



**RENORBIO**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO *PETIT-SUISSE* ADICIONADO  
DE CULTURA COM POTENCIAL PROBIÓTICO A PARTIR DO  
LEITE DESNATADO DE BÚFALAS**

**Josué de Souza Oliveira**

**RECIFE – PE**

**2018**



**RENORBIO**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO *PETIT-SUISSE* ADICIONADO  
DE CULTURA COM POTENCIAL PROBIÓTICO A PARTIR DO  
LEITE DESNATADO DE BÚFALAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Ponto Focal: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial. Linha de Pesquisa: Tecnologia de Alimentos

**Josué de Souza Oliveira**

**Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto**

**Co-Orientadora: Ana Paula Trovatti Uetanabaro**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

O48d Oliveira, Josué de Souza.  
Desenvolvimento de queijo Petit-Suisse adicionado de cultura com potencial probiótico a partir do leite desnatado de búfalas / Josué de Souza Oliveira. – Recife, 2018.  
106 f. : il.

Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.  
Coorientadora: Ana Paula Trovatti Uetanabaro.  
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2018. Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Inclui referências e anexos.

1. Leite bubalino 2. *L. Fermentum* 3. *L. plantarum*  
I. Porto, Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Uetanabaro, Ana Paula Trovatti III. Título

CDD 620.8

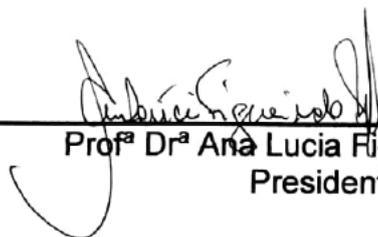
**JOSUÉ DE SOUZA OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO *PETIT-SUISSE* ADICIONADO  
DE CULTURA COM POTENCIAL PROBIÓTICO A PARTIR DO  
LEITE DESNATADO DE BÚFALAS**

Tese apresentada a Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para  
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2018 por:



---

Profª Drª Ana Lucia Figueredo Porto  
Presidente



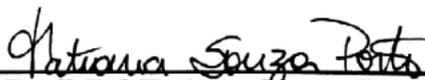
---

Profª Drª Cristina Maria de Souza Motta  
1ª Examinadora



---

Profª Drª Tânia Lúcia Montenegro Stamford  
2ª Examinadora



---

Profª Drª Tatiana Souza Porto  
3ª Examinadora



---

Profª Drª Raquel Pedrosa Bezerra  
4ª Examinadora

À minha esposa Luciana e minha filha Luiza que estiveram ao meu lado me motivando e apoiando na realização deste trabalho. A toda minha família que sempre apostou e acreditou no meu crescimento acadêmico, em especial minha mãe por ter sido a referencia de caráter e humanidade.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo por me conceder saúde, serenidade, sabedoria, paz e força para superar as dificuldades.

A toda minha família, minha esposa Luciana e minha filha Luiza, minha mãe Maria da Paz e meus irmãos por acreditar em meu potencial e sempre ter me apoiado durante toda a minha vida acadêmica.

A todos (as) os (as) professores (as) que colaboraram com a minha vida acadêmica desde ao ensino fundamental ao doutorado.

À querida professora Ana Lucia Figueredo Porto, minha orientadora, que topou este desafio sem ter previamente me conhecido e esteve ao meu lado, me incentivando com otimismo durante este trabalho.

À minha querida co-orientadora e amiga, professora Ana Paula Trovatti Uetanabaro, grande incentivadora deste trabalho, pelo acompanhamento irrestrito e apoio para execução deste trabalho.

Ao professor Jacques Robert Nicoli e a equipe Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos da UFMG pela grande contribuição e apoio para a execução deste estudo.

Ao Instituto Federal de educação, Ciência e Tecnologia Baiano – *Campus Uruçuca*, que financiou parte do experimento e me possibilitou o uso das instalações do Centro e Tecnologia de Alimentos para realização de parte do experimento.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pelo apoio de material para a realização deste experimento.

Aos colegas e alunos do NUTEC/CTA, em especial a professora e amiga Cristiane Pereira de Lima que também contribuiu grandemente nesta trajetória.

À Fazenda Diamantina (Ipiaú, Bahia, Brasil) pelo fornecimento do leite de búfalas.

Enfim, a todos (as) os amigos (as) e colegas que torceram e colaboraram para concretização deste sonho.

Muitíssimo Obrigado!!!

"Nada no mundo se compara à persistência. Nem o talento; não há nada mais comum do que homens malsucedidos e com talento. Nem a genialidade; a existência de gênios não recompensados é quase um provérbio. Nem a educação; o mundo está cheio de negligenciados educados. A persistência e determinação são, por si sós, onipotentes. O slogan "não desista" já salvou e sempre salvará os problemas da raça humana".

Calvin Coolidge

## RESUMO

A utilização do leite de búfalas e de micro-organismos obtidos da fermentação do cacau para a produção de alimentos probióticos é inédita. O presente trabalho objetivou desenvolver um queijo tipo *petit-suisse* utilizando como base o leite de búfalas desnatado e lactobacilos isolados da fermentação do cacau. Para avaliar os efeitos da utilização de edulcorantes sobre a qualidade do queijo *petit-suisse*, foram elaboradas quatro formulações com diferentes concentrações de edulcorantes, sendo avaliadas as características físico-químicas, a composição centesimal, a qualidade microbiológica e sensorial. Os efeitos da incubação, do uso de edulcorantes e lactobacilos sobre a qualidade do *petit-suisse* produzido por coagulação enzimática foram avaliados a partir do preparo de seis tratamentos, variando o tempo de incubação (0 e 12 horas), a concentração de edulcorantes (0 e 50%) e a adição de lactobacilos (sem lactobacilos, com o *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, com o *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 e simultaneamente esses dois lactobacilos), através da avaliação das características físico-químicas, da viabilidade dos lactobacilos e dos aspectos sensoriais durante a estocagem. A avaliação dos efeitos da utilização dos lactobacilos na qualidade do queijo *petit-suisse* foi obtida a partir da preparação quatro formulações: sem adição de lactobacilos (controle), adicionados de *L. fermentum* TcUESC01 (Lferm), *L. plantarum* TcUESC02 (Lplan) e simultaneamente esses dois lactobacilos (Lplan+Lferm), avaliando as características físico-químicas, a viabilidade dos lactobacilos, a composição química, o perfil de textura instrumental, a qualidade microbiológica e sensorial. O potencial probiótico dos lactobacilos foi avaliado utilizando ensaios *in vitro* (antagonismo) e *in vivo* (mortalidade, translocação, morfometria, histopatologia, determinação de IgA e expressão de citocinas) realizado em camundongos desafiados com a *Salmonella Typhimurium*. As formulações com 50%, 75% e 100% de edulcorantes foram classificadas como “light” e a com 100% de edulcorantes, como “diet”. Na avaliação sensorial, os tratamentos com 25% e 50% foram os mais aceitos nos atributos sabor e impressão global, também mais preferidos, apresentando intenção de compra de 76% dos provadores. O queijo produzido com adição dos dois lactobacilos simultaneamente, sem a adição de edulcorantes e sem incubação apresentou o melhor resultado na avaliação sensorial durante o período de 42 dias de estocagem. As amostras de queijo com lactobacilos apresentaram viabilidade superior a 7,00 log UFC/g durante a estocagem. Todas as formulações foram denominadas como “Isentos de gorduras totais” e atenderam os limites preconizados na legislação brasileira na composição química, viabilidade de probióticos e avaliação microbiológica. As formulações Lplan e Lferm se destacaram como promissores para o desenvolvimento de um queijo tipo *petit-suisse* probiótico com leite de búfala isento de gorduras. O *L. fermentum* TcUESC01 e *L. plantarum* TcUESC02 mostraram ser probióticos potenciais com base em melhores resultados obtidos por avaliações *in vitro* (maior produção de compostos com atividade antimicrobiana), bem como experimentos *in vivo* (maior sobrevivência após o desafio do enteropatógeno e produção de IgA no íleo, menor translocação hepática e splênica do enteropatógeno, lesões histopatológicas mais baixas no fígado e melhor padrão anti-inflamatório demonstrado através da expressão de citocinas).

Palavras chave: Leite Bubalino, *L. Fermentum*, *L. plantarum*.

## ABSTRACT

The use of milk from buffaloes and microorganisms obtained from the fermentation of cocoa for the production of probiotic foods is still little known. The present work aimed to develop a petit-suisse type cheese using skimmed buffalo milk and lactobacillus isolated from the cocoa fermentation. To evaluate the effects of the use of sweeteners on the quality of petit-suisse cheese, four formulations with different concentrations of sweeteners were elaborated, being evaluated the physical-chemical characteristics, the centesimal composition, the microbiological and sensorial quality. The effects of incubation, the use of sweeteners and lactobacilli on the quality of petit-suisse produced by enzymatic coagulation were evaluated from the preparation of six treatments, varying the incubation time (0 and 12 hours), the concentration of sweeteners (0 and 50%) and the addition of lactobacilli (without lactobacilli, with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, with *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 and simultaneously with these two lactobacilli), through the evaluation of physico-chemical characteristics, viability of lactobacilli and sensorial aspects during storage. The evaluation of the effects of the use of lactobacilli on the quality of petit suisse cheese was obtained from the preparation of four formulations: without addition of lactobacilli (control), added with *L. fermentum* TcUESC01 (Lferm), *L. plantarum* TcUESC02 (Lplan) and simultaneously, these two lactobacilli (Lplan + Lferm), evaluating the physico-chemical characteristics, lactobacilli viability, chemical composition, instrumental texture profile, microbiological and sensorial quality. The probiotic potential of lactobacilli was evaluated using in vitro (antagonistic) and in vivo (mortality, translocation, morphometry, histopathology, IgA determination and cytokine expression) assays performed in mice challenged with *Salmonella Typhimurium*. The formulations with 50%, 75% and 100% of sweeteners were classified as "light" and with 100% sweeteners, as "diet". In the sensory evaluation, the treatments with 25% and 50% were the most accepted in the flavor and overall impression attributes, also more preferred, with the intention of buying 76% of the tasters. The cheese produced with addition of the two lactobacilli simultaneously, without the addition of sweeteners and without incubation presented the best result in the sensorial evaluation during the period of 42 days of storage. Samples of cheese with lactobacilli showed viability greater than 7.00 log CFU / g during storage. All formulations were designated as "Free of total fats" and met the limits recommended in Brazilian legislation on chemical composition, probiotic viability and microbiological evaluation. The Lplan and Lferm formulations stand out as promising for the development of a probiotic petit-suisse type cheese with fat-free buffalo milk. *L. fermentum* TcUESC01 and *L. plantarum* TcUESC02 were potential probiotics based on better results obtained by in vitro evaluations (higher production of compounds with antimicrobial activity), as well as in vivo experiments (greater survival after challenge of enteropathogen and production of IgA in the ileum, lower hepatic and splenic enteropathogen translocation, lower histopathological lesions in the liver and better anti-inflammatory pattern demonstrated by cytokine expression).

Key words: Bubalino milk, *L. Fermentum*, *L. plantarum*.

## Lista de Figuras

ARTIGOS DERIVADOS DA TESE .....	29
Avaliação da qualidade do queijo tipo <i>petit-suisse</i> de búfalos elaborado a partir leite desnatado com diferentes Níveis de edulcorantes.....	31
Figura 1- Fluxograma Para Fabricação do Queijo <i>Petit-Suisse</i> Utilizando Leite De Búfala Desnatado.....	34
Figura 2- Aceitação sensorial das amostras de queijo <i>petit-suisse</i> utilizando escala hedônica para os atributos impressão global, cor, consistência e sabor.....	41
Efeitos da incubação, do uso de edulcorantes, leite bubalino desnatado e lactobacilos isolados da fermentação do cacau sobre a qualidade do <i>petit-suisse</i> produzido por coagulação enzimática.....	46
Figura 1- Valores da acidez Dornic (°D) durante a estocagem sob refrigeração do queijo tipo <i>petit-suisse</i> .....	53
Figura 2- Curva de pH durante a estocagem sob refrigeração do queijo tipo <i>petit-suisse</i> .....	54
Figura 3 – Viabilidade de bactérias lácticas (log UFC/g) durante a estocagem sob refrigeração do queijo tipo <i>petit-suisse</i> .....	56
Development of a <i>petit-suisse</i> cheese with skimmed buffalo milk with probiotic potential by addition of lactobacilli obtained from fermentation of Brazilian cocoa.....	61
Figure 1- Values of Dornic acidity (°D) during storage ( $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ) of <i>petit-suisse</i> cheese.....	68
Figure 2- pH curve during storage ( $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ) of <i>petit-suisse</i> cheese.....	69
Figure 3 - Sensorial acceptance of <i>petit-suisse</i> cheeses made with buffalo skimmed milk with the addition of probiotic lineages.....	74
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	80
Figure 1 - Survival of mice treated with <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 (LF+ST), <i>Lactobacillus plantarum</i> TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	89
Figure 2 - Translocation of <i>Salmonella</i> Typhimurium ( $\log_{10}$ CFU/g of organ) to spleen (A) and liver (B) in mice treated with <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 (LF+ST), <i>Lactobacillus plantarum</i> TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	90

Figure 3 - Total IgA (ng/g of ileum content) in the ileum fluid of mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (A - LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (B – LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only treated with *Lactobacillus plantarum* TcUESC02. Only colorless colonies on MacConkey agar were considered.....91

Figure 4 - Ileum villus heights (A) and number of hepatic inflammatory foci (B) in mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only treated with *Lactobacillus plantarum* TcUESC02.....92

Figure 5 - mRNA relative expression of cytokines (IL-17, TGF- $\beta$ , IL-10) in ileum of mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only treated with *L. plantarum* TcUESC02.....93

Figure 6 - mRNA relative expression of cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) in ileum of mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only.....94

## Lista de Tabelas

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
Tabela 1- Lista de Alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde para os alimentos/ingredientes aprovadas pela Anvisa.....	10
ARTIGOS DERIVADOS DA TESE.....	29
Avaliação da qualidade do queijo tipo <i>petit-suisse</i> de búfalos elaborado a partir leite desnatado com diferentes níveis de edulcorantes. ....	31
Tabela 1 – Formulações com diferentes concentrações de sacarose e edulcorantes..	35
Tabela 2 – Características físico-químicas, composição química e nutricional do queijo <i>petit-suisse</i> com diferentes combinações de edulcorante e sacarose .....	38
Tabela 3 - Resultados Teste de Ordenação para preferências dos julgadores .....	42
Efeitos da incubação, do uso de edulcorantes, leite bubalino desnatado e lactobacilos isolados da fermentação do cacau sobre a qualidade do <i>petit-suisse</i> produzido por coagulação enzimática. ....	46
Tabela 1 – Tratamentos das amostras do queijo tipo <i>petit-suisse</i> .....	50
Tabela 2 – Acompanhamento do sabor (SA – Sem Alteração, CA – Com Alteração) durante a estocagem sob refrigeração do queijo tipo <i>petit-suisse</i> .....	57
Development of a <i>petit-suisse</i> cheese with skimmed buffalo milk with probiotic potential by addition of lactobacilli obtained from fermentation of Brazilian cocoa.....	61
Table 1 - Lactic bacteria count (log UFC*/g) during storage of <i>petit-suisse</i> cheese under refrigeration.....	71
Table 2 - Centesimal composition of <i>petit-suisse</i> cheese samples .....	72
Table 3 - Instrumental texture profile of <i>petit-suisse</i> cheeses .....	73
Table 4 - Results of the preference of the judges on the <i>petit-suisse</i> cheese made with buffalo skimmed milk with the addition of probiotic lineages through the Ordination test.....	76
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation ( <i>Theobroma cacao</i> L.). ....	80
Table 1 - <i>In vitro</i> antagonism (diameter of inhibitory zone in mm ± standard deviation) of <i>Lactobacillus plantarum</i> TcUESC02 and <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 against indicator pathogenic bacteria .....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL ou LAB – Bactérias ácido lácticas

AAB – Bactérias ácido acéticas

DCNTs – Doenças Crônicas não Transmissíveis

DHA – Ácido Docosaheptaenóico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization)

