and 5.51% at 7, 14 and 21 days of storage, respectively; against *Escherichia coli* at 7 days of storage, the inhibition rate was 7.98%; and against *Listeria monocytogenes*, the inhibition rates were 2.62%, 1.57% and 10.23% at 7, 14 and 21 days of storage, respectively. These results indicate that goat Coalho cheese has a protective effect on the viability of *L. rhamnosus* EM1107 during artificial digestion. In addition, this strain could be used as a protective culture to delay the growth of pathogenic bacteria, particularly *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

Keywords: goat cheese, low-ripened cheese, probiotics, *Lactobacillus rhamnosus*.

1 Introduction

The growing consumer awareness of diet-related health has increased the demand for foods with distinct health-promoting effects (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, & Bressollier, 2013). Food-associated probiotics are living micro-organisms that, upon the ingestion of certain quantities, exert benefits to the consumer's health beyond the inherent basic nutrition (FAO/WHO, 2002). In addition, the inclusion of probiotics in food matrices can assist in maintaining their viability during human digestion, because to exert their beneficial effects on host health, probiotic bacteria must survive through the gastrointestinal tract, tolerating acids, bile salts and gastric enzymes, and then adhere to and colonize the intestinal epithelium (Huang & Adams, 2004; Ranadheera Evans, Adams, & Baine, 2012). Fermented dairy products, such as fermented milks and fresh cheeses, have been described as vehicles of interest for the incorporation of probiotic bacteria (Saxelin, 2008; Figueroa-González, Quijano, Ramirez, & Cruz-Guerrero, 2011). Due to a higher pH than most fermented dairy products as well as a high fat content, solid consistency and higher buffering capacity, cheeses can promote the viability of these bacteria not only throughout the product shelf-life but also during their passage through the gastrointestinal tract after consumption (Coman et al., 2012).

Goat Coalho cheese is a semi-hard cheese with intermediate to high moisture content, high yield and good acceptance among consumers (Oliveira, Garcia, Queiroga, & Souza, 2012; Garcia, Oliveira, Queiroga, Machado, & Souza, 2012). This product is produced mainly in northeastern Brazil, where goats have an important and significant

role in the socioeconomic development of the region, especially in poor and semi-arid areas (Queiroga et al., 2013). Although the production, processing and marketing of the global production of goat milk and its by-products are much lower than cow's milk, goat products are widely consumed worldwide (Gerosa & Skoet, 2012; Queiroga et al, 2013). Studies have reported the efficiency of goat Coalho cheese as appropriate matrix to serve as a vehicle for probiotic bacteria from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Another important finding was that the incorporation of the test strains did not cause changes in the product's quality characteristics but instead improved its sensory attributes (Garcia, Oliveira, Queiroga, Machado, & Souza, 2012; Oliveira, Garcia, Queiroga, & Souza, 2012; Dos Santos et al., 2012; Oliveira et al., 2014).

Furthermore, the incorporation of probiotic bacteria into cheese can promote additional advantages, as some strains can inhibit the growth of pathogenic bacteria in food matrices due to their production of substances such as organic acids, bacteriocins and fat and amino acid metabolites (Chen et al., 2007). Fresh and semi-hard cheeses, such as goat Coalho cheese, are among the foods predominantly involved in food outbreaks worldwide (Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, 2010; Almeida et al., 2013). *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. stand out among the prevalent pathogenic bacteria that are the etiologic agents of food outbreaks involving dairy products (Cokal, Dagdelen, Cenet & Gansen, 2012). Therefore, the addition of probiotic lactic cultures with recognized antimicrobial activity to cheeses can contribute to the maintenance of the microbiological quality of these products during storage (Costa, Suguimoto, Miglioranza, & Gomez, 2012).

Moreover, studies have investigated new strains exhibiting resistance to the adverse conditions of the human gastrointestinal tract that have physiological characteristics compatible with probiotic properties and technological relevance for use in food products (Ugarte, Guglielmotti, Giraffa, Reinheimer, & Hynes, 2006). In a previous study, the new *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 strain, isolated from bovine Coalho cheese was evaluated for technological, safety and functionality aspects and proven to be a promising probiotic candidate for use in fermented dairy products (Dos Santos et al., 2014). However, other analyses are mandatory to assess the viability of the strain as a probiotic micro-organism for these types of food matrices. Included among the requisite tests are the survivability of this strain incorporated into the product during simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against possible product

contamination (FAO/WHO, 2002). Thus, the present study was developed to evaluate the survival of *L. rhamnosus* EM1107 in goat Coalho cheese exposed to simulated gastrointestinal conditions, and the inhibition potential of *L. rhamnosus* EM1107 against *S. aureus*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *E. coli* and *L. monocytogenes* pathogenic bacteria in goat Coalho cheese was also evaluated over 21 days of refrigerated storage.

2. Material and methods

2.1 Coalho cheese

The cheeses used in the experiment were produced (Dos Santos et al., 2012) at Embrapa Goats and Sheep/Sobral, Brazil, packed in Styrofoam containers and kept refrigerated at 10 °C during transport to perform *in vitro* analyses. For the simulation of gastrointestinal conditions, cheese with a 6.53 log CFU/g viable cell count of *L. rhamnosus* EM1107 was used. This strain also served as the starter culture for cheese fermentation. To test the inhibition of pathogenic bacteria, fresh cheese manufactured without the addition of a test bacterial culture was used.

2.2 Test strains and preparation of inocula

The freeze-dried probiotic *L. rhamnosus* EM1107 culture was obtained from the "Collection of Micro-organisms of Interest for Tropical Agroindustry", Embrapa Tropical Agroindustry/Fortaleza, Ceará, Brazil. *S. aureus* ATCC 25923 and *L. monocytogenes* ATCC 7644 were acquired from the Collection of Reference Micro-organisms of the National Institute of Quality Control in Health (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). *S. enterica* serovar Enteritidis UFPEDA 414 and *Escherichia coli* UFPEDA 224 were obtained from the Department of Antibiotics at the Federal University of Pernambuco.

To prepare the inocula, subcultures were performed in MRS agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for the probiotic strain and in BHI agar (Sigma-Aldrich) for the pathogenic bacteria, and these cultures were incubated for 24 h at 37 °C. Then, the probiotic and pathogenic strains were inoculated into MRS (Sigma-Aldrich) and BHI broth (Sigma-Aldrich), respectively, to grow for 18 h at 37 °C. After this growth

period, the strains were centrifuged (4500 g, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution (0.85% NaCl) and resuspended in sterile saline solution. To verify the desired levels of *L. rhamnosus* (8 log CFU/mL) and pathogenic bacteria (*S. aureus*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* and *E. coli*; 6 log CFU/mL), a spectrophotometer (SF200DM- UV-Vís, Bel Engineering, Monza, Italy) was used to measure the optical density at a wavelength of 625 nm.

2.3 Survival of *L. rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions

The experimental design for assessing survival in simulated gastrointestinal conditions consisted of 4 groups. Two of these groups were the cheese samples with *L. rhamnosus* EM1107: Q1 and Q2 (6 log CFU/g), and the other two groups were *L. rhamnosus* EM1107 inoculum (8 log CFU/mL) in MRS broth supplemented with 5% cysteine: C1 and C2. Q1 and C1 were not exposed to simulated gastrointestinal conditions and Q2 and C2 were exposed to these conditions. Samples of the aforementioned groups were placed in sterilized glass jars (340 mL). In Q1 and Q2, the cheeses with the potential probiotic strain were macerated and distributed in 25 g amounts, and in C1 and C2, 1 mL of inoculum at an initial count of 8 log CFU/mL was distributed in 25 mL of MRS broth.

All steps of the simulated gastrointestinal conditions are described in Table 1, including the enzymes, compartment pH values, time intervals and agitation intensities that were used to simulate peristaltic movements. Before the simulation commenced, the pH was adjusted in all digestion stages using cheese (25 g) and bacterium samples (1 mL of inoculum containing 8 log CFU/mL) in MRS broth (25 mL of broth). The pH of each sample was measured at each stage of the simulated gastrointestinal conditions using a potentiometer (Model 021/15; Quimis, Sao Paulo, Brazil), which was periodically disinfected with ethanol (90% v/v). After conditioning the samples in glass jars, all groups were kept under refrigerated storage at 7 °C ± 2 °C for 7 days, which corresponds to the minimum shelf-life of Coalho cheese. This simulation consisted of the following 10 steps (Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata, 2011):

- Step 1 (before simulation): cheese was evaluated under the conditions present before ingestion.
- Step 2 (mouth): chewing was simulated using saliva solution prepared with 100 U/mL of α -amylase (Sigma, St. Louis MO, USA) diluted with 1 mM CaCl₂. The saliva

solution was added to 25 g of sample at a rate of 0.6 mL/min for 2 min. The pH was adjusted to 6.9 using a 0.1 M NaHCO₃ solution.