FOS – Fruto oligossacarídeo

IFN – Interferon

IG – Imunoglobulina

IL-8 – Interleucina 8

NK – Natural de Killer

WHO – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

CEBIO – Biotério Central

CEUA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

ICB/UFMG – Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais

BHI – Caldo de Infusão de Cérebro e Coração

MRS – Man, Rogosa e Sharpe

CFU/ml – Unidade Formadora de Colônia/mililitro

PBS – Phosphate Buffer Saline

IgA – Imunoglobulinas Tipo A

Elisa – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

HE – Hematoxilina e Eosina

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA-free – Livre de RNA

cDNA – DNA Complementar

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

IFN- $\gamma$  – Interferon gamma

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

TGF- $\beta$  – Fator de Crescimento Transformador Beta

TNF- $\alpha$  – Fatores de Necrose Tumoral Alfa

GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

DCs – Células dendríticas

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitogênio

LPS – Linha Celular Estimulada

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	2
2.	OBJETIVOS .....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1	Industrialização do leite bubalino .....	6
3.2	Queijo tipo <i>petit-suisse</i> .....	7
3.3	Alimentos para fins especiais.....	8
3.4	Alimentos funcionais .....	9
3.5	Probióticos .....	11
3.6	Bactérias ácido lácticas.....	15
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
5.	ARTIGOS DERIVADOS DA TESE.....	29
	Avaliação da qualidade do queijo tipo <i>petit-suisse</i> elaborado a partir leite desnatado bubalino com diferentes níveis de edulcorantes.....	31
	Efeitos da incubação, do uso de edulcorantes e lactobacilos isolados da fermentação do cacau sobre a qualidade do <i>petit-suisse</i> elaborado a partir do leite desnatado bubalino.....	46
	Development of a petit-suisse cheese with skimmed buffalo milk with probiotic potential by addition of lactobacilli obtained from fermentation of Brazilian cocoa.....	61
	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	80
6.	CONCLUSÕES .....	102
	ANEXO 01 – Comprovantes de Submissões dos Artigos .....	105

---

Capítulo 1

Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

O leite de búfala apresenta características peculiares que permitem sua fácil identificação sob o ponto de vista físico-químico e sensorial. Tem sabor ligeiramente adocicado, é mais branco que o leite bovino, devido à ausência quase total de caroteno (provitamina A) em sua gordura. Quando comparado ao leite de vaca, apresenta diferenças na composição, devido à presença de maior porcentagem de seus constituintes, principalmente, gordura e proteína, os quais conferem um maior teor de sólidos totais, e são responsáveis pelas características físicas (estrutura, cor, sabor) do leite e dos seus derivados (BRITO & DIAS, 1998; PINTO et al., 2016). Tais características conferem um maior rendimento industrial e melhores características nos derivados, principalmente nos diversos tipos de queijo.

Segundo Araújo e Gheller (2005), o leite de búfala apresenta uma melhor qualidade microbiológica e menor contagem de células somáticas do que o leite dos bovinos, devido a maior concentração de moléculas antimicrobianas como a lactoferrina e lactoperoxidase, e também, maior eficácia antibacteriana dos leucócitos bubalinos.

Devido às qualidades nutricionais e o alto rendimento industrial, o processamento do leite bubalino vem ganhando destaque. Além do queijo tipo muçarela italiano, os laticínios têm elaborado vários derivados a partir deste leite. Os produtos variam de acordo com a região e hábitos culturais onde estes são produzidos, sendo encontrados diversos tipos de queijos, doce de leite pastoso e em tabletes, manteiga, produtos fermentados, leite em pó e sorvete (DA SILVA, 2014). É importante salientar que nenhuma legislação federal

estabelece atualmente os padrões de qualidade para o leite de búfalas e seus derivados produzidos no Brasil.

Em virtude do aumento da procura por produtos saudáveis e atrativos, especificamente com o uso de probiótico por parte dos consumidores, o desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais abrangente e desafiador. Devido a essa grande tendência da aplicação da biotecnologia na produção de lácteos, especificamente com a utilização de probióticos, para alimentação faz-se necessário o estudo da importância desses bioativos para saúde humana, e na utilização na indústria de lácteos (BARRETTO et al., 2016).

Atualmente é desconhecido o uso do leite de búfalas para a produção do queijo *petit-suisse* bem como os efeitos da utilização de culturas probióticas de *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 neste tipo de leite. Desta forma, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um queijo *petit-suisse* produzido a partir do leite desnatado de búfalas adicionado de probióticos como uma proposta para desenvolvimento de novos produtos, sendo esta uma alternativa econômica para a bubalinocultura regional.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral:**

- ✓ Desenvolver e avaliar a qualidade do queijo tipo *petit-suisse* produzido a partir do leite de búfalas desnatado adicionado de lactobacilos com potencial probiótico (*Lactobacillus fermentum* TcUESC01 e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02).

## 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Produzir queijo *petit-suisse* com leite de búfalas desnatado utilizando-se diferentes concentrações de edulcorantes;
- ✓ Elaborar queijo *petit-suisse* com leite de búfalas desnatado utilizando-se as linhagens *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02;
- ✓ Avaliar a viabilidade das linhagens microbianas utilizadas como probióticos nas diferentes formulações de queijos *petit-suisse* durante o período da vida de prateleira;
- ✓ Caracterizar as diferentes formulações de queijo *petit-suisse* através das análises físico-químicas durante o período da vida de prateleira;
- ✓ Avaliar o perfil de textura instrumental das diferentes formulações de queijo *petit-suisse*;
- ✓ Avaliar a qualidade microbiológica do queijo *petit-suisse*;
- ✓ Determinar a composição química e nutricional das diferentes formulações;
- ✓ Realizar a avaliação sensorial das diferentes formulações do queijo *petit-suisse*;
- ✓ Avaliar o potencial probiótico do *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02.

---

## Capítulo 2

# Revisão Bibliográfica

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Industrialização do leite bubalino**

A bubalinocultura leiteira vem se destacando pelo relevante papel na produção de alimentos, assim como no desenvolvimento socioeconômico de países de clima tropical devido seu leite apresentar satisfatória qualidade nutritiva e bom rendimento industrial, principalmente em queijos e iogurtes, quando comparados com o leite bovino, além da espécie apresentar maior precocidade, docilidade, prolificidade, rusticidade e adaptabilidade, o que permite a sua criação em regiões alagadas, inadequadas para gado bovino (CASSIANO et al., 2003; BORGHESE e MAZZI, 2005; NERES et al., 2012; DA SILVA e DE NARDI JUNIOR, 2014).

Quando comparado com o bovino, o leite bubalino apresenta diferenças na composição devido à maior porcentagem de seus constituintes, principalmente, gordura, proteína e minerais os quais conferem um maior teor de sólidos totais, que são responsáveis pelas características físicas do leite e dos seus derivados, justificando assim, seu uso para elaboração de produtos lácteos. Tem sabor ligeiramente adocicado, é mais branco que o leite bovino, devido à baixa concentração de caroteno em sua gordura (GUIMARÃES et al., 2015; MACEDO et al., 2001 e BORGHESE e MAZZI, 2005). Além disso, apresenta uma melhor qualidade microbiológica e menor contagem de células somáticas do que o leite de bovinos, devido a maior concentração de substância antimicrobiana como a lactoferrina e lactoperoxidase, além de indícios de maior eficácia antibacteriana dos leucócitos bubalinos (ARAÚJO e GHELLER, 2005).

A produção de derivados lácteos a partir do leite de búfalas ainda é pouco estudada, seja pelo baixo volume produzido em comparação com o leite de vaca ou pelo pouco conhecimento da população a respeito das características deste leite, apesar de seu maior consumo ser através dos derivados. Além do queijo Muçarela italiano, diversos laticínios têm elaborado vários derivados a partir deste leite. Os produtos variam de acordo com a região e hábitos culturais onde estes são produzidos, sendo encontrados diversos tipos de queijos (frescal, ricota, provolone e outros), doce de leite pastoso e em tabletes, manteiga, produtos fermentados, leite em pó e sorvete (HAN et al., 2007), entretanto, é desconhecido o uso deste tipo de leite para a produção do queijo tipo *petit-suisse*.

### **3.2 Queijo tipo *petit-suisse***

O queijo tipo *petit-suisse* foi inventado pelo trabalhador suíço Charles Gervais, em 1950, em uma fábrica de queijos da Normandia (CHONG, 2013). Deve ser produzido a partir da coagulação do leite com coalho e/ou de enzimas específicas e/ou de bactérias específicas, a ser consumido fresco, não maturado, adicionado ou não de ingredientes opcionais não lácteos, até o máximo de 30% m/m. É comumente produzido industrialmente por centrifugação da coalhada, obtendo-se o queijo "quark", que é utilizado como base para o queijo *petit-suisse*, adicionando-se opcionalmente polpa de fruta, açúcar e gordura (VEIGA et al., 2000; BRASIL, 2000).

### 3.3 Alimentos para fins especiais

De acordo com a portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA), os alimentos para fins especiais são aqueles formulados ou processados, onde o conteúdo de nutrientes é modificado, adequados às utilizações em dietas diferenciadas e/ou opcionais, atendendo às necessidades de pessoas em condições metabólicas e fisiológicas específicas.

Para Brasil (1998b), eles podem ser classificados como alimentos para dietas com restrição de nutrientes (carboidratos, gorduras, proteínas, sódio e outros), para ingestão controlada de nutrientes (para controle de peso, prática de atividades físicas, nutrição enteral, controle açúcares e outros) ou para grupos populacionais específicos (lactentes e crianças, gestantes e nutrizes, idosos e outros).

A procura por produtos saudáveis tem crescido por parte dos consumidores, especificamente com redução de calorias, tornando o desenvolvimento de novos alimentos mais abrangente e desafiador. Devido a essa grande expansão no desenvolvimento de alimentos dietéticos (*diet*) e com redução de calorias e açúcares (*light*) para alimentação, faz-se necessário o estudo do comportamento dos produtos lácteos com adição de edulcorantes e redução significativa do teor de gorduras totais. Neste caso, os edulcorantes são utilizados nos alimentos em que se faz necessária a substituição parcial ou total do açúcar para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares e para dietas com restrição de açúcares (BRASIL, 2008a; CARDOSO et. al., 2004).

### 3.4 Alimentos funcionais

Sabe-se que determinados tipos de alimentos exercem efeitos benéficos sobre a saúde humana. Com isso, o estudo desses alimentos, atualmente denominados funcionais, e de seus componentes responsáveis por esses efeitos, tornou-se intenso nos últimos anos (BRAGA e BARLETA, 2017).

Os alimentos funcionais devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. Consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular as funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose, coronariopatias e infecções (SOUZA et al., 2003).

São considerados alimentos funcionais aqueles que além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, sendo que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (BRASIL, 2002).

O aumento no número de casos de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) como obesidade, hipertensão arterial sistêmica, osteoporose, diabetes *mellitus* e câncer, responsáveis por 72% das mortes no Brasil em 2013, trouxe como consequência, a preocupação com a qualidade da alimentação, levando a aderirem a padrões alimentares que beneficiem melhorias à saúde (SILVA et al., 2016).

As principais alegações de propriedade funcional ou de saúde para os alimentos/ingredientes estão apresentadas na tabela 1 (BRASIL, 2002).

Tabela 1- Lista de Alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde para os alimentos/ingredientes aprovadas pela Anvisa

Classes	Ingredientes funcionais	Benefícios*
Ácidos Graxos	Ômega 3 (EPA - Ácido Eicosapentaenóico e DHA – Ácido Docosahexaenóico).	Manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos
Carotenóides	Licopeno, Luteína, Zeaxantina	Antioxidante que protege as células contra os radicais livres.
Fibras Alimentares	Fibras alimentares, dextrina resistente, goma guar parcialmente hidrolisada, lactulose, polidextrose	Auxiliam o Funcionamento do Intestino.
	Beta glucana, psillium ou psyllium, quitosana	Auxilia na redução da absorção de colesterol.
	Fruto oligossacarídeo – fos, inulina (prebióticos)	Contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal
Fitoesteróis	Fito esteróis	Auxiliam na redução da absorção de colesterol.
Polióis	Manitol / xilitol / sorbitol	Não produz ácidos que danificam os dentes.
Probióticos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei shirota</i> <i>Lactobacillus casei variedade rhamnosus</i> <i>Lactobacillus casei variedade defensis</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium animalis (incluindo a subespécie b. Lactis)</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal.
Proteína de soja	Proteína de soja	Pode ajudar a reduzir o colesterol.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2008b.

\*Desde que associados a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

Os alimentos funcionais podem constituir um nicho de mercado extremamente rentável, pois são produtos com alto valor agregado e com um marketing atrativo na busca pelo consumo. Entretanto, o fabricante que for disponibilizar um alimento com alegação de propriedade funcional e/ou saúde no mercado deverá apresentar junto a Gerência Geral de Alimentos da Anvisa a comprovação de segurança de uso e eficácia do alimento por meio de um Relatório Técnico Científico onde deverá conter todo um histórico de procedência e evidências científicas do ingrediente funcional, além de ensaios clínicos, bioquímicos, nutricionais, fisiológicos, toxicológicos e estudos

epidemiológicos, que comprovem que naquela matriz escolhida é capaz de proporcionar sua atividade nutricional e o efeito da alegação previamente preconizada (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b).

### **3.5 Probióticos**

Embora o termo e sua definição tenham origem nos anos 90, o interesse por micro-organismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos, sendo que “probiótico” é derivado do grego e corresponde “para a vida” (SILVA, 2007).

Em 1910, Eli Metchnikoff, inseriu a ideia de que o consumo regular de leites fermentados proporcionava benefícios à saúde, favorecendo o revestimento do cólon, diminuindo o pH intestinal, levando a desaceleração do processo de envelhecimento. Os médicos do Oriente Médio prescreviam iogurtes e outros fermentados como terapia para infecções do trato gastrointestinal e também como estimulante para o apetite (DE CARLI, 2015) e assim, a longevidade dos camponeses da Bulgária foi associada ao consumo de leite fermentado (GORDON, 2008; JANCOVIC et al., 2010).

O conceito de probióticos vem sendo discutido desde o início dos anos 60 até os dias atuais. Em 1965, Lilly e Stillwell definiu probióticos como sendo "substâncias secretadas por um micro-organismo, que estimulam o crescimento de outro".

Em 1974, Parker denominou como sendo “suplementos alimentares incluindo micro-organismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal” e em 1989, Fuller definiu como “suplementos alimentares à base de

micro-organismos vivos, que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal”.

Na Alemanha, em 1995, em um seminário, o conceito de probióticos foi definido como “uma preparação microbiana composta por bactérias vivas e/ou mortas com inclusão de seus componentes e produtos, que ingerida por via oral ocasiona uma melhora no balanço microbiano ou enzimático nas superfícies podendo estimular ou não mecanismos imunológicos” (BARBOSA, 2011).

Atualmente, a definição mais aceita internacionalmente é da FAO/WHO (2002) que conceitua probióticos como micro-organismos vivos, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados regularmente e em quantidades adequadas.

São inúmeros os benefícios atribuídos à ingestão de probióticos. Ao serem ingeridos através dos alimentos, os probióticos vão para o intestino e ali se somam à microbiota já existente, equilibrando-a e, com isso, auxiliam o trabalho de absorção dos nutrientes (DE CARVALHO et. al., 2017).

Os principais benefícios dos micro-organismos probióticos são: síntese de vitaminas e enzimas digestivas como a lactase, proteases e peptidases; regulação do trânsito intestinal e a absorção dos nutrientes; normalização do colesterol e triglicerídeos plasmáticos; produção de ácidos graxos de cadeia curta; produção de enzimas citocromo P450-like, que estimulam a expressão gênica do citocromo no fígado favorecendo a desintoxicação hepática; ressíntese de hormônios já degradados; conversão de muitos flavonóides às suas formas ativas; auxílio na metabolização de medicamentos, hormônios, carcinógenos, metais tóxicos e outros xenobióticos; e desenvolvimento e a

maturação do sistema imune entérico e sistêmico (SAAD, 2006; LEE e SALMINEN, 2009; SANTOS, 2016; DE CARVALHO et. al., 2017).