- Steps 3 to 8 (esophagus-stomach): a pepsin solution was added equal-sized aliquots at each step throughout this gastric phase at a rate of 0.05 mL/mL for a total of 90 min. The pepsin solution (Sigma) was prepared in 0.1 N HCl at a concentration of 25 mg/mL. The pH values at these stages were adjusted according to Table 1 using a 1 M HCl solution (Aura, 2005).
- Step 9 (duodenum): intestinal solution was added at the beginning of this step at a rate of 0.25 mL/mL (Laurent, Besancon, & Caporiccio, 2007). This solution was prepared using 2 g/L pancreatin (Sigma) and 12 g/L bile salts (Sigma, St. Louis MO, USA) and then diluted with a 0.1 M NaHCO₃ solution. For pH adjustment, 0.1 M NaHCO₃ was added.
- Step 10 (ileum): a solution of 0.1 M NaHCO₃ was added to increase the pH to 6.5.

Table 1. The conditions used during each stage of the simulated digestion.

Steps	Compartment	Conditions	Stirring (rpm)	Final pH	Time of exposure (min)
1	Before simulation	-	-	-	-
2	Mouth	Saliva	200	6,9	2
3		Pepsin		5,5	10
4				4,6	10
5	Esophagus–		130	3,8	10
6	stomach			2,8	20
7				2,3	20
8				2,0	20
9	Duodenum	Pancreatin + bile salts	45	5,0	30
10	Ileum		45	6,5	60

The simulation was continuous; thus, the total working volume increased at each stage (as occurs during real digestion). All enzyme solutions were prepared in flasks and sterilized by filtration using a 0.22 µm membrane filter (Millipore, Billerica, MA,

USA) before use. After sterilization, all solutions were maintained on an ice bath throughout the simulation period. A 37 °C incubation chamber with mechanical stirring (TE-424 TECNAL, Orbital Shaker Incubadora, São Paulo, SP, Brazil) was used to simulate both the body temperature and the intestinal peristaltic movements similar to those achieved in each digestive compartment.

At the end of each stage of exposure to artificial digestion, the samples were diluted with 225 mL of peptone water [0.1 g/100 mL (Sigma, St. Louis, MO, USA)] (dilution 1), and then 1 mL aliquots of the contents, representing each condition in the gastrointestinal tract, were aseptically collected for subsequent serial dilution and subjected to viable cell counting of the probiotic bacteria using the method of Miles, Misra &, Irwin (1938). *L. rhamnosus* was plated on MRS agar (Sigma-Aldrich) supplemented with cysteine-HCl (0.05 g/100 mL) and incubated under anaerobic conditions (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA) at 37 °C for 48 h. The results were expressed as the log of colony forming units per gram of cheese (log CFU/g). Viable cell counts were performed using the microdrop technique, as described by Oliveira et al. (2014).

2.4 Inhibitory effect of L. rhamnosus against pathogenic bacteria

Approximately 25 g of cheese were divided into sterile glass jars (340 mL). For the control groups, the positive control cheese was prepared by adding only inoculum containing the isolated pathogenic bacteria, the negative control cheese contained only the isolated probiotic bacteria, and a control sample lacked any added bacteria, totaling 6 control samples. The isolated bacteria were inoculated in a 1 mL inoculum (containing 6 log CFU/mL) for each 25 g of cheese, and the probiotic bacteria were inoculated in a 1 mL inoculum (containing 8 log CFU/mL) for each 25 g of cheese. The experimental cheeses consisted of cheeses with mixed cultures added: 1 mL of probiotic bacteria inoculum and 1 mL of isolated contaminant bacteria inoculum at the same bacterial concentration as previously mentioned, resulting in four samples (probiotic strain x 4 pathogenic strains). After inoculation, all inoculated cheese samples were shaken in an electric mixer (Kenwood, UK) for 5 min and stored at 7 °C for 21 days, which corresponded to 40 samples (10 samples x 4 storage times).

Each sample was subjected to a viable cell count of probiotic bacteria and contaminants at 1, 7, 14 and 21 days of refrigerated storage using the microdrop

technique. For the viable cell counts of *L. rhamnosus*, MRS agar (Sigma-Aldrich) supplemented with cysteine-HCl (0.05 g/100 mL) was used, which was incubated under anaerobic conditions (BD container system GasPak™ EZ Anaerobe, Becton, Dickinson and Company, USA) for 48 h at 37 °C. For *S. aureus*, mannitol-sodium chloride-phenol red agar (Merck) was used; for *S. Enteritidis*, Salmonella-Shigella Agar (HIMEDIA Laboratories, India); for *L. monocytogenes*, Listeria Selective Base Agar supplemented with Listeria Selective Supplement (HIMEDIA Laboratories, India); and for *E. coli*, EMB Levine Agar was used (HIMEDIA Laboratories, India). All agar plates were incubated for 24 h at 37 °C (Vanderzant & Spiltstoeser, 1992). All analyses were performed in duplicate and the results were expressed in log CFU. For each storage period, the inhibition degree (inhibition rate) was calculated as:

$$\text{Inhibition rate} = [(N \text{ control} - N \text{ pathogen}) / N \text{ control}] * 100,$$

where N control is the log CFU/g of the pathogenic bacteria added in isolation and N pathogen is the log CFU/g of the pathogenic bacteria added in the presence of the probiotic bacteria (Madureira, Pintado, Gomes, & Malcata, 2011).

2.5 Data analysis

The Statistical Analysis System software (SAS, 1999) was used for statistical analyses. The results were evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, both considering a significance level of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Survival in simulated gastrointestinal conditions

The viable cell counts of *L. rhamnosus* EM1107 in goat Coalho cheese (groups Q1 and Q2) and in MRS broth (groups C1 and C2), when either not exposed or exposed to simulated gastrointestinal conditions are shown in Fig. 1. In the groups not exposed to simulated gastrointestinal conditions, *L. rhamnosus* EM1107 showed viable cell counts in cheese (Q1) and MRS broth (C1) of 6.7 and 8.4 log CFU/mL, respectively. In the groups exposed to the simulation, a difference ($p < 0.05$) was observed in the viable cell count of this strain in the goat Coalho cheese (Q2) when compared with step 1

(before simulation; 6.53 log CFU/g) for the other digestion steps (between 6.1 and 7.68 log CFU/mL), except for the last step (ileum; 6.75 log CFU/g), where no difference was observed ($p > 0.05$). Thus, at the end of cheese digestion, the probiotic strain maintained its viability. These counts corroborate literature, indicating that to achieve their beneficial effects, the viable probiotics should be present in the food at a minimum level ranging from 6 to 9 log CFU/g (Vinderola et al., 2008; Plessas, Bosnea, Alexopoulos, & Bezirtzoglou, 2012).