A prevenção de doenças intestinais pela modulação do sistema imune e recomposição da microbiota intestinal é o efeito benéfico da terapia com probiótico mais estudado e ocorre através da produção substâncias antimicrobianas que agem sobre uma vasta gama de micro-organismos patogênicos; prevenção da adesão de patógenos através da competição por sítios receptores; atuação na manutenção da barreira mucosa intestinal, assim como na produção de anticorpos IgA (Imunoglobulina) intestinal e sérica, na atividade de fagócitos e na dos linfócitos matadores naturais NK (Natural Killer); redução da produção intestinal de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), Interferon (IFN) e interleucina (IL-8), e aumento da produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias (SAAD, 2006; LEE e SALMINEN, 2009; SANTOS, 2016).

Entretanto, Santos et al. (2011) destaca que as principais ações dos probióticos para inibição de bactérias patogênicas são: a competição por nutrientes, a produção de ácidos orgânicos, a competição pela aderência ao epitélio intestinal e a produção de bacteriocinas capazes de inibir o crescimento de micro-organismos. No entanto, é importante destacar que não há nenhuma espécie que proporcione todos os benefícios propostos, sendo muito específicos de cada micro-organismo (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Para Kempka et al. (2008), os probióticos devem apresentar algumas características fisiológicas e tecnológicas para garantir seus efeitos funcionais, como: ser capazes de produzir culturas viáveis em concentrações efetivas; possuir capacidade de ser ativados e multiplicados rapidamente; devem ser

tolerante às enzimas salivares, ácidos estomacais, sais biliares no intestino delgado e ácido orgânico volátil no intestino grosso; devem ser capazes de aderir às células epiteliais do intestino; não ser patogênico e nem produzir efeitos adversos para o hospedeiro; ser estáveis por longos períodos quando estocados; e devem apresentar baixa resistência a antibióticos e resistir a altas temperaturas de processamento. Estas características dependem da matriz alimentar utilizada, da origem dos micro-organismos, da espécie, do tipo de tratamento utilizado para obtenção do produto probiótico.

Conforme o protocolo da FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO) (2002), onde determina as diretrizes para avaliação de probióticos para uso em alimentos, as linhagens depositadas na coleção internacional devem sofrer avaliações de segurança *in vitro* e / ou em animais, avaliação das características funcionais e por último, a avaliação dos efeitos probióticos em humanos na matriz alimentar. No rótulo do produto deve ser informada a linhagem, o número mínimo de bactérias viáveis no final da vida útil, as condições de armazenamento adequadas e detalhes corporativos de contato para informações ao consumidor.

A resistência à acidez gástrica e aos ácidos biliares, a aderência ao muco e/ou células epiteliais humanas, a atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas, a capacidade de reduzir a aderência de agentes patogênicos às superfícies, a atividade da hidrolase de sal biliar e a resistência aos espermicidas (aplicável aos probióticos para uso vaginal) são os principais testes *in vitro* recomendados para avaliação do potencial probiótico. Já a determinação da resistência aos antibióticos, a avaliação das

atividades metabólicas (produção de D-lactato e desconjugação de sais biliares), a avaliação dos efeitos secundários durante estudos com seres humanos e a vigilância epidemiológica de incidentes adversos nos consumidores (pós-comercialização) são os teste recomendados para a validação de segurança dos probióticos (HOTEL, 2001).

### **3.6 Bactérias ácido lácticas**

Bactérias ácido lácticas (BAL) são micro-organismos Gram positivos que possuem características metabólicas, fisiológicas e morfológicas, semelhantes, se apresentado na forma de cocos, cocobacilos ou bacilos não formadores de esporos, tendo o ácido láctico como principal produto da fermentação dos carboidratos. Este grupo é formado por 13 gêneros bacterianos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (LUIZ, 2017).

Do ponto de vista da segurança dos alimentos, bactérias lácticas são consideradas seguras. Por este motivo têm sido utilizadas como cepas probióticas em uma grande diversidade de produtos disponíveis no mercado. Contudo, tais micro-organismos devem ser usados com precaução em certos grupos de pacientes, particularmente recém-nascidos prematuros ou com deficiência imune (BOYLE et al., 2006).

Os *Lactobacillus* possuem cerca de 80 espécies reconhecidas, são caracterizados por apresentar células longas e delgadas, às vezes bastões curtos e curvos, muitas vezes na forma de cocobacilo, apresentam pouca mobilidade (ZANINI et al., 2012).

Quanto ao metabolismo, podem ser homofermentativos (Exemplo: *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. Lactis* e *Lactobacillus helveticus*), facultativamente heterofermentativos (Exemplo: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*) ou heterofermentativos (exemplo: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri*) sendo que as espécies *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. brevis* podem apresentar as três vias fermentativas (JAY, 2005; LUIZ, 2017).

Vários lactobacilos homofermentativos e facultativamente heterofermentativos e alguns heterofermentativos são utilizados em alimentos fermentados (BURITI, 2007). Podem produzir enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando o substrato em substâncias com características sensoriais próprias, contribuindo para a modificação da estrutura e do aroma dos alimentos fermentados. Porém, o grupo do heterofermentativo está comumente associado à deterioração de alimentos (PIARD et al., 1999).

Os lactobacilos são microaerofílicos, desenvolvem-se em meio sólido, geralmente em condições de anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio, em temperaturas entre 2 a 53 °C, com temperatura ótima variando entre 30 a 40 °C (XAVIER RODRIGUES; SARTORI & BITENCOURT, 2013). São Acidúricos, com pH ótimo geralmente 5,5 a 6,2, desenvolvendo melhor em meio ácido fraco com pH inicial 6,4 a 4,5, cessando seu desenvolvimento quando pH próximo a 3,6 é atingido, dependendo da linhagem. Não hidrolisam gelatina e não produzem Indol e H<sub>2</sub>S. Somente algumas das espécies hidrolisam arginina, formando amônia (MACEDO et al., 2008).

Considerando as propriedades dos lactobacilos, as indústrias, principalmente as de laticínios, utilizam estes micro-organismos na produção

de alimentos, sendo um mercado promissor e em crescente desenvolvimento (SAWITZKI, 2008; BURITI e SAAD, 2007), sendo que algumas espécies de *Lactobacillus* spp. são usualmente empregadas como probióticos como: *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* ssp. *paracasei* e ssp. *tolerans*, *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (COLLINS et al., 1998; SAAD, 2006).

O *Lactobacillus plantarum* é encontrado em laticínios, carne, peixe, e em fermentações de muitos vegetais. Esta espécie provou uma certa capacidade de sobreviver no trânsito gástrico e colonizar o trato intestinal de seres humanos e outros mamíferos (ZAGO et al, 2011).

Várias linhagens desta espécie demonstraram potencial probiótico. Devido à sua importância em processos de fermentação, foi primeira espécie do gênero *Lactobacillus* a ter o seu genoma sequenciado. O sequenciamento posterior revelou diversidade entre as cepas isoladas de diferentes ambientes, o que explica a alta adaptabilidade desta espécie (PLAZA-DIAZ, 2014).

A linhagem 299v, originária do intestino humano e utilizada num probiótico já comercializado, reduziu “*in vitro*” a expressão de genes pró-inflamatórios e foi capaz de melhorar os sintomas de síndrome do intestino irritável em um estudo clínico com 200 pacientes (BÄUERL et al., 2013; MOLIN, 2001; ROKKA, 2006).

Já o *L. plantarum* Lp91, também isolado do intestino e identificado pelo sequenciamento 16S rRNA (GQ922598), demonstrou capacidade de imunorregulação em um modelo de colite induzida em camundongos (DUARY et al., 2012; GROVER et al., 2013).

Santos (2016), avaliando o potencial probiótico do *L. plantarum* Lp62, isolado a partir da fermentação cacau e identificados pela sequenciação do gene 16S rDNA (Número de acesso GenBank KU291427), observou efeito antiinflamatório em um modelo de colite induzido por ácido em camundongos, evidenciado pela redução dos níveis séricos de citocinas inflamatórias, elevação dos níveis de IgA e restauração tecidual do cólon. Esta linhagem modulou a resposta inflamatória em células epiteliais impedindo a adesão de *S. typhi*.

Melo et al. (2017), avaliando as propriedades biotecnológicas do *Lactobacillus plantarum* TCUESC02, também isolado da fermentação do cacau, verificou que esta linhagem apresenta as seguintes características:

- a) Viabilidade em grande espectro de pH, podendo ser aplicadas em diferentes tipos de matrizes alimentares;
- b) Viabilidade por 28 dias ao serem adicionadas em produto lácteo refrigerado (solução de leite desnatado estéril) em número acima do que é preconizado pelas diretrizes internacionais e a ANVISA;
- c) Sobrevivência às condições que mimetizam a passagem gastrointestinal;
- d) Satisfatória taxa de autoagregação e adesão em células HT-29 e boa capacidade de interação com a mucosa, para desempenho do seu benefício funcional;
- e) Boa capacidade de aderir aos enterócitos, coagregar com patógenos, além de produzir substâncias antimicrobianas;
- f) Bom perfil de resistência a antibióticos que permite a sua utilização em associação a terapia medicamentosa.

Saito et al. (2014) também observou resultados satisfatórios para tolerância à passagem no trato gastrointestinal simulada e viabilidade microbiana durante a fermentação, refrigeração e armazenamento de bebida fermentada de soja produzida com o *Lactobacillus plantarum* TcUESC02.

Já o *Lactobacillus fermentum* é heterofermentativo e é comumente encontrado em fermentação de materiais de origem animal e vegetal. Geralmente reconhecido como seguro, variedades desta espécie têm sido amplamente usados em vários alimentos fermentados, tendo também efeitos probióticos (SUN et al, 2015).

Avaliando o potencial probiótico da linhagem de *Lactobacillus fermentum* TCUESC01, isolada durante a fermentação do cacau, Melo et al. (2017) observou também que a mesma possui as seguintes propriedades:

- a) Permanece viável em um amplo espectro de pH, portanto, pode ser aplicada em diferentes tipos de plataformas alimentares;
- b) Mantem sua viabilidade acima das diretrizes internacionais e nacionais recomendadas, quando aplicada em um produto lácteo refrigerado, por até 28 dias de armazenamento;
- c) Sobrevive em condições que imitam a passagem gastrointestinal, permitindo sua chegada em quantidades indicadas para manutenção de seu potencial probiótico;
- d) Tem a capacidade de aderir a células intestinais, autoagregar e coagregar com agentes patogênicos humanos;
- e) Exibe também um perfil de suscetibilidade / resistência a antibióticos que permite a sua utilização em produtos juntamente com a terapia com fármacos.

Este comportamento foi semelhante ao obtido por Saito et al. (2014), que observou uma boa capacidade fermentativa, satisfatória viabilidade celular ao longo do armazenamento e superação, *in vitro*, às barreiras fisiológicas encontradas ao longo da digestão da linhagem de *Lactobacillus fermentum* TCUESC01 adicionada no extrato de soja.

---

Referências  
Bibliográficas

---

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, A.D. A.; BARLETA, V. C. N. Alimento funcional: uma nova abordagem terapêutica das dislipidemias como prevenção da doença aterosclerótica. Volta Redonda, **Cadernos UniFOA**, v. 2, n. 3, p. 100-120, 2017.

ARAÚJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. Belo Horizonte, **Revista Bras. Reprod. Anim**, v. 29, n. 2 p. 77-83, 2005.

BARBOSA, F. H. F. et al. Probióticos-microrganismos a favor da vida. Campina Grande, **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p. 11-21, 2011.

BARRETTO, L. C. de O. et al. Tendências biotecnológicas da indústria láctea a partir da prospecção de patentes e artigos. São Cristovão, **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 6, n. 4, p. 3583-3590, 2016.

BÄUERL, C. et al. *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* strains downregulate proinflammatory genes in an ex vivo system of cultured human colonic mucosa. **Genes & nutrition**, v. 8, n. 2, p. 165-180, 2013.

BORGHESE, A.; MAZZI, M.. Buffalo population and strategies in the world. Roma, **Buffalo production and research**, v. 67, p. 1-39, 2005.

BOYLE, R. J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; TANG, M. LK. Probiotic use in clinical practice: what are the risks?. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1256-1264, 2006.

BRASIL, 1998a. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Brasília. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA\\_27\\_1998.pdf/72db7422-ee47-4527-9071-859f1f7a5f29](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_27_1998.pdf/72db7422-ee47-4527-9071-859f1f7a5f29).

BRASIL, 1998b. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos para fins especiais. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Brasília. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA\\_29\\_1998.pdf/49240642-4002-48f4-8213-a1b74aa4bd32](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_29_1998.pdf/49240642-4002-48f4-8213-a1b74aa4bd32)

BRASIL, 1999a. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Brasília. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393821/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583O%2BN%25C2%25BA%2B18.pdf/ff96b58a-e4f9-4d53-ba2e-e11a63dcf8f0>

BRASIL, 1999b. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Brasília. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388845/RESOLUCAO\\_19\\_1999.pdf/99351bc5-99b1-49a8-a1fd-540b4096db22](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388845/RESOLUCAO_19_1999.pdf/99351bc5-99b1-49a8-a1fd-540b4096db22)

BRASIL, 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Tipo *Petit-Suisse*. Instrução Normativa Nº 53, de 29 de dezembro de 2000. Brasília. Disponível em: [http://www.agais.com/normas/leite/queijo\\_petit\\_suisse.htm](http://www.agais.com/normas/leite/queijo_petit_suisse.htm)

BRASIL, 2002. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Brasília, DF. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_02\\_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_02_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c)

BRASIL, 2008a. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. Brasília. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Microsoft%2BWord%2B-%2BResolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn%25C2%25BA%2B18%25C2%2Bde%2B24%2Bde%2Bmar%25C3%25A7o%2Bde%2B2008.pdf/4b266cfd-28bc-4d60-a323-328337bfa70e>

BRASIL, 2008b. Ministério da Saúde. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. In: Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. [http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno_lista_alega.htm) (Acessado em: 21.11.2016).

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n.4, p. 373-380, 2007.

CASSIANO, L. A. P. et al. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 38, n. 11, p. 1337-1342, 2003.

CARDOSO, J. M. P. et al. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 448-452, 2004.

DE CARLI, E. M. et al. CONTROLE DE SALMONELLA UTILIZANDO LACTOBACILLUS PARACASEI COMO PROBIOTICO. In: **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. 2015.

CHONG, L. B. Danone's Bitter Split-Up with Hangzhou Wahaha. In: **Managing a Chinese Partner**. Palgrave Macmillan UK, 2013. p. 7-61.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International dairy journal**, v. 8, n. 5-6, p. 487-490, 1998.

DA SILVA, S. L.; DE NARDI JUNIOR, G. Produção de derivados bubalinos e mercado consumidor. **Tekhne e Logos**, v. 5, n. 1, p. 15-30, 2014.

DE CARVALHO, F. L. O. et al. PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS: benefícios acerca da literatura. **Revista de Saúde UniAGES**, v. 1, n. 1, p. 58-87, 2017.

DUARY, R. K. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* Lp91 in colitis mouse model. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 4, p. 4765-4775, 2012.

HOTEL, A. C. P. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Prevention**, v. 5, n. 1, 2001.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotic in Food, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2017.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GORDON, S. E. Metchnikoff: father of natural immunity. **European journal of immunology**, v. 38, n. 12, p. 3257-3264, 2008.

GROVER, S. et al. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strain Lp91, a promising Indian probiotic isolate of human gut origin. **Genome announcements**, v. 1, n. 6, p. e00976-13, 2013.

GUIMARÃES, D. H. P.; SILVA, F. R. de S. R.; LÊNTHOLA, N. M. Yogurt produced with buffalo milk flavoured with cheese and guava jelly. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 57-61, 2015.

HAN, Bei-Zhong et al. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 742-746, 2007.

JANKOVIC, I. et al. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 175-181, 2010.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. *Modern Food Microbiology* 7th edition. Springer Science + Business Media. New York, NY, 2005.

KEMPKA, A. P. et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 1, p.170-177, Dez., 2008.

LEE, Y.K; SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and prebiotics**. 2ª ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc. 2009.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LUIZ, L. M. P. et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **CyTA-Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125-128, 2017.

MACEDO, L. N. et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MACEDO, M. P. et al. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p. 1084-1088, 2001.