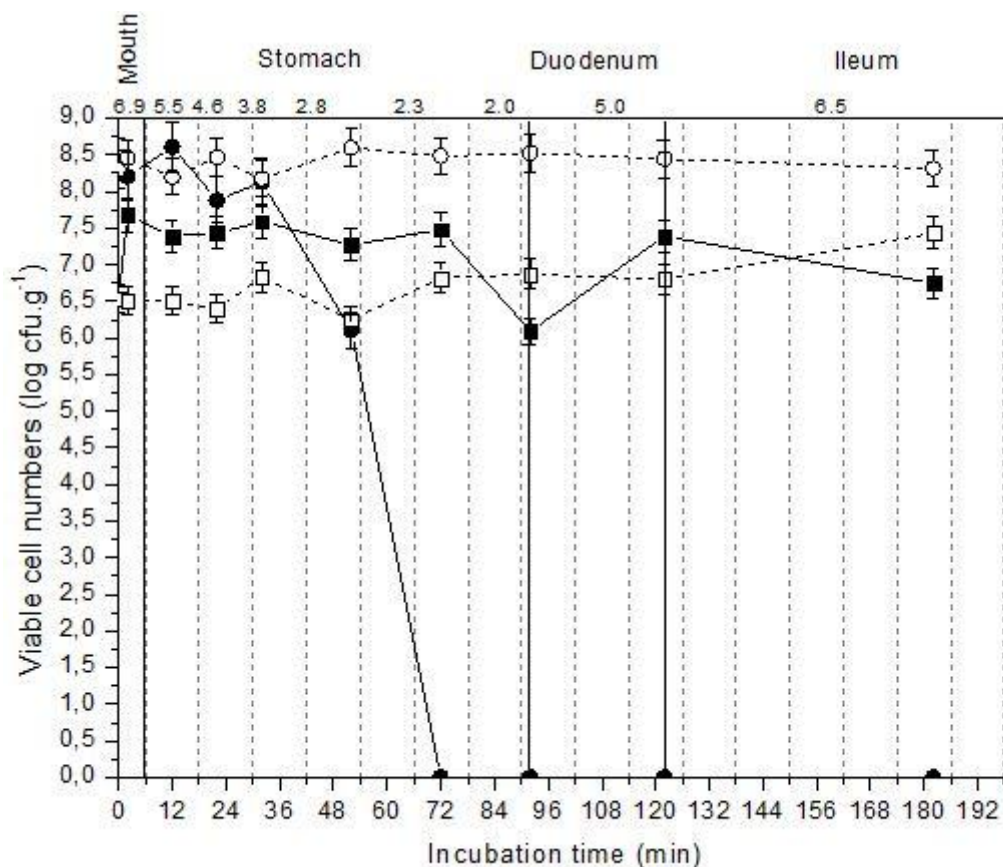


Fig. 1. The viable cell counts (average \pm standard deviation) of *L. rhamnosus* EM1107, when inoculated in MRS broth (\circ, \bullet) or in cheese (\square, \blacksquare), and either exposed (\bullet, \blacksquare) or not (\circ, \square) the simulated gastrointestinal conditions over different incubation times. The pH values that the bacteria were exposed to are indicated in the upper left corner.

When *L. rhamnosus* EM1107 was added to MRS broth (C2) and subjected to simulated gastrointestinal conditions, a reduction in the counts after step 6, or after 52 min of *in vitro* simulation (pH 2.8), was observed, which corresponded to a reduction of 2.2 log CFU/g compared with initial counts. After 72 min of stomach simulation (step 7), when the strain was exposed to pH 2.3, cell death was observed. In a previous study

that evaluated the survival of *L. rhamnosus* 1107 under simulated gastric and intestinal conditions, where the strain cultivated overnight in MRS broth was exposed to pH 2.5 for 60 min and to an artificial duodenal secretion for 3 hours, and Dos Santos et al. (2014) observed a reduction of 2.46 log CFU/mL at the end of the assay, which started from an initial inoculum of 9.10 log CFU/mL. The difference between the results obtained by these authors and those of this study for the same bacterial strains can be explained by the different models for simulating the digestive steps, particularly the step including the mouth that used α -amylase for the saliva solution in the model tested herein. Another factor that may have influenced this difference was the exposure of *L. rhamnosus* M1107 to a gradual pH reduction in the stages of the simulated stomach conditions. Thus, the model used in this study more realistically reflects the conditions faced by cells during digestion, because it involves all compartments of the gastrointestinal tract (from mouth to ileum) and uses different pH gradients in the stomach, which typically occurs in digestion (Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata, 2011).

After the exposure of cheese containing *L. rhamnosus* EM1107 (Q2) to simulated mouth conditions (step 2), there was a 1.15 log CFU/g increase ($p < 0.05$) compared with the original counts (step 1). Similar behavior was reported by Oliveira et al. (2014) and Madureira Amorim, Gomes, Pintado and Malcata (2011), who evaluated the survival of *Bifidobacterium lactis* (BB12) in goat Coalho cheese and *B. animalis* Bo in a cheese whey matrix, respectively, using the same digestion model that was used in this study. The simulated esophagus-stomach conditions of the present study were characterized by a steady pH reduction. However, the *L. rhamnosus* EM1107 added to goat Coalho cheese maintained its number of viable cells through step 8, i.e., after 92 min in contact with the gastric juice (pH 2.0). This same result was observed in a study by Oliveira et al. (2014), who used goat Coalho cheese as a vehicle for *B. lactis* (BB12), *L. acidophilus* (LA-5) and *L. casei* subsp. *paracasei* (*L. casei* 01). This viability is most likely due to the high buffering capacity of goat Coalho cheese, which kept the bacterial cells protected from the low stomach pH in these steps.

In step 9 (duodenum), the goat Coalho cheese samples were exposed to an intestinal solution composed of pancreatin and bile salts at pH 5, and at the end of this step (after 122 min), there was no difference in the *L. rhamnosus* EM1107 viable cell counts (7.30 log CFU/g; $p > 0.05$) compared with the counts when the micro-organism reached this compartment (6.09 log CFU/g). However, an increasing trend was

observed (1.3 log CFU/g). This increase may be due to the deconjugation ability of the bile salts in the tested strain (Dos Santos et al., 2014), as this feature can improve the survival of probiotic bacteria in the intestinal environment (Begley, Hill, & Gahan, 2006). After simulated digestion of the ileum (step 10), following 182 min of digestion, the viable cell counts of *L. rhamnosus* were maintained, most likely due to the neutral pH (6.5) of this compartment. Similar results in the ileum stage were reported by Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, and Malcata (2011) for multiple strains (*L. casei* LAFTI® L26, *L. acidophilus* LAFTI® L10 and *B. animalis* Bo) added to cheese from milk whey.

Thus, at the end of *in vitro* digestion, *L. rhamnosus* exhibited the same number of viable cells as were present at the beginning of digestion. In contrast, when in MRS broth, the strain lost viability at the end of digestion. These results indicated that goat Coalho cheese had a protective effect during the exposure of *L. rhamnosus* to simulated gastrointestinal conditions. Previous studies have reported that dairy matrices such as fermented milks and semi-hard fresh cheeses are good vehicles for probiotic bacteria to protect the cells during the stress imposed by gastrointestinal conditions, allowing these bacteria to reach the intestine and exert beneficial effects on the host (Pitino et al., 2012; Oliveira et al., 2014). The most convincing arguments refer to the physical and chemical characteristics of these matrices, such as higher pH value, higher buffering capacity, better nutrient availability, low oxygen content and high fat content in combination with protein density, which makes the matrix more solid (Cruz, Buriti, Souza, Faria, & Saad, 2009; Karimi et al., 2011; Mirzaei, Pourjafar, & Homayouni, 2012; Pitino et al., 2012).

3.2 Inhibitory effect of *L. rhamnosus* against pathogenic bacteria

When combined with pathogenic bacteria, *L. rhamnosus* M1107 counts from 5.8 to 6.6 log CFU/g during the 21 days of refrigerated storage (data not shown). This indicates that the probiotic strain remained viable to exert its inhibitory effect against pathogenic bacteria during the storage period. The inhibition times (inhibition rates) caused by *L. rhamnosus* against *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *L. monocytogenes* are shown in Fig. 2. *L. rhamnosus* EM1107 showed inhibition rates against *S. aureus* of only 1.55 and 1.7% after 7 and 14 days of storage, respectively (Fig. 2A). However, after 21 days of refrigerated storage, the inhibition rate was 21.66% for this pathogenic micro-organism. Against *S. Enteritidis*, the inhibition rates were 4.36%, 5.33% and

5.51% after 7, 14 and 21 days of storage, respectively (Fig. 2B). Against *E. coli*, *L. rhamnosus* showed an inhibition rate of 7.98% after 7 days of storage (Fig. 2C). Against *L. monocytogenes*, the inhibition rates on days 7, 14 and 21 were 2.62%, 1.57% and 10.23%, respectively (Fig. 2D). Based on these results, *L. rhamnosus* EM1107 is more effective against *S. aureus* and *L. monocytogenes* on day 21 of refrigerated storage.