MELO, T. A. et al. Functional profile evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: a new potential probiotic strain isolated during cocoa fermentation. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 380s-385s, 2001.

NERES, L. S. et al. Iogurte de leite de búfala saborizado com manga (*Mangifera indica* L.): aceitação sensorial e custo de produção. **Agroecossistemas**, v. 4, n. 2, p. 79-84, 2012.

OLIVEIRA, M. N. de et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

PAKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Anim Nutr Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PIARD, J. et al. Bacterias Lácticas. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 8, p. 80-84, 1999.

PINTO, Maria Raiane Machado et al. Avaliação microbiológica de queijo do Marajó tipo creme, de leite de búfala, elaborado em queijarias da Ilha do Marajó, Pará. **Scientia Plena**, v. 12, n. 6, 2016.

PLAZA-DIAZ, J. et al. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 42, p. 15632-15649, 2014.

ROKKA, S. et al. In vitro growth inhibition of *Helicobacter pylori* by lactobacilli belonging to the *Lactobacillus plantarum* group. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 5, p. 508-513, 2006.

SAAD, Susana Marta Isay. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAITO, V. S. T. et al. Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. **Journal of food science**, v. 79, n. 2, p. 208-213, 2014.

SANTOS, R. B.; BARBOSA, L. P. J.L; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p.27-35, 2011.

SANTOS, T. F. et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on intestinal epithelial and mononuclear cells. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

SAWITZKI, M. C. et al. *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 709-717, 2008.

SILVA, A. C. C. et al. Alimentos contendo ingredientes funcionais em sua formulação: revisão de artigos publicados em revistas brasileiras. **Conexão Ciência (Online)**, v. 11, n. 2, p. 133-144, 2016.

SILVA, A. S. S. et al. Frutoligossacarídeos: fibras alimentares ativas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 259-304. 2007.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135. 2003.

SUN, Z. et al. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus fermentum* F-6 isolated from raw milk. **Journal of biotechnology**, v. 194, p. 110-111, 2015.

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

VEIGA, P. G. et al. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo petit suisse brasileiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 20, n. 3, p. 349-357, 2000.

XAVIER RODRIGUES, M.; SARTORI FELKL, G.; BITENCOURT, J. V. M. Importância das bactérias lácticas para a indústria de alimentos. **UNINGÁ Review**, v. 13, n. 1, 2013.

ZAGO, M. et al. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1033-1040, 2011.

ZANINI, S. F et al. Identificação bioquímica e molecular de *Lactobacillus* spp. isolados do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1648-1654, 2012.

---

Capítulo 3  
Artigos Derivados da  
Tese

---

## 5. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

Artigos derivados da tese que serão submetidos para periódicos na área:

- a) Avaliação da qualidade do queijo tipo *petit-suisse* elaborado a partir leite desnatado bubalino com diferentes níveis de edulcorantes;
- b) Efeitos da incubação, do uso de edulcorantes e lactobacilos isolados da fermentação do cacau sobre a qualidade do *petit-suisse* elaborado a partir do leite desnatado bubalino;

Artigo derivado da tese submetido para:

Revista - **International Dairy Journal**

FATOR DE IMPACTO 2016 - 2016: 2.067 © Thomson Reuters JCR 2017

ISSN - 0958-6946

Classificação CAPES – B1 em Biotecnologia

1. **Development of cheese with probiotic potential from buffalo milk with addition of lactobacilli obtained obtained from fermentation of Brazilian cocoa.**

Artigo derivado da tese submetido para:

Revista - **Internacional Journal of functional foods**

FATOR DE IMPACTO 2016 - 3.144 ©Thomson Reuters JCR 2017

ISSN - 1756-4646

Classificação CAPES – A1 em Biotecnologia

2. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation (*Theobroma cacao* L.).**

## **Avaliação da qualidade do queijo tipo *petit-suisse* elaborado a partir leite desnatado bubalino com diferentes níveis de edulcorantes**

J.S. Oliveira<sup>1</sup>, A. P. T. Uetanabaro<sup>2</sup>, C.P. Lima<sup>1</sup>, I.O. Pereira<sup>1</sup>, A.L.F. Porto<sup>3</sup>.

### Resumo:

O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da utilização de edulcorantes sobre a composição centesimal, caracterização físico-química, avaliação microbiológica e avaliação sensorial do queijo tipo *petit-suisse* obtido a partir da coagulação mista do leite desnatado bubalino. Foram elaboradas quatro formulações com concentrações de edulcorantes variando entre 25 a 100%. O pH, acidez Dornic, sólidos totais, carboidratos totais, resíduo mineral fixo e valor energético foram influenciados pela concentração de sacarose nos tratamentos, sendo que as formulações com 50% (50%E), 75% (75%E) e 100% de edulcorantes (100%E) foram classificadas como “*light*” e apenas a 100%E, como “*diet*”. Todas as formulações foram denominadas como “Isentos de gorduras totais”. Os tratamentos 25%E e 50%E foram os mais aceitos nos atributos sabor e impressão global e preferidos, apresentando intenção de compra de 76% dos provadores. Os resultados da composição química e avaliação microbiológica atenderam os limites preconizados na legislação brasileira. Por apresentar boa qualidade microbiológica, composição química e nutricional, ser classificada “*light*”, e um bom desempenho na avaliação sensorial, o queijo tipo *petit-suisse* 50%E se destacou como promissor para o desenvolvimento de novos produtos lácteos destinados a pessoas com dietas com ingestão controlada de nutrientes.

Palavras chaves: Queijo *Light*, Queijo *Diet*, *Petit-suisse*.

---

<sup>1</sup> Centro de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Rua João Nascimento, s/n, Centro, Uruçuca, CEP 45680-000, BA, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, Univ. Estadual de Santa Cruz, Rod. Jorge Amado, km 16 - Salobrinho, Ilhéus, CEP 45662-900, BA, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, CEP: 52171-900, PE, Brasil.

## 1. Introdução

A pecuária bubalina tem grande potencial como produtora de leite, devido ao mesmo apresentar maior valor nutritivo e rendimento industrial, principalmente queijos e iogurtes, quando comparados com o leite bovino, além de a espécie apresentar maior rusticidade, o que permite a sua criação em regiões alagadas, inadequadas para gado bovino (Neres et al., 2013). O leite bubalino apresenta diferenças na composição, devido à maior porcentagem de seus constituintes, principalmente, gordura e proteína, os quais conferem um maior teor de sólidos totais que são responsáveis pelas características físicas (estrutura, cor, sabor) do leite e dos seus derivados. O leite bubalino tem sabor ligeiramente adocicado, é mais branco que o leite bovino, devido à baixa concentração de caroteno em sua gordura (Huhn et al., 1991; Macedo et al., 2001).

A produção de derivados lácteos a partir do leite de búfalas ainda é pouco estudada, seja pelo baixo volume produzido em comparação com o leite de vaca ou pelo pouco conhecimento da população a respeito das características deste leite, apesar de seu maior consumo ser através de derivados. Além do queijo Muçarela italiano, diversos laticínios têm elaborado vários derivados a partir deste leite. Os produtos variam de acordo com a região e hábitos culturais onde estes são produzidos, sendo encontrados diversos tipos de queijos (frescal, ricota, provolone e outros), doce de leite pastoso e em tabletes, manteiga, produtos fermentados, leite em pó e sorvete (Han et al., 2007).

O *petit-suisse* é um queijo produzido a partir da coagulação do leite com coalho e/ou de enzimas específicas e/ou de bactérias específicas, a ser consumido fresco, não maturado, adicionado ou não de ingredientes opcionais não lácteos, até o máximo de 30% m/m. É comumente produzido industrialmente por centrifugação da coalhada, obtendo-se o queijo "quark", que é utilizado como base para o queijo *petit-suisse*, adicionando-se opcionalmente polpa de fruta, açúcar e gordura (Veiga et al., 2000; Brasil, 2002).

A crescente procura por alimentos saudáveis pelos consumidores, especificamente com redução de calorias, tem tornado mais desafiador o

desenvolvimento de novos produtos alimentícios. Devido a essa grande expansão desenvolvimento de alimentos dietéticos (*diet*) e com redução de calorias e açúcares (*light*) para alimentação, faz-se necessário o estudo do comportamento dos produtos lácteos com adição de edulcorantes e redução significativa do teor de gorduras totais. Neste caso, os edulcorantes são utilizados nos alimentos em que se faz necessária a substituição parcial ou total do açúcar para controle de peso, para dietas com ingestão controlada de açúcares e para dietas com restrição de açúcares (Brasil, 2008; Cardoso et. al., 2004).

Atualmente é desconhecido o efeito do uso do leite de búfalas desnatado para a produção do queijo *petit-suisse* bem como a utilização de misturas de edulcorantes contendo ciclamato de sódio, acessulfame k e maltodextrina neste produto, desta forma o presente estudo propõe o desenvolvimento de um queijo *petit-suisse* produzido a partir do leite desnatado de búfalas adicionado de diferentes combinações de edulcorantes e sacarose como uma proposta para desenvolvimento de novos produtos, sendo esta uma alternativa econômica para a bubalinocultura do sul da Bahia.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Preparo do queijo tipo *petit-suisse* com diferentes níveis de sacarose e edulcorantes**

As diversas formulações do queijo tipo *petit-suisse* foram elaboradas utilizando o fluxograma conforme figura 1. O leite de búfala desnatado foi pasteurizado a 70°C por 30 min e resfriado a 35°C, onde foi adicionado o cloreto de cálcio a 50% (m/v) na dosagem de 0,04% (v/v), coagulante HA-LA da Chr. Hansen na proporção de 0,1% (v/v) e cultura starter de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* liofilizada do tipo Direct Vat Set (DVS) YF L 903 na dosagem de 0,002% (p/v). Após 40 min realizou-se o corte da coalhada e homogeneizou lentamente por 2 min. Retirou-se parte do soro equivalente a 50% do volume inicial do leite, e adicionou-se o corante natural de carmim de cochonilha CC-300-WS FCCII da Chr. Hansen, goma xantana 200 mesh, aroma natural idêntico ao de morango GEM 201.109 I da Gemacom (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil), na dosagem

recomendada pelo fabricante e a sacarose e o edulcorante Docemix D.A.15 do Doce Aroma composto por Ciclamato de sódio, acessulfame K e maltodextrina, conforme o tratamento.

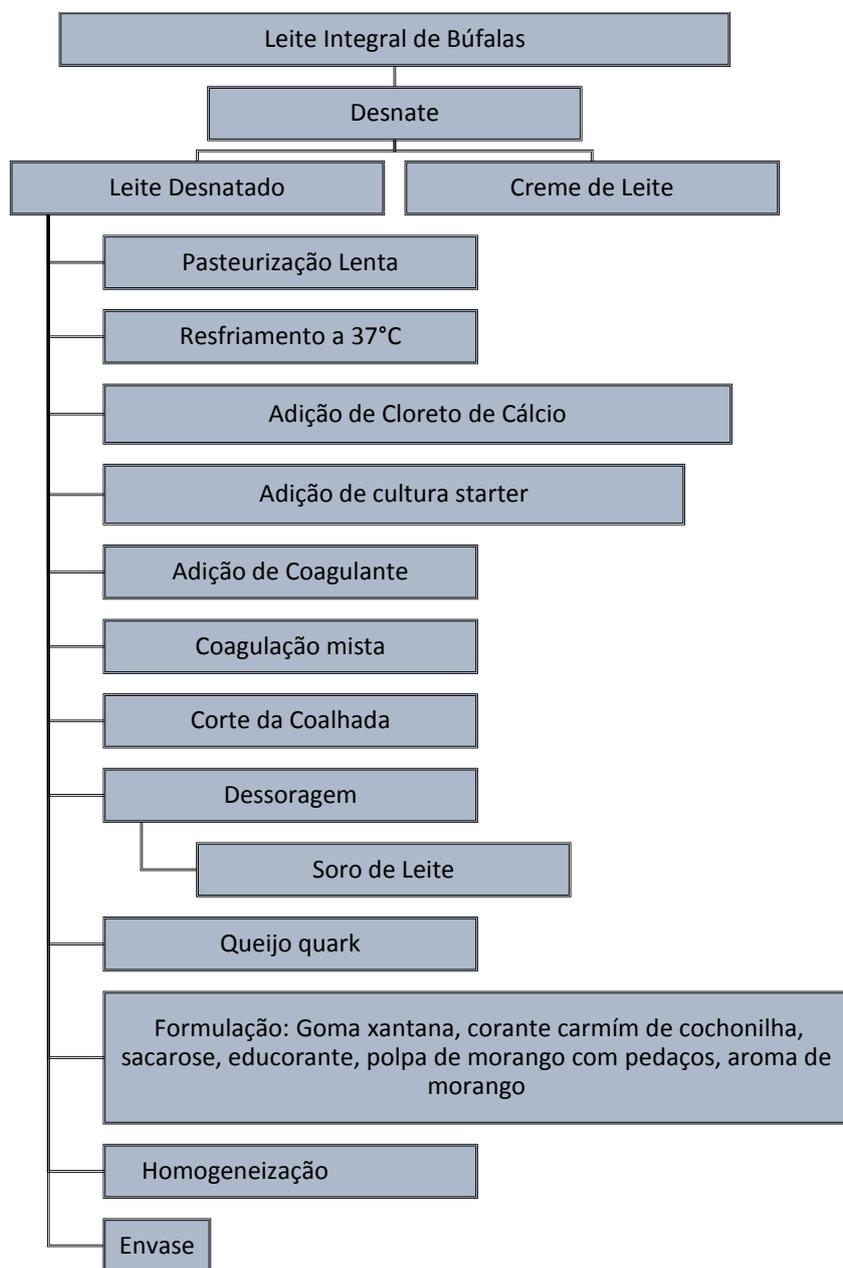


Figura 1- Fluxograma para fabricação do queijo *petit-suisse* utilizando leite de búfala desnatado.

Foram elaboradas quatro diferentes formulações de queijo *petit-suisse* a partir de diferentes combinações entre sacarose e edulcorantes que estão apresentados na Tabela 01.

Tabela 01 – Formulações com diferentes concentrações de sacarose e edulcorantes

Tratamentos	Concentração de Sacarose <sup>1</sup>	Concentração de Edulcorantes <sup>2</sup>
100%E	0 %	100 %
75%E	25 %	75 %
50%E	50 %	50 %
25%E	75 %	25 %

<sup>1</sup> Utilização de sacarose na proporção de 12 kg por 100 kg de *petit-suisse*.

<sup>2</sup> Dosagem recomendada pelo fabricante: 5g de edulcorante por kg de sacarose.

## 2.2. A caracterização físico-química, composição centesimal e nutricional

A caracterização físico-química, composição centesimal e nutricional do queijo *petit-suisse* foi determinada após 5 dias de fabricação. A determinação do pH foi realizada em medidor pH/ION (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça) e acidez titulável (°D) foi realizada através do método Dornic usando 10 g da amostra, titulando-se com solução de NaOH 0,11 mol/L (solução Dornic) até o pH 8,2 a 8,4, conforme Brasil (2006).

A composição centesimal foi determinada, em triplicata, através da determinação dos teores de resíduo mineral fixo (RMF), Sólidos Totais (ST), carboidratos totais (CT), proteína total (PT) e matéria gorda (MG), conforme Brasil (2006) e AOAC (2000).

O teor de umidade foi determinado a partir da secagem de 5 g da amostra de em estufa de esterilização e secagem (FANEN MA030112, Piracicaba, Brasil) a 105°C, sob ventilação forçada, por 1 hora, com resfriamento em dessecador e secagens sucessivas até obter peso constante.

O resíduo mineral fixo foi determinado por gravimetria por aquecimento em forno mufla (Jung,1712, Blumenal, Brasil) de 2 g da amostra a 550°C por 5 a 6 h até calcinado completamente .

A concentração de proteína total foi estimada pela medição do teor de nitrogênio pelo método Kjeldahl e multiplicando por um fator de conversão (6,38), após a digestão com ácido sulfúrico de 5 g da amostra em digestor Kjeldahl (Tecnal, 040125, Piracicaba, Brasil).