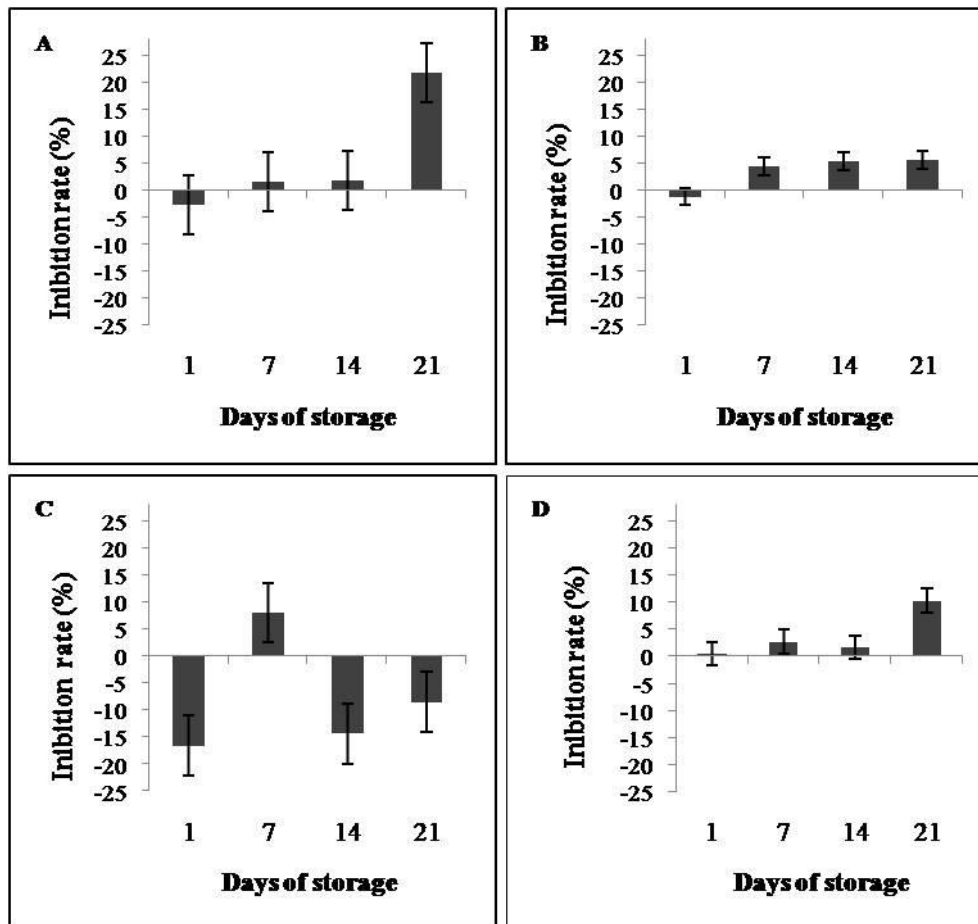


Fig. 2. Time course of inhibition (inhibition rate expressed as average \pm standard deviation) of *S. aureus* (A), *S. Enteritidis* (B), *E. coli* (C) and *L. monocytogenes* (D) brought about by *L. rhamnosus* EM1107, in goat coalho cheese, during 21 days of storage at 7 °C.

The ability of *L. rhamnosus* to inhibit pathogenic bacteria was described in a previous study in which Douillard et al. (2013) evaluated 100 *L. rhamnosus* strains isolated from Universities and Hospitals and observed that most strains showed inhibitory effects on the growth of *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* and *L. monocytogenes*. The exclusion or reduction capacity of enteropathogens is one of the most important characteristics attributed to certain lactic acid bacteria (LAB) strains. In

general, this effect is due to the production of various compounds during the fermentative metabolism of LAB, such as organic acids, antibacterial peptides and active proteins (Chen et al., 2007; Marianelli, Cifani, & Pasquali, 2010). When probiotic strains are capable of exhibiting antimicrobial activity against spoilage and pathogenic bacteria within the matrix in which they are incorporated, their potential for industrial application is increased, because in addition to performing their probiotic effect, they may contribute to an increase in product shelf life (Costa, Suguimoto, Miglioranza, & Gomez, 2012).

4. Conclusions

Goat Coalho cheese proved to be an effective matrix to carry *L. rhamnosus* EM1107 along the gastrointestinal tract, ensuring that this strain was supplied in satisfactory amounts to the intestine (6.75 log CFU/g). Furthermore, this strain delayed the growth of *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *L. monocytogenes* in goat Coalho cheese during refrigerated storage for 21 days. Therefore, this study demonstrated the potential of this strain of *L. rhamnosus* to be used as a protective culture, delaying the growth of pathogens commonly associated with goat Coalho cheese, particularly *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from Brazilian agencies EMBRAPA (project 02.09.01.024.00), CNPq, and CAPES, and the technical assistance of José dos Santos Tabosa in goat cheese manufacturing.

References

- Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., et al. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 303-309.
- Aura, A. -M. (2005). *In vitrodigestion models for dietary phenolic compounds*. (PhD Thesis). Espoo, Finland: Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology.

Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1729-1738.

Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., & Fang, W. (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 307-312.

Cokal, Y., Dagdelen, A., Cenet, O., & Gunsen, U. (2012). Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional foods, Mihalic cheese and Hosmerim dessert. *Food Control*, 26, 337–340.

Coman, M. M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2012). Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 346-352.

Costa, G. N., Suguimoto, H. H., Miglioranza, L. H. D. S., & Castro Gomez, R. J. H. (2012). Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “*in vitro*”. *Semina: Ciências Agrárias*, 33, 1839-1846.

Cruz, A. G. da, Buriti, F. C. A., Souza, C. H. B. de, Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 344-354.

Dos Santos, K. M. O., Bomfim, M. A. D., Vieira, A. D. S., Benevides, S. D., Saad, S. M. I., Buriti, F. C. A., et al. (2012). Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. *International Dairy Journal*, 24, 107-112.

Dos Santos, K. M. O., Vieira, A. D. S., Buriti, F. C. A., Nascimento, J. C. F., Melo, M. E. S., Bruno, L. M., et al. (2014). Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science & Technology*. DOI: 10.1007/s13594-014-0201-6

Douillard, F. P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T. E., Järvinen, H. M., Messing, M., et al. (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genetics*, 9, 1-15.

FAO/WHO. (2002). Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.

Figuroa-González, I., Quijano, G., Ramírez, G., & Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics- perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1341-1348.

Garcia, E. F., Oliveira, M. E. G., Queiroga R. C. R. E., Machado, T. A. D., & Souza, E. L. (2012). Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 947-956.

Gerosa, S. & Skoet, J. (2012). Milk availability e Trends in production and demand and medium-term outlook. Rome (Italy): FAO, United Nations. <http://www.fao.org/docrep/015/an450e/an450e00.pdf>.

Huang, Y. & Adams, M. C. (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 253-260.

Karimi, R., Mortazavian, A. M., & Gomes Da Cruz, A., (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technology*, 91, 283-308.

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and source of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21, 805-815.

Laurent, C., Besançon, P., & Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*, 100, 1704-1712.

Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44, 465-470.

Madureira, A. R., Pintado, M. E., Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (2011). Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: Decreasing the risk of microbial contamination. *Journal of Food Protection*, 74, 1194-1199.

Marianelli, C., Cifani, N., & Pasquali, P. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*, 161, 673-680.

Miles, O., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 45, 41-45.

Mirzaei, H., Pourjafar, H., & Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*, 132, 1966-1970.

Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Oliveira, C. E. V., Gomes, A. M. P., Pintado, M. M. E., Madureira, A. R. M. F., et al. (2014). Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Research International*, 64, 241-247.

Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Queiroga, R. C. R. E., & Souza, E. L. (2012). Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria *Scientia Agricola*, 69, 370-379.

Pitino, I., Randazzo, C. L., Cross, K. L., Parker, M. L., Bisignano, C., Wickham, M. S. J., et al. (2012). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. *Food Microbiology*, *31*, 57-63.

Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, A. (2012). Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. *Engineering in Life Sciences*, *12*, 433-440.

Queiroga, R. C. R. do E., Santos, B. M., Gomes, A. M. P., Monteiro, M. J., Teixeira, S. M., Souza, E. L., et al. (2013). Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and Technology*, *50*, 538-544.

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, *49*, 619-625.

Saxelin, M. (2008). Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a European perspective. *Clinical Infectious Diseases*, *46*, 76-79.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, *50*, 1-16.

Ugarte, M. B., Guglielmotti, D., Giraffa, G., Reinheimer, J., & Hynes, E. (2006). Nonstarter Lactobacilli Isolated from Soft and Semihard Argentinean Cheeses: Genetic Characterization and Resistance to Biological Barriers. *Journal of Food Protection*, *12*, 2824-3051.

Vanderzant, C., & Spilttstoesser, D. F. (1992). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. (3^a ed.). Washington: APHA.

Vinderola, G., Capellini, B., Villareal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., & Reinheimer, J. (2008). Usefulness of a set of simple *in vitro* test for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology*, *41*, 1678-1688.