O teor de Gorduras Totais foi determinado pela extração de lipídios com ácido sulfúrico, usando o método butirométrico para leite fluido, onde foi

adicionado no butirômetro de Gerber para leite desnatado, 10 mL de ácido sulfúrico (densidade 1,820 g.cm<sup>-3</sup> a 20 °C), 11 mL da amostra foi diluída em 50% (p/v) e 1 mL do álcool isoamílico (densidade 0,810 g.cm<sup>-3</sup> a 20 °C). Após agitação, a mistura foi centrifugada a 1200 rpm em centrífuga (ITR, 86, Esteio, Brasil). O resultado lido a 65°C no butirômetro foi multiplicado por 2.

A determinação dos teores de carboidratos totais foram obtidos por através da equação: CT= [100- (RMF+MG+PT+ST)], conforme AOAC (2000).

A classificação quanto às categorias *diet* e *light* foi realizada conforme Brasil (1998a) e Brasil, (1998b) e o valor calórico foi determinado de acordo com Franco (1999), multiplicando-se a porcentagem de carboidratos e proteínas por 4,0 kcal/g e de gordura por 9,0 kcal/g.

### 2.3. Avaliação microbiológica

Alíquotas de 1 mL da diluição 10<sup>-1</sup> das amostras foram transferidas para placas Petrifilm<sup>TM</sup> EC (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), para a contagem de coliformes termotolerantes e para placas de Petrifilm<sup>TM</sup> STX (3M Microbiology), para contagem de *Staphylococcus aureus*. A incubação das placas para *Staphylococcus aureus* e coliformes foi realizada a 35°C por 48 horas. As análises foram realizadas em triplicatas, 05 dias após a fabricação.

Para a determinação de *Salmonella spp*, 25 g de cada amostra foi pré-enriquecida em 225 mL do caldo lactosado a 35 °C por 24 h. Em seguida, 1 mL foi transferido para 10 mL dos Caldos Tetracionato e Rappaport- Vassilidis Modificado e incubado a 42°C por 24 horas para enriquecimento. As culturas obtidas durante o enriquecimento seletivo foram homogeneizadas e inoculadas, em duplicata, em Ágar Entérico de Hectoen (HE), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Bismuto Sulfito (BS) a 35°C por 24 horas. Colônias típicas de cada meio de cultura foram inoculadas em Ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA) a 35°C por 24 horas. Devido à inexistência de reações sugestivas, ou seja, inclinação alcalina (vermelha) e de fundo ácido (amarelo) com ou sem produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do meio), não foram submetidas à confirmação através de prova de sorológica (Brasil, 2003).

## 2.4. Avaliação sensorial

Um total de 94 provadores foi recrutado da comunidade acadêmica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, *Campus Uruçuca-Bahia*, sendo 46 % com idade inferior a 21 anos, 36 % com idade entre 21 a 30 e 18 % com idade maior que 30 anos. A maioria dos provadores (64 %) pertencia ao sexo feminino. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Nutrição (ENUFBA) da Universidade Federal da Bahia (CAAE: 54355116.0.0000.5031). As amostras do queijo *petit-suisse* obtidas com formulações preparadas com diferentes concentrações de sacarose e edulcorantes foram submetidas ao teste de aceitação sensorial utilizando a escala hedônica de sete pontos em que "um" representava "desgostei muito", "quatro", "Indiferentes" e "sete", "gostei muito", onde foram avaliados a impressão global, cor, consistência e sabor (Stone et al., 2012). Além disto, foi avaliada a preferência através do teste de ordenação, utilizando o Teste de Friedman, e a intenção de compra dos provadores (Ferreira et al., 2000).

## 2.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo o agrupamento e comparação de médias efetuadas pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Avaliação físico-química, composição química e nutricional

Os resultados da avaliação físico-química estão apresentados na tabela 2. Não houve diferenças significativas nos valores de pH entre os tratamentos 25%E, 50%E e 75%E, e o 100%E apresentando maior valor (5,70). Observou-se maior acidez titulável ( $^{\circ}\text{D}$ ) (94,73) no tratamento 25%E, quando comparado com os demais tratamentos. Este comportamento pode está associado ao teor mais elevado de sacarose, provocando a alterações nas concentrações de substrato, influenciando na produção de ácido láctico pela a ação dos micro-organismos oriundos da cultura *stater*. A redução nos valores de pH e elevação da acidez é comum em produtos lácteos submetidos ação de culturas starter e

incubados a temperatura ótima de crescimento, encontrando frequentemente produtos com pH inferior a 5,5 e acidez titulável (°D) com valores superiores a 90°D (CARDELLI, 2008).

Os resultados obtidos para a Composição química e nutricional estão apresentados na tabela 2. Não houve diferenças significativas ( $p>0,05$ ) nos resultados obtidos para Proteína Total (PT) e Gorduras Totais (GT) dos tratamentos avaliados. O teor de Resíduo Mineral Fixo (RMF) foi maior nas amostras do tratamento 25%E, quando comparado com as demais formulações, podendo ter sido influenciado pelo efeito da diluição dos minerais provocado pela maior concentração de sacarose. Os teores de Carboidratos Totais (CT) nas amostras dos tratamentos 25%E e 50%E foram superiores aos dos tratamentos 75%E e 100%E. Comparando-se os teores de Sólidos Totais (ST) dos tratamentos, observou-se que os mesmos aumentaram de acordo com o teor de sacarose adicionada.

Tabela 2 – Características físico-químicas, composição química e nutricional do queijo *petit-suisse* com diferentes combinações de edulcorante e sacarose

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTOS			
	25%E	50%E	75%E	100%E
pH	5,43 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	5,55 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	5,59 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	5,70 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>
Acidez Titulável (°D)	94,73 $\pm$ 4,31 <sup>A</sup>	75,15 $\pm$ 9,60 <sup>B</sup>	78,98 $\pm$ 6,29 <sup>B</sup>	77,40 $\pm$ 8,51 <sup>B</sup>
Resíduo mineral fixo (%)	1,35 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	1,20 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	1,29 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	1,20 $\pm$ 0,00 <sup>B</sup>
Sólidos Totais (%)	20,24 $\pm$ 0,31 <sup>A</sup>	17,33 $\pm$ 0,35 <sup>B</sup>	16,14 $\pm$ 0,28 <sup>C</sup>	15,06 $\pm$ 0,28 <sup>D</sup>
Proteína Total (%)	7,83 $\pm$ 0,44 <sup>A</sup>	6,33 $\pm$ 1,43 <sup>A</sup>	7,22 $\pm$ 0,35 <sup>A</sup>	6,87 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>
Carboidratos Totais (%)	10,95 $\pm$ 0,27 <sup>A</sup>	9,70 $\pm$ 1,76 <sup>A</sup>	7,54 $\pm$ 0,53 <sup>B</sup>	6,88 $\pm$ 0,47 <sup>B</sup>
Gorduras Totais (%)	0,10 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>			
Valor Calórico (Kcal/100g)	76,0	65,0	59,9	55,9

<sup>A-D</sup>: Médias com diferentes letras maiúsculas se diferem na mesma linha ( $p>0,05$ ).

Queijo *petit-suisse* com adição de 25% de edulcorantes (25%E); Queijo *petit-suisse* com adição de 50% de edulcorantes (50%E); Queijo *petit-suisse* com adição de 75% de edulcorantes (75%E); Queijo *petit-suisse* com adição de 100% de edulcorantes (100%E).

A composição centesimal das amostras do queijo *petit-suisse* apresentada está de acordo com Brasil (2000) que estabelece teor mínimo de 6 % para proteína láctea e 55,1 % de Sólidos Totais (Brasil, 1996).

Segundo Brasil, 1998a as formulações adicionadas de 50%, 75% e 100% de edulcorantes se classificaram como “*light*” por apresentar redução superiores a 25% no valor calórico e açúcar e diferença maior que 40 Kcal/100g e 5g/100g, respectivamente, quando comparado com o queijos *petit-suisse* encontrados no mercado. A formulação 100%E foi classificada como *light* e *diet*, por não ter a adição de sacarose em sua formulação. Todos os tratamentos foram denominados “Isentos de gorduras totais” por apresentar conteúdo inferior a 0,5% deste componente (BRASIL, 1998a).

### 3.2. Avaliação microbiológica

As amostras apresentaram contagem de coliformes termotolerantes (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (coagulase positivo) inferiores a 10 Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g) e ausência em 25 g da amostra de *Salmonella*, atendendo assim os padrões estabelecidos em Brasil (1996), que determina a ausência de *Salmonella spp.* em 25 g da amostra e valores inferiores a 10 NMP/g para coliformes termotolerantes (*E. coli*), e 10 UFC/g para *Staphylococcus aureus* (coagulase positivo), neste tipo de queijo, indicando que as condições de produção foram adequadas. A baixa contagem de contaminantes microbiológicos pode ter sido influenciada pelo uso de bactérias lácticas utilizadas como starter (FIORAMONTI et al., 2003); a presença de maior concentração de moléculas antimicrobianas como a lactoferrina e lactoperoxidase no leite de búfala (ARAÚJO e GHILLER, 2005); e ao tratamento térmico aplicado ao leite desnatado (70°C por 30 minutos) superior ao que é comumente utilizado na pasteurização (65°C por 30 minutos).

### 3.3. Avaliação sensorial

#### 3.3.1. Aceitação Sensorial do Queijo tipo *Petit-Suisse*

Os resultados obtidos do teste de aceitação sensorial realizado nas amostras de queijo tipo *petit-suisse* com diferentes níveis de edulcorantes e

sacarose utilizando a escala Hedônica de sete pontos estão apresentados na figura 2.

A aceitação das amostras dos queijos tipo *petit-suisse* com diferentes níveis de edulcorantes e sacarose variou entre “Desgostei ligeiramente (3)” a “Gostei moderadamente (6)” quando avaliados os atributos impressão global, Cor, consistência e sabor. Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as amostras dos tratamentos avaliados nos atributos cor e consistência.

Quanto ao sabor, os tratamentos 25%E e 50%E foram os mais aceitos, com escores médios de 4,8 e 4,7, respectivamente, demonstrando uma aceitação variando entre “indiferente” a “gostei ligeiramente” para este atributo, sendo que a formulação com a maior concentração de edulcorantes (100%E) apresentou uma menor aceitação sensorial (3,74).

Também, quando avaliada a impressão global, os tratamentos 25%E e 50%E apresentaram maior aceitação, com escores médios de 4,5 e 4,7, respectivamente e os tratamentos 75%E (4,3) e 100%E (4,1) foram menos aceitos. Estes resultados podem está relacionados com maiores teores de sacarose nas amostras dos tratamentos 25%E e 50%E e estão de acordo com Souza et al. (2010) que ao estudar a aceitação sensorial do queijo tipo *petit-suisse* elaborado com leite de vaca adicionado de sacarose e/ou outros edulcorantes, observou uma maior aceitação sensorial para as amostras que apresentavam uma maior concentração de sacarose.

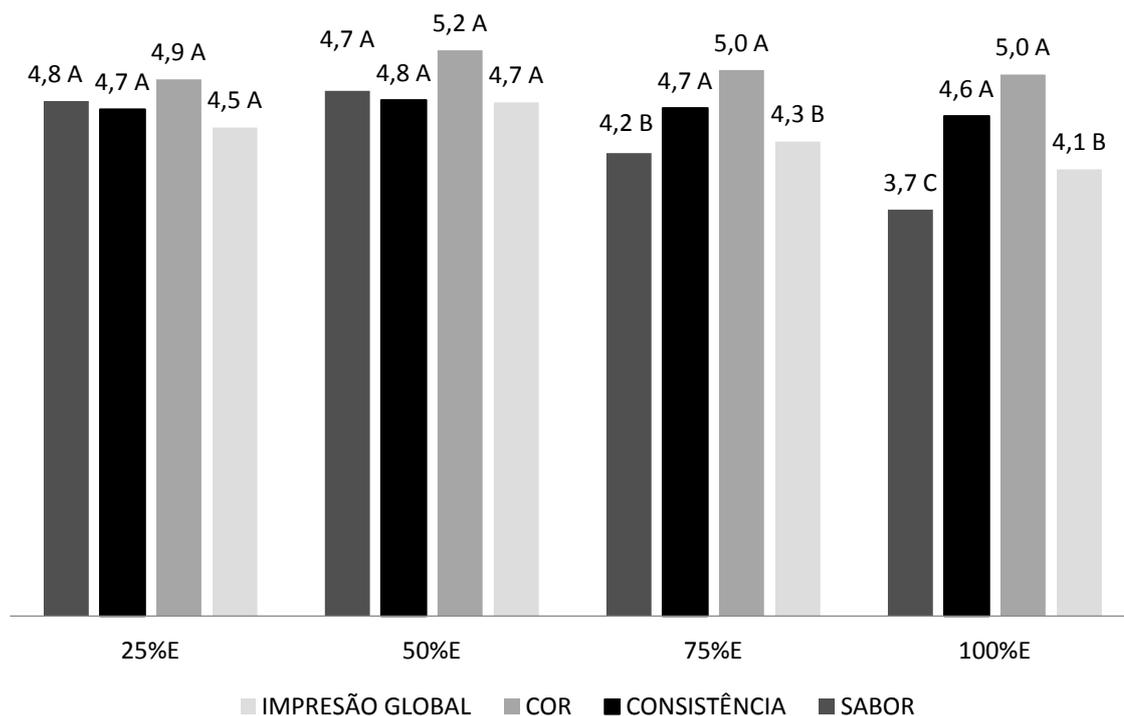


Figura 2- Aceitação sensorial das amostras de queijo *petit-suisse* utilizando escala hedônica para os atributos impressão global, cor, consistência e sabor. Tratamento 25%E (25% de edulcorante e 75% de sacarose); Tratamento 50%E (50% de edulcorante e 50% de sacarose); Tratamento 75%E (75% de edulcorante e 25% de sacarose); Tratamento 100%E (100% de edulcorante). Médias dos atributos seguidas pela mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3.2. Preferência e intenção de compra dos provadores

A avaliação da preferência dos queijos tipo *petit-suisse* realizada pelos provadores através do teste de ordenação está apresentada na tabela 3.

A soma das ordens de Friedman apresentada, demonstra que tanto os tratamentos 25%E e 50%E, como os tratamentos 75%E e 100%E, não se diferenciaram ( $p < 0,05$ ), sendo que as amostras dos queijos tipo *petit-suisse* com maiores concentrações de sacarose (25%E e 50%E) foram as mais preferidas pelos provadores, corroborando com os resultados da aceitação sensorial onde estes tratamentos foram os mais aceitos. As características sensoriais podem diferir em função do produto e a adição de edulcorantes podendo gerar problemas em relação ao sabor residual doce ou amargo, e conferir aparência e textura indesejada (CARDOSO et al., 2004; SOUZA et al. 2010).

Tabela 3 - Resultados Teste de Ordenação para preferências dos julgadores

Tratamentos				
	25%E	50%E	75%E	100%E
<b>Soma das Ordens</b>	280 A	299 A	227 B	218 B
<b>Dms</b>	47			

\* Soma de ordens seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de soma de ordens de Friedman, a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Dms: Diferença mínima significativa

Tratamento 25%E (25% de edulcorante e 75% de sacarose); Tratamento 50% (50% de edulcorante e 50% de sacarose); Tratamento 75%E (75% de edulcorante e 25% de sacarose); Tratamento 100%E (100% de edulcorante).

Quando avaliada a intenção de compra das amostras mais preferidas, 76% dos provadores manifestaram interesse na compra dos queijos *petit-suisse* dos tratamentos mais preferidos. Desta forma, pode se inferir que, as formulações adicionadas de 50% (50%E) e 25% de sacarose (75%E) foram as mais aceitas e preferidas pelos provadores, sendo que estas apresentaram maior potencialidade como alternativa para desenvolvimento de novos produtos.

#### 4. Conclusão

A concentração de sacarose influenciou os valores de pH, acidez Dornic, sólidos totais, carboidratos totais, resíduo mineral fixo e valor energético. As formulações adicionadas de 50%, 75% e 100% podem ser comercializadas como um produto “*light*” sendo que a com 100% de edulcorantes, também como “*diet*”. Todas as amostras receberam a denominação de venda como “Isentos de gorduras totais”.

Devido à satisfatória qualidade microbiológica, composição química e nutricional e bom desempenho na avaliação sensorial, o queijo tipo *petit-suisse* com a adição 50% de edulcorantes e 50% de sacarose, se destacou como promissor para o desenvolvimento de novos produtos lácteos para dietas especiais.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Fazenda Diamantina (Ipiaú, Bahia, Brasil) pelo fornecimento do leite de búfalas, ao IF Baiano (Edital Interno - Recém Mestres 9/2013) por seu apoio financeiro e ao Centro de Tecnologia de Alimentos (IF BAIANO, Campus Uruçuca-BA) pela disponibilização dos laboratórios para execução do experimento.

## Referências Bibliográficas

AOAC -ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 2000. Official methods of analysis of the association of analytical chemistry. 14<sup>a</sup> edição. Washington. Nova Iorque.

ARAÚJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Bras. Reprod. Anim**, v. 29, p. 77-83, 2005.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. Brasília. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>.

BRASIL, 1998a. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Brasília. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA\\_27\\_1998.pdf/72db7422-ee47-4527-9071-859f1f7a5f29](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_27_1998.pdf/72db7422-ee47-4527-9071-859f1f7a5f29).

BRASIL. 1998b. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos para fins especiais. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Brasília. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA\\_29\\_1998.pdf/49240642-4002-48f4-8213-a1b74aa4bd32](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_29_1998.pdf/49240642-4002-48f4-8213-a1b74aa4bd32)

BRASIL, 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Tipo *Petit-Suisse*. **Instrução Normativa Nº 53, de 29 de dezembro de 2000**. Brasília. Disponível em: [http://www.agais.com/normas/leite/queijo\\_petit\\_suisse.htm](http://www.agais.com/normas/leite/queijo_petit_suisse.htm).

BRASIL, 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Métodos Analíticos para Análises Microbiológicas para o controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Brasília. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>

BRASIL, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais físico-químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº68, de 12 de agosto de 2006. Brasília. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=12397>

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. Brasília. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Microsoft%2BWord%2B-%2BResolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn%25C2%25BA%2B18%252C%2Bde%2B24%2Bde%2Bmar%25C3%25A7o%2Bde%2B2008.pdf/4b266cfd-28bc-4d60-a323-328337bfa70e>

CARDARELLI, H. R. et al. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

CARDOSO, J. M. P. et al. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 448-452, 2004.

CUNHA NETO, O. C. et al. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 448-453, 2005.

NERES, L. de S. et al. IOGURTE DE LEITE DE BÚFALA SABORIZADO COM MANGA (*Mangifera indica* L.): ACEITAÇÃO SENSORIAL E CUSTO DE PRODUÇÃO. **Revista Agroecossistemas**, v. 4, n. 2, p. 79-84, 2013.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, V. L. P. et al. Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Campinas**, pp. 125-127, 2000 (SBCTA, Manual: Série Qualidade).

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 307p.

HAN, Bei-Zhong et al. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 742-746, 2007.

MACEDO, M. P. et al. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p. 1084-1088, 2001.

SOUZA, V. R. et al. Elaboração de queijo petit suisse sabor morango de baixo valor calórico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 374, p. 49-58, 2010.

STONE, H., BLEIBAUM, R., THOMAS, H.A. **Sensory evaluation practices**, 4. ed. Nova Iorque: Academic Press, 2012. 425 p.

VEIGA, P. G. et al. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo petit suisse brasileiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 20, n. 3, p. 349-357, 2000.

**Efeitos da incubação, do uso de edulcorantes e lactobacilos isolados da fermentação do cacau sobre a qualidade do *petit-suisse* elaborado a partir do leite desnatado bubalino**

J. S. Oliveira<sup>1</sup>, A. P. T. Uetanabaro<sup>2</sup>, R.P. Resende<sup>3</sup>, C.C. Romano<sup>3</sup>, J.D. T. Dias<sup>3</sup>, C. P. Lima<sup>1</sup>, A.L.F. Porto<sup>4</sup>.

**Resumo:**

Este trabalho objetivou avaliar os efeitos da utilização de edulcorantes, lactobacilos com potencial probiótico e da incubação, sobre a qualidade do queijo *petit-suisse* elaborado a partir do leite desnatado bubalino. Amostras de queijo incubadas a 37°C sem adição de lactobacilos (Controle), com adição 4% de *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (L.F 12h), com adição de 4% de *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (L.P 12h), com adição de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 e 2% de *L. plantarum* TcUESC02 (L.F+L.P 12h), sem a adição de edulcorantes adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 e 2% de *L. plantarum* TcUESC02 (L.F+L.P 100% S 12h) e sem a adição de edulcorantes adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 sem incubação (L.F + L.P 100% S S.F) foram submetidas a acidez titulável (°D), a avaliação do pH, a viabilidade dos lactobacilos, a avaliação microbiológica e ao acompanhamento do sabor durante 42 dias de estocagem sob refrigeração. Os tratamentos L.F 12h, L.P 12h e L.F+L.P 12h apresentaram maiores mudanças nos valores de pH e acidez Dornic e o L.P 100% S S.F, menor alteração durante a estocagem. Os resultados da avaliação microbiológica atenderam aos limites preconizados na legislação brasileira. As amostras do L.F+L.P 100% S S.F e L.F+L.P 100% S 12h apresentaram maiores contagem de bactérias lácticas, com valores iguais a 7,88 e 8,26 log UFC/g, respectivamente ao final do período de estocagem. As amostras do tratamento L.F+L.P 100% S S.F não apresentaram alterações no sabor durante a estocagem e apresentou bons resultados na avaliação microbiológica e viabilidade de lactobacilos probióticos, se destacando como alternativa para o desenvolvimento de novos produtos alimentício.

**Palavras chaves:** *Edulcorantes; Lactobacillus*; qualidade sensorial.

---

<sup>1</sup> Centro de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Rua João Nascimento, S/N, Uruçuca, CEP 45680-000, BA, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia da Agroindústria da Univ. Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Universidade Federal Rural de Pernambuco. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA Setor de Biotecnologia Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

## 1. Introdução

A utilização de alimentos como veículo de promoção do bem-estar e saúde e como redutor dos riscos de algumas doenças, tem incentivado as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes e produtos, possibilitando a inovação na indústria alimentícia, principalmente laticínios, com a criação de novas oportunidades de mercado, aumentando a competitividade no segmento de produtos funcionais e para fins especiais (THAMER e PENNA, 2006).

Os alimentos funcionais são aqueles que além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, sendo ressaltado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (OLIVEIRA et al., 2002). Desta forma, o uso de micro-organismos vivos (probióticos) que administrados em quantidades adequadas que promovem benefícios, favorecendo no equilíbrio microbiano intestinal têm ganhado destaque. Dentre eles, destacam-se as bactérias dos Gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido os probióticos mais utilizados em alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde (BRASIL, 2002).

A produção de derivados lácteos a partir do leite de búfalas ainda é pouco estudada, seja pelo baixo volume produzido em comparação com o leite de vaca ou pelo pouco conhecimento da população a respeito das características deste leite, apesar de seu maior consumo ser através de derivados. O leite de búfala se destaca pelas suas características sensoriais, nutricionais e por apresentar elevado rendimento industrial que proporciona na produção de seus derivados, devido à maior concentração de seus constituintes, principalmente, gordura e proteína, os quais conferem um maior teor de sólidos totais (COSTA, 2014). Além do queijo tipo Muçarela italiano, indústrias lácteas têm elaborado vários derivados a partir do leite bubalino, sendo que o mesmo deve apresentar uma boa condição higiênica, a fim de se evitar a presença de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes nos produtos destinados ao consumo (CUNHA NETO, 2005).

Comumente produzido industrialmente por centrifugação da coalhada obtida por coagulação mista, por ação de enzima e acidificação por cultura starter, o queijo "quark" é utilizado como base para a fabricação do queijo tipo *petit-suisse* sendo consumido fresco, não maturado é comum adição de polpa de fruta, açúcar e gordura em até o máximo de 30% m/m. Este queijo pode ser produzido também a partir da coagulação do leite apenas com coalho (enzima), principalmente quando associado com o uso de probióticos, o que evita a competição por nutrientes e produção de substâncias inibidoras de crescimento pela cultura starter e facilita quantificação dos mesmos (VEIGA et al., 2000; BRASIL, 2000).

Contudo, a produção do queijo tipo *petit-suisse* a partir do leite bubalino desnatado, adicionado de edulcorantes e lactobacilos com potencial probiótico, por meio da coagulação enzimática, sem a utilização de cultura starter, bem como o efeito da incubação a 37°C sobre a viabilidade dos *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02, pH, acidez Dornic e características sensoriais deste tipo de queijo armazenado sob refrigeração é desconhecida. Desta forma o presente trabalho propõe a avaliação dos efeitos da incubação, uso de edulcorantes, leite bubalino desnatado e lactobacilos isolados da fermentação do cacau sobre a qualidade do *petit-suisse* produzido por coagulação enzimática.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Micro-organismos**

As linhagens de bactérias lácticas utilizadas neste estudo foram previamente isoladas de processos fermentativos naturais de sementes de cacau da região de Ilhéus (Bahia-Brasil) e armazenadas em ultra-freezer a -86°C em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) suplementado com glicerol (20% v/v). As linhagens *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (número de acesso KU244478, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU244478>)) e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (número de acesso KU244476, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU244476>)) foram selecionadas e avaliadas como potenciais probióticos nos trabalhos Melo (2016, 2017) e Saito et al. (2014). As mesmas foram reativadas por sucessivas transferências em

caldo MRS sendo a primeira a 37°C por 48h, e a segunda, a 37°C por 16h. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas sob refrigeração (Eppendorf AG, 5810R, Hamburgo, Alemanha) a 13751 x g a 5°C por 15 min. O sobrenadante foi retirado e a cultura reconstituída e lavada com solução salina de cloreto de sódio (0,85 % p/v) esterilizado. Esta operação foi repetida por duas vezes. Em seguida, as células foram diluídas em leite desnatado pasteurizado de búfalas.

## 2.2. Preparação do queijo *petit-suisse*

As amostras do queijo foram elaboradas a partir de diferentes combinações entre edulcorantes, sacarose, tempo de incubação a 37°C e as linhagens de lactobacilos estudadas (Tabela 1). As culturas de lactobacilos utilizadas apresentaram população de  $9 \times 10^9$  UFC/mL. O leite de búfala integral foi desnatado e em seguida, pasteurizado a 70°C por 30 min e resfriado a 35°C, onde foi adicionado o cloreto de cálcio a 50% (p/v) na dosagem de 0,04% (v/v) e coagulante HA-LA da Chr. Hansen na proporção de 0,1% (v/v). Após 40 min realizou-se o corte da coalhada e homogeneizou lentamente por 2 min. Retirou-se parte do soro equivalente a 60% do volume inicial do leite, e adicionou-se o corante natural de carmim de cochonilha CC-300-WS FCCII da Chr. Hansen, goma xantana 200 mesh, aroma natural idêntico ao de morango GEM 201.109 I da Gemacom (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil), na dosagem recomendada pelo fabricante, mix de edulcorantes (Ciclamato de sódio, acessulfame K e maltodextrina) na dosagem de 5g de edulcorante por kg de sacarose adicionada e o equivalente a 12% (p/p) de sacarose. Os ingredientes foram homogeneizados em liquidificador industrial Vitalex/LIQ 8 por 3 min. Nos tratamentos com bactérias com potencial probiótico foi adicionado 4% (v/v) das culturas contendo o *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP) ou *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF). No tratamento LF+LP foram adicionadas as duas linhagens simultaneamente na concentração de 2% (v/v). Após a adição das culturas e do preparado de morango (TECGEM AA 20.410 VR da Gemacom) na concentração de 5% (p/v), a mistura foi novamente homogeneizada no liquidificador industrial por 30 seg. Frascos plásticos de 100 mL foram utilizados para o envase, sem deixar espaço livre na embalagem. As amostras foram armazenadas a  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  por 42 dias.

Tabela 1 – Tratamentos das amostras do queijo tipo *petit-suisse*

Tratamentos	Concentração de Sacarose <sup>1</sup>	Concentração Edulcorantes	Tempo Incubação a 37° C (h)	Adição de lactobacilos	
				LF	LP
Controle	50 %	50 %	12	Não	Não
L.F 12h	50 %	50 %	12	Sim	Não
L.P 12h	50 %	50 %	12	Não	Sim
L.F+L.P 12h	50 %	50 %	12	Sim	Sim
L.F + L.P 100 % S S.F	100 %	0 %	0	Sim	Sim
L.F + L.P 100 % S 12h	100 %	0 %	12	Sim	Sim

<sup>1</sup> Utilização de sacarose na proporção de 12 kg por 100 kg de *petit-suisse*.  
LP: *L. plantarum* TcUESC02; LF: *L. fermentum* TcUESC01.

### 2.3. Determinação do pH e acidez Dornic

A caracterização físico-química foi realizada nas amostras em triplicata durante os períodos de 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de estocagem. A determinação do pH foi realizada em medidor pH/ION (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça) e acidez Dornic foi realizada usando 10 g da amostra, titulando-se com solução de NaOH 0,11 mol/L até o pH 8,2 a 8,4, conforme Brasil (2006).

### 2.4. Avaliação microbiológica do queijo tipo *petit-suisse*

Alíquotas de 1 mL da diluição 10<sup>-1</sup> das amostras foram transferidas para placas Petrifilm<sup>TM</sup> EC (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), para a contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*), para placas Petrifilm<sup>TM</sup> YM (3M Microbiology) e para a contagem de fungos filamentosos e leveduras. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, para contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*, e a 25°C por 5 dias para contagem de fungos filamentosos e leveduras. As análises foram realizadas nas amostras do queijo tipo *petit-suisse* em triplicatas, durante o período de armazenamento (01, 07, 14, 21, 28, 35 e 42 dias).

## 2.5. Avaliação da viabilidade das linhagens com potencial probiótico no queijo tipo *petit-suisse*

A quantificação do *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 foi realizada em triplicatas por 42 dias de estocagem ( $6\pm 1^\circ\text{C}$ ) para o controle e tratamentos L.F 12h, L.P 12h, L.F+L.P 12h, L.P 100% S S.F e L.F+L.P 100% S 12h. Alíquotas de 10 g da amostra do queijo tipo *petit-suisse* foram diluídas em 90 mL de solução de NaCl a 0,85% (p/v) esterilizada. Diluições seriadas foram preparadas utilizando o mesmo diluente. Foram inoculados 0,1 mL em placas com ágar MRS (Himedia, Índia) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 48 horas.

## 2.6. Acompanhamento do sabor do queijo tipo *petit-suisse* durante a estocagem sob refrigeração

Alíquotas de aproximadamente 10 g. foram submetidas à prova de degustação por provadores não treinados para avaliar possíveis alterações nas amostras do queijo tipo *petit-suisse* durante o período de armazenamento (01, 07, 14, 21, 28, 35 e 42 dias). De acordo com a percepção do sabor, as amostras foram classificadas como Sem Alteração (SA) ou Com Alteração no sabor (CA), identificando o tipo (amargo, salgado, azedo).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Acompanhamento do pH e da acidez titulável durante estocagem

As figuras 1 e 2 mostram o comportamento do pH e acidez Dornic durante o período de até 42 dias de estocagem a  $6\pm 1^\circ\text{C}$  das amostras do queijo *petit-suisse*, obtido por coagulação enzimática. A redução do pH e elevação da acidez é comum em produtos lácteos fermentados, sendo comum produtos com pH inferior a 5,5 e acidez Dornic com valores superiores a  $90^\circ\text{D}$ , devido a produção contínua ácido lático e outros ácidos orgânicos ocasionada pela utilização de culturas starter e ou probióticos e incubação a temperatura ótima de crescimento deste micro-organismos (CARDARELLI, 2008).

Os resultados apresentados demonstraram maiores mudanças nos valores de pH e acidez Dornic nos tratamentos L.F 12h, L.P 12h, L.F+L.P 12h. Já o controle apresentou mudanças superiores ao dos tratamentos L.P 100% S S.F e L.F+L.P 100% S 12h. A maior elevação da acidez e redução do pH nos tratamentos está relacionado ao maior metabolismo dos lactobacilos, quando incubados a uma temperatura ótima de crescimento. A ausência dos lactobacilos na formulação e a incubação a 37°C por 12 horas pode ter favorecido desenvolvimento micro-organismos termorresistentes sobrevivente ao processo de pasteurização, influenciando nos valores de pH e acidez obtidos no controle (REIS et al., 2013). O L.P 100% S S.F apresentou a menor alteração no pH e acidez durante o período de estocagem do queijo tipo *petit-suisse* quando comparado aos demais tratamentos. Saito et al. (2014) ao estudar o comportamento do pH e acidez titulável durante a incubação a 37°C e estocagem a 4°C de produto fermentado a base de extrato de soja adicionados *L. fermentum* TcUESC01 e *L. plantarum* TcUESC02, observou maiores mudanças nos valores destes parâmetros, com pH em 27 dias de estocagem igual a 4,16 e 4,18, respectivamente.

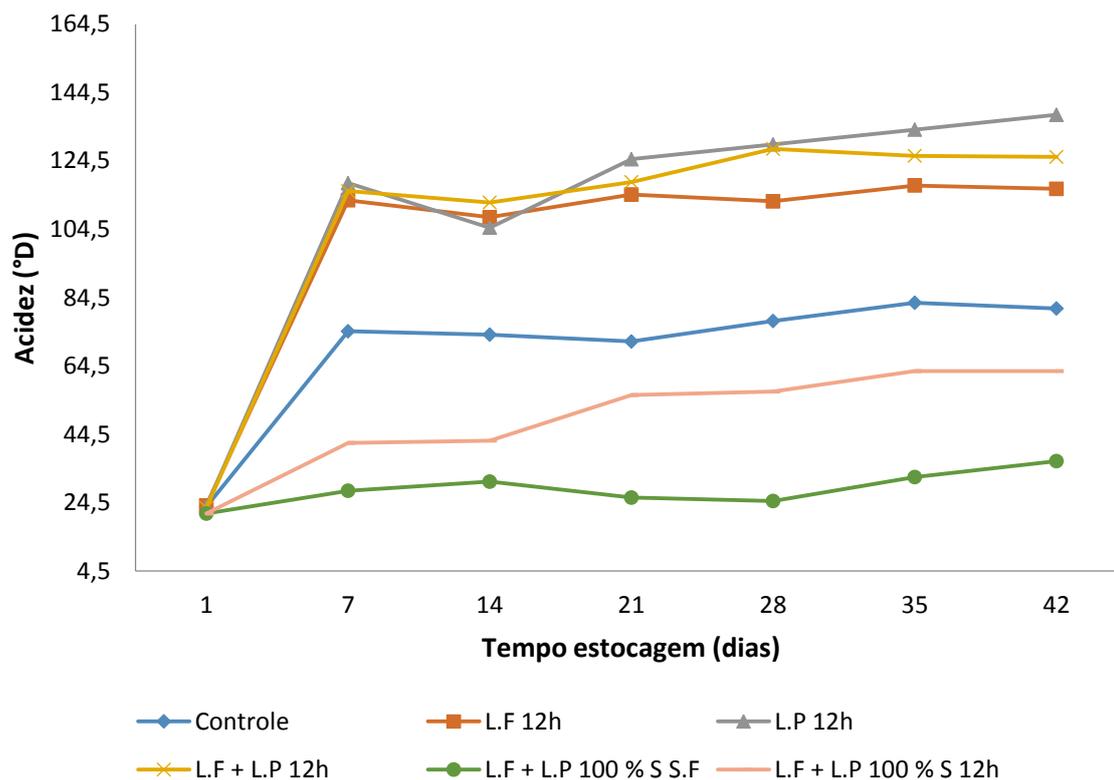


Figura 1- Valores da acidez Dornic (°D) durante a estocagem sob refrigeração do queijo tipo *petit-suisse*.

Sem adição de lactobacilos com 12 horas de incubação (Controle); adicionado de 4% de *L. fermentum* TcUESC01 com 12 horas de incubação (L.F 12h); adicionado de 4% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.P 12h); adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.F+L.P 12h); com 100% de sacarose adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 sem incubação (L.F + L.P 100% S S.F); com 100% de sacarose adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.F+L.P 100% S 12h).

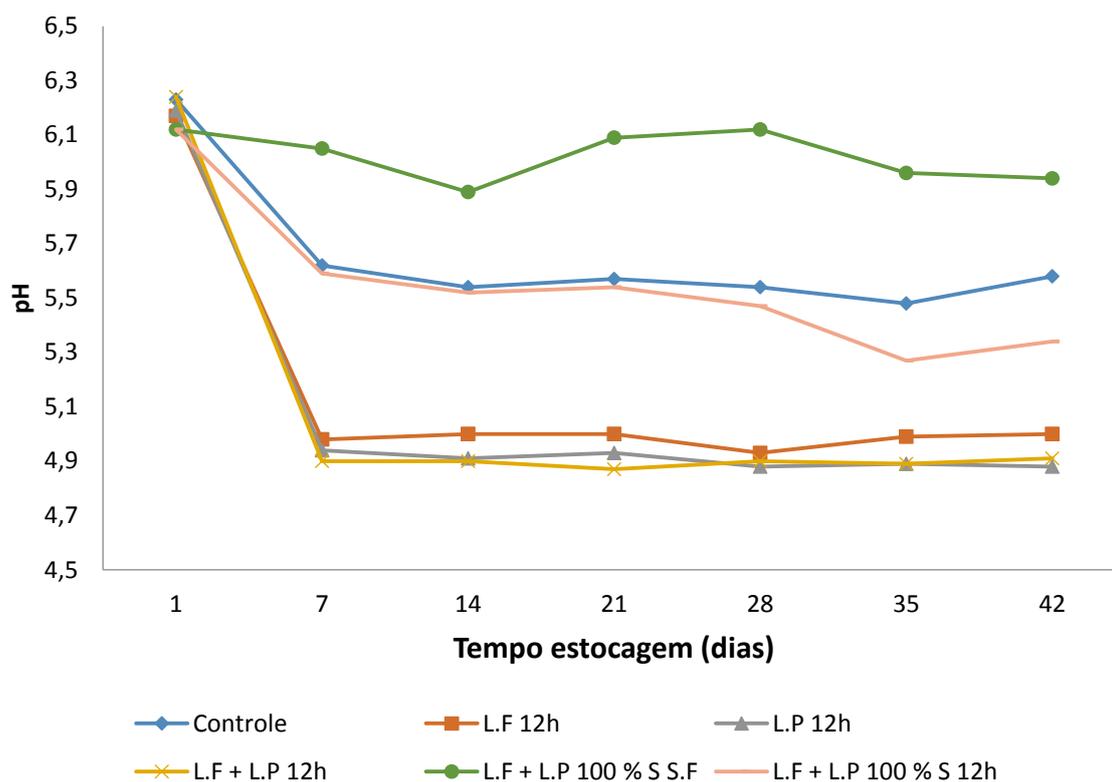


Figura 2- Curva de pH durante a estocagem sob refrigeração do queijo tipo *petit-suisse*.

Sem adição de lactobacilos com 12 horas de incubação (Controle); adicionado de 4% de *L. fermentum* TcUESC01 com 12 horas de incubação (L.F 12h); adicionado de 4% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.P 12h); adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.F+L.P 12h); com 100% de sacarose adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 sem incubação (L.F + L.P 100% S S.F); com 100% de sacarose adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.F+L.P 100% S 12h).

### 3.2. Avaliação microbiológica do queijo *petit-suisse* durante estocagem

Devido ao alto teor de umidade, o queijo *petit-suisse* apresenta condições adequadas para o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes. Por se tratar de alimento, Brasil (1996) estabelece a contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes (*E. coli*), fungos filamentosos e leveduras, *Staphylococcus aureus* (Coagulase positivo) e *Salmonella sp.* como parâmetros de controle para este tipo de queijo. Todos os tratamentos avaliados durante o período de estocagem apresentaram valores inferiores a 10 UFC/g na contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes (*E. coli*)

e fungos filamentosos e leveduras, sendo estes menores que os estabelecidos na legislação brasileira que determina os limites máximos de 100 NMP/g (número mais provável por grama), 10 NMP/g, 500 UFC/g e 10 UFC/g, respectivamente, indicando que as condições de produção e estocagem foram adequadas. Fioramonti et al. (2003) observaram a inibição *in vitro* de patógenos entéricos como *Salmonella spp.*, *S. aureus*, *E. coli* e *Clostridium perfringens* por bactérias lácticas, também, o leite de búfala apresenta uma satisfatória qualidade microbiológica, devido à maior concentração de moléculas protetoras presente no leite como a lactoferrina e lactoperoxidase, além dos leucócitos bubalinos apresentarem maior eficácia antibacteriana (ARAUJO E GHELLER, 2015). O tratamento térmico dado ao leite desnatado (70°C por 30 min) foi superior ao que é comumente utilizado na pasteurização lenta (65°C por 30 min), podendo influenciar na qualidade microbiológica do produto.

### 3.3. Avaliação da viabilidade das linhagens probióticas durante estocagem do queijo tipo *petit-suisse*

A figura 3 apresenta os resultados da viabilidade dos lactobacilos adicionados ao queijo *petit-suisse* durante a estocagem sob refrigeração. No controle (Queijo *petit-suisse* sem adição de Lactobacilos), não houve crescimento lactobacilos durante a estocagem, demonstrando que a pasteurização foi capaz de reduzir satisfatoriamente o número de bactérias lácticas presentes no leite desnatado.

As amostras dos tratamentos L.P 12h, L.F+L.P 12h, L.F+L.P 100% S S.F e L.F+L.P 100% S 12h apresentaram populações de bactérias lácticas superiores a 6,5 log UFC/g durante a estocagem. Estes valores estão de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008) que recomenda um consumo diário mínimo de  $10^8$  probióticos viáveis, sendo neste caso, necessário a ingestão mínima de 100 g do queijo. Hoier et al. (2010), Vinderola et al. (2000), Vinderola e Reinheimer (2000), também recomendam estes valores para produzir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro.

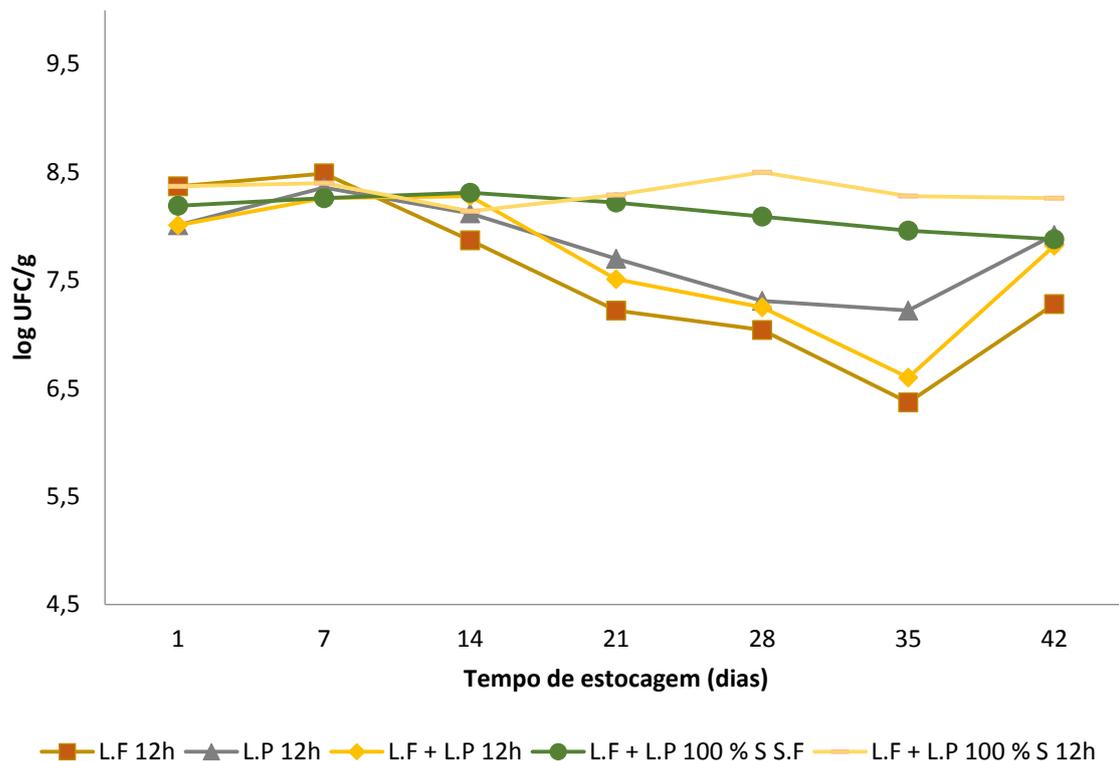


Figura 3 – Viabilidade de bactérias lácticas (log UFC/g) durante a estocagem sob refrigeração do queijo tipo petit-suisse.

As amostras do L.F+L.P 100% S S.F e L.F+L.P 100% S 12h, adicionadas de 100% de sacarose, apresentaram satisfatória contagem de bactérias lácticas, com valores iguais a 7,88 e 8,26 log UFC/g, respectivamente. Este valores pode ter sido favorecido pelo aumento na concentração de substrato ocasionada pela maior concentração de sacarose nestas amostras, menores índices de acidez e maiores valores de pH. Estes resultados se assemelham com aqueles obtidos por Saito et al, (2014) que, ao estudar o comportamento da população do *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 e *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 durante a estocagem a 4°C em produto fermentado a base de extrato de soja, observaram redução não superior a 1,00 log UFC/g.

#### 3.4. Acompanhamento do sabor dos queijos *petit-suisse* durante a estocagem

Os resultados do acompanhamento do sabor nas amostras dos queijos tipo *petit-suisse* estão apresentados na tabela 2. O controle e os tratamentos L.F 12h, L.P 12h, L.F+L.P 12h apresentaram alterações com a presença do

sabor amargo a partir de 21 dias de estocagem sob refrigeração. As amostras do tratamento L.F+L.P 100% S 12h apresentaram sabor amargo a partir de 35 dias de estocagem. Este comportamento pode está relacionado à presença de edulcorantes nas amostras e a proteólise muito forte ocasionada pela ação de micro-organismos lácteos sobreviventes a pasteurização, desenvolvidos durante a incubação em temperatura ótima de crescimento (GURGEL e OLIVEIRA, 1995).

As amostras do tratamento L.F+L.P 100% S S.F não apresentaram alterações no sabor durante a estocagem (42 dias), demonstrando boa potencialidade para desenvolvimento de um novo produto.

Tabela 2 – Acompanhamento do sabor durante a estocagem sob refrigeração ( $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) do queijo tipo *petit-suisse*.

Tratamentos	Tempo estocagem (dias)						
	1	7	14	21	28	35	42
Controle	SA	SA	SA	CA	CA	CA	CA
L.F 12h	SA	SA	SA	CA	CA	CA	CA
L.P 12h	SA	SA	SA	CA	CA	CA	CA
L.F+L.P 12h	SA	SA	SA	CA	CA	CA	CA
L.F + L.P 100 % S 12h	SA	SA	SA	SA	SA	CA	CA
L.F + L.P 100 % S S.F	SA	SA	SA	SA	SA	SA	AS

SA – Sem Alteração, CA – Com Alteração

Sem adição de lactobacilos com 12 horas de incubação (Controle); adicionado de 4% de *L. fermentum* TcUESC01 com 12 horas de incubação (L.F 12h); adicionado de 4% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.P 12h); adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.F+L.P 12h); com 100% de sacarose adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 com 12 horas de incubação (L.F+L.P 100% S 12h); com 100% de sacarose adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02 sem incubação (L.F + L.P 100% S S.F).

#### 4. Conclusão

A produção dos queijos *petit-suisse* a partir da coagulação enzimática do leite de búfala desnatado, adicionados de lactobacilos isolados da fermentação do cacau, demonstrou como boa alternativa para o desenvolvimento de produtos lácteos funcionais devido à sobrevivência em números adequados de micro-organismos probióticos por 42 dias, estocados sob refrigeração. Além disto, o produto apresentou uma boa qualidade microbiológica durante o armazenamento. Entretanto, apenas as amostras do tratamento L.F+L.P 100% S S.F não apresentou alterações no sabor durante o período de

armazenamento, se destacando como alternativa para o desenvolvimento de novos produtos, devido ao bom desempenho na qualidade microbiológica e viabilidade de lactobacilos probióticos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fazenda Diamantina (Ipiaú, Bahia, Brasil) pelo fornecimento do leite de búfalas, ao IF Baiano (Edital Interno - Recém Mestres 9/2013) por seu apoio financeiro e ao Centro de Tecnologia de Alimentos (IF BAIANO, Campus Uruçuca-BA) pela disponibilização dos laboratórios para execução do experimento.

### **Referências Bibliográficas**

ARAÚJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Bras. Reprod. Anim**, v. 29, p. 77-83, 2005.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. Brasília. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>

BRASIL, 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Tipo Petit-Suisse. Instrução Normativa Nº 53, de 29 de dezembro de 2000. Brasília. Disponível em: [http://www.agais.com/normas/leite/queijo\\_petit\\_suisse.htm](http://www.agais.com/normas/leite/queijo_petit_suisse.htm)

BRASIL, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais físico-químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº68, de 12 de agosto de 2006. Brasília. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=12397>

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. In: Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. [http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno_lista_alega.htm) (Acessado em: 21.11.2016).

BRASIL. 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Brasília, DF. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_02\\_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_02_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c)

CARDARELLI, H. R. et al. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

COSTA, R. G. B. **Tecnologia de fabricação e caracterização de queijo de coalho obtido de leite de búfala**. 2014. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

CUNHA NETO, O. C. et al. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 448-453, 2005.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

GURGEL, M.S.C.A., OLIVEIRA, A.J. Avaliação das características físico-químicas do iogurte. **Leite Derivados**, São Paulo, v.22, p.38-43, 1995.

HOIER, E. et al. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. **Technology of Cheesemaking, 2 Edition**, p. 166-192, 2010.

MELO, T. A. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 250, 2016.

MELO, T. A. et al. Functional profile evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: a new potential probiotic strain isolated during cocoa fermentation. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

OLIVEIRA, M. N. de et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

REIS, K. T. M. G. et al. Qualidade Microbiológica do Leite Cru e Pasteurizado Produzido no Brasil: Revisão. **Journal of Health Sciences**, v. 15, p 411-421, 2013.

SAITO, V. S. T. et al. Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. **Journal of food science**, v. 79, n. 2, p. 208-213, 2014.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B.. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

VEIGA, P. G. et al. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo petit suisse brasileiro. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 20, n. 3, p. 349-357, 2000.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

VINDEROLA, C. G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000.

## Development of cheese with probiotic potential from buffalo milk with addition of lactobacilli obtained from fermentation of Brazilian cocoa

J. S. Oliveira<sup>1</sup>, A. P. T. Uetanabaro<sup>2</sup>, R.P. Resende<sup>3</sup>, C.C. Romano<sup>3</sup>, J.D. T. Dias<sup>3</sup>, L. B. Rodrigues<sup>4</sup>, A.L.F. Porto<sup>5</sup>.

### Abstract:

Petit-suisse cheeses were prepared from skimmed milk of buffaloes without addition of lactobacilli (control), added with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (Lferm), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan) and simultaneously these two lactobacilli (Lplan+Lferm). Physical, chemical, microbiological and sensorial parameters were evaluated to determine the quality of petit-suisse. Titratable acidity (°D) and pH showed high variation during storage for Lplan+Lferm. The lactobacillus viability assessment, microbiological contaminant count and chemical composition are in accordance with legislation. There was no significant difference in acceptance of the overall impression attribute. The behavior of the texture profile was similar to that of the consistency. The Lplan and Lferm formulations stand out as promising for the development of probiotic petit-suisse with fat-free buffalo milk.

**Key words:** Functional food, probiotics, quality cheese.

---

<sup>1</sup> Centro de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Rua João Nascimento, S/N, Uruçuca, CEP 45680-000, BA, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia da Agroindústria da Univ. Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Tecnologia Rural e Animal, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA, Brazil.

<sup>5</sup> Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

## 1. Introduction

It is known that certain types of food have beneficial effects on human health. Despite this, the study of these foods, called functional foods, and their components, has been intensified in recent years. Functional foods are considered to be those that, in addition to providing basic nutrition, promote health. These foods have the potential to promote health through mechanisms unforeseen by conventional nutrition, emphasizing that this effect is restricted to health promotion rather than disease cure (Oliveira et al., 2002). Among functional foods, prebiotics have gained relevance. Probiotics are defined as the living microorganisms administered in adequate quantities that promote benefits to their host, favouring the intestinal microbial balance. Bacteria from the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* have been the most widely used probiotics in foods with claims of functional and/or health properties (Brazil, 2002).

Considering the properties of lactobacilli, dairy industries use these microorganisms in food production, being a promising and growing market (Sawitzki et al., 2007; Paez et al. 2007; Buriti e Saad, 2007; Paéz et al., 2012 ).

Buffalo milk has its own characteristics that allow its easy identification from a physical-chemical and sensorial point of view. It has a slightly sweet taste, is whiter than bovine milk, due to the almost total absence of carotene (provitamin A) in its fat. Compared to cow's milk, it presents differences in composition, due to the presence of a higher percentage of its constituents, mainly fat and protein, which confer a higher total solids degree, being responsible for the physical characteristics (structure, colour, taste) and higher industrial yield of its derivatives (Brito and Dias, 1998).

The production of dairy products from buffalo milk is still poorly studied, either because of the low volume produced in comparison with cow's milk or because the population's lack of knowledge about the characteristics of this milk, although its higher consumption is through derivatives.

In addition to the Italian mozzarella cheese, dairy products have produced several derivatives from buffalo milk. In order to avoid the presence of pathogenic or deteriorating micro-organisms in the products destined for

consumption, it is necessary to have a good hygienic condition for the use of milk of this species in human food (Cunha Neto, 2005).

Brazil (2000) defines petit-suisse as a cheese of very high humidity, to be consumed fresh, unripened, obtained by coagulation of the milk with rennet and/or specific enzymes and/or specific bacteria, with or without other food substances, and its production through mixed coagulation with the simultaneous use of starter cultures and coagulant enzymes.

Due to the concern of the world population for healthy and attractive products, specifically with the use of probiotic by consumers, the development of new food products becomes increasingly challenging. Due to this great expansion in the use of probiotics for feeding it is necessary to study the importance of these bioactives for human health, and its use in the dairy industry (OLIVEIRA et al., 2002).

Currently, the use of skimmed buffalo milk, with reduced calories, is not known for the production of petit-suisse cheese using only enzymatic coagulation, as well as the effects of probiotic cultures of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 in this type of milk. In this way, the present work proposes the development of a petit-suisse cheese produced from skimmed buffalo milk with the addition of lactobacilli with probiotic potential as a proposal for the development of new products, which is an economic alternative for national buffalo breeding.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Microorganisms

The lineages of lactic bacteria used in this study were previously isolated from natural fermentation processes of cocoa beans from the Ilhéus region and stored in ultra-freezer at -86°C in MRS broth supplemented with glycerol (20% v/v). The lineages studied here, *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 were selected and evaluated as potential probiotics in the works of Melo et al. (2016) and Saito et al. (2014). The lineages were reactivated by successive transfers in MRS broth (Man, Rogosa and Sharpe), the first at 37°C for 48h and the second at 37°C for 16h. Thereafter, they were centrifuged under refrigeration (Eppendorf AG, 5810R,

Hamburg, Germany) at 13751 x g at 5°C for 15 min. The supernatant was removed and the culture reconstituted for washing with saline solution of sodium chloride (0.85% w/v) sterile was repeated twice. The cells were then diluted in buffalo pasteurized skimmed milk.

## 2.2. Preparation of petit-suisse cheese

The formulations were elaborated from different combinations of the lactobacilli lineages studied. The cultures used had a population of  $9 \times 10^9$  CFU/mL. Skimmed buffalo milk was pasteurized at 70°C for 30 min and cooled to 35°C where 50% (w/v) calcium chloride was added at a dosage of 0.04% (v/v) and coagulant HA-LA by Chr. Hansen in the proportion of 0.1% (v/v). After 40 min the curd was cut and homogenized slowly for 2 min. Part of the serum equivalent to 60% of the initial milk volume was withdrawn, and Chr. Hansen BCC 300-WS FCCII natural carmine dye was added, 200 mesh xanthan gum, natural flavour identical to that of GEM strawberry 201.109 I of Gemacom (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil), at the dosage recommended by the manufacturer and the equivalent of 12% (w/w) of sucrose. The ingredients were homogenized in Vitalex/LIQ 8 industrial blender for 3 min. In the treatments with bacteria with probiotic potential was added 4% (v/v) of the cultures containing *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan) and *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (Lferm), respectively. In the Lplan+Lferm treatment the two lines were added simultaneously at the concentration of 2% (v/v). After the addition of the cultures and strawberry preparation (Gemacom's TEC 20,410 VR) at the concentration of 5% (w/v), the mixture was again homogenized in the industrial blender for 30 sec. They were packed in 100 ml plastic bottles, with no free space in the package. Samples were stored at  $6 \pm 1$  ° C for 63 days.

## 2.3 Determination of pH and Dornic acidity

The physico-chemical characterization was performed in the triplicate samples during the periods of 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63 days of storage. pH was measured using a pH/ION meter (Mettler Toledo) and Dornic acidity was performed using 10 g of the sample, titrating with 0.11 mol/L NaOH solution until pH 8.2 to 8.4, in accordance with Brazil (2006).

## 2.4 Microbiological evaluation of petit-suisse cheese

Due to the high humidity level, petit-suisse cheese presents adequate conditions for the development of contaminating micro-organisms. On account of food, Brazil (1996) establishes the count of total coliforms, thermotolerant coliforms (*E. coli*), filamentous fungi and yeasts, *Staphylococcus aureus* (positive Coagulase) and *Salmonella* as control parameters for this type of cheese.

1 mL aliquots of the  $10^{-1}$  dilution of the samples were transferred to Petrifilm™ EC plates (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) for count of coliforms and *Escherichia coli*, to Petrifilm™ YM plates (3M Microbiology) for count of filamentous fungi and yeast, and to Petrifilm™ STX (3M Microbiology) plates for *Staphylococcus aureus* count according to the manufacturer's instructions. The plates were incubated at 35°C for 48 hours for count of coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and at 25°C for 5 days for count of filamentous fungi and yeasts. Analyses were carried out on triplicate petit-suisse cheese samples, during the storage period (01, 07, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63 days).

## 2.5 Viability evaluation of probiotic potential lineages in petit-suisse cheese

Quantification of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 was performed in triplicate during storage ( $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Aliquots of 10 g of the petit-suisse cheese sample were diluted in 90 mL of sterile 0.85% (w/v) NaCl solution. Serial dilutions were prepared using the same diluent. 0.1 mL were inoculated onto MRS agar plates (Himedia, India) and incubated at 37°C for 48 hours. The viability of lineages with probiotic potential in the petit-suisse cheese was performed in triplicates during the storage period (01, 07, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63 days).

## 2.6 Determination of the centesimal composition

The centesimal composition of the petit-suisse cheese samples was obtained according to the methodology proposed by the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2000), and the results were expressed in relation to the whole matter after 35 days of storage, in triplicate, by determination of the degrees of fixed mineral residue (FMR), humidity (HU), total carbohydrates

(TC), crude protein (CP) and fatty matter (FM). The level of humidity was determined by drying 5 g of the sample in a sterilization and drying oven (FANEN MA030112, Piracicaba, Brazil) at 105°C, under forced ventilation, for 1 hour, with desiccant cooling and successive drying until it reaches steady weight. Fixed mineral residue was determined by gravimetry by heating in a muffle furnace (Jung, 1712, Blumenal, Brazil) of 2 g of the sample at 550°C for 5 to 6 hours until completely calcined. The crude protein concentration was estimated by measuring the nitrogen level, by the Kjeldahl method, and multiplying by a conversion factor (6.38) after digestion with sulfuric acid of 5 g of the Kjeldahl digester sample (Tecnal, 040125, Piracicaba, Brazil).

The fatty matter level was determined by the extraction of lipids with sulfuric acid using the butyrometric method for fluid milk, in which 10 mL of sulfuric acid (density 1,820 g.cm<sup>-3</sup> at 20°C) was added to the Gerber butyrometre for skim milk, 11 mL of the sample was diluted in 50% (w/v) and 1 mL of the isoamyl alcohol (density 0.810 g.cm<sup>-3</sup> at 20°C). After stirring, the mixture was centrifuged at 1200 rpm in a centrifuge (ITR, 86, Esteio, Brazil). The result read at 65°C in the butyrometer was multiplied by 2. The determination of the total carbohydrate levels were obtained by difference through equation [100- (FMR + FM + CP + HU)].

## 2.7 Determination of the texture profile

The texture profile of the petit-suisse cheese samples was evaluated after 35 days of refrigerated storage at 6 ± 1°C. The method used was the analysis of the instrumental texture profile (TPA), where the parameters of TPA hardness, adhesiveness, elasticity, cohesiveness and gumminess were evaluated. The assays were performed in five replicates on a previously calibrated TA.HD plus (Stable Micro Systems, UK) texture analyzer equipped with a 50 kg load cell using a 6 mm diameter stainless steel cylindrical probe (P6). The data obtained, collected at a rate of 200 points per second (200 PPS), were processed in the "Texture Expert for Windows 1.20" software (Stable Micro Systems, UK). The speed employed was 2.00 mm.s<sup>-1</sup>, for the pre-test, test and post-test. Samples were taken from the refrigerator just before the test.

## 2.8 Sensory Evaluation

During the sensorial evaluation was carried out on samples of petit-suisse cheese, sensory acceptance, preference and intention of purchasing of the tasters. A total of 87 testers were recruited from the academic community of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Bahia, Campus Uruçuca-Bahia, with 74% being younger than 21 years of age, 15% between the ages of 21 and 30 years, and 11% older than 30 years of age. The majority of the tasters (76%) were female. Tasters were healthy and spontaneously accepted to participate in the sensory test and reported that they had no allergies or problems of intolerance consuming petit-suisse cheese. The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Nutrition (ENUFBA) of the Federal University of Bahia (CAAE: 54355116.0.0000.5031). Samples of petit-suisse cheese obtained with formulations prepared with lactobacilli with probiotic potential were submitted to the sensory acceptance test using the nine-point hedonic scale in which 'one' represented "highly disliked", "five", "Indifferent" and "nine", "I liked it very much", where the overall impression, colour, consistency and flavour were evaluated (Stone et al., 2012). In addition, the preference was evaluated through the ordering test, using the Friedman test, and intention of to buy (Ferreira et al., 2000).

## 2.9 Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA), grouping and comparison of means were performed by the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ) using the Sisvar 5.6 program (Ferreira, 2011).

# 3 Results and Discussion

## 3.1 Monitoring pH and titratable acidity during storage

Figures 1 and 2 show the behaviour of pH and Dornic acidity during the 63-day storage period of the petit-suisse cheese samples at  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ , obtained by enzymatic coagulation. It is common the continuous production of lactic acid and other organic acids caused by the use of initial cultures and / or probiotic and incubation at a temperature of optimal growth of these microorganisms. This causes reduction of pH and increase of acidity in fermented dairy products,

being common products with pH lower than 5.5 and with Dornic acidity higher than 90 ° D (Cardarelli, 2008).

The absence of probiotic lactobacilli and starter culture in their formulation. On the other hand, the petit-suisse cheeses with 4% of *L. plantarum* TcUESC02 (Lplan) and 4% of *L. fermentum* TcUESC01 (Lferm) added presented changes in pH values (0.49 and 0.33, respectively) and Dornic acidity (19.00 and 12.33 ° D, respectively) during storage, demonstrating the action of lactobacilli on changes in the values of these parameters. The samples of the cheese in which was added simultaneously 2% of *L. plantarum* TcUESC02 and 2% of *L. fermentum* TcUESC01 (Lplan + Lferm) presented higher changes in pH (0.67) and acidity (23.33 ° D), when compared to the other treatments. These results corroborate those obtained by Saito et al. (2014) wich observed larger changes in the values of these parameters in soy extract yogurt with *L. Fermentum* TcUESC01 and *L. plantarum* TcUESC02.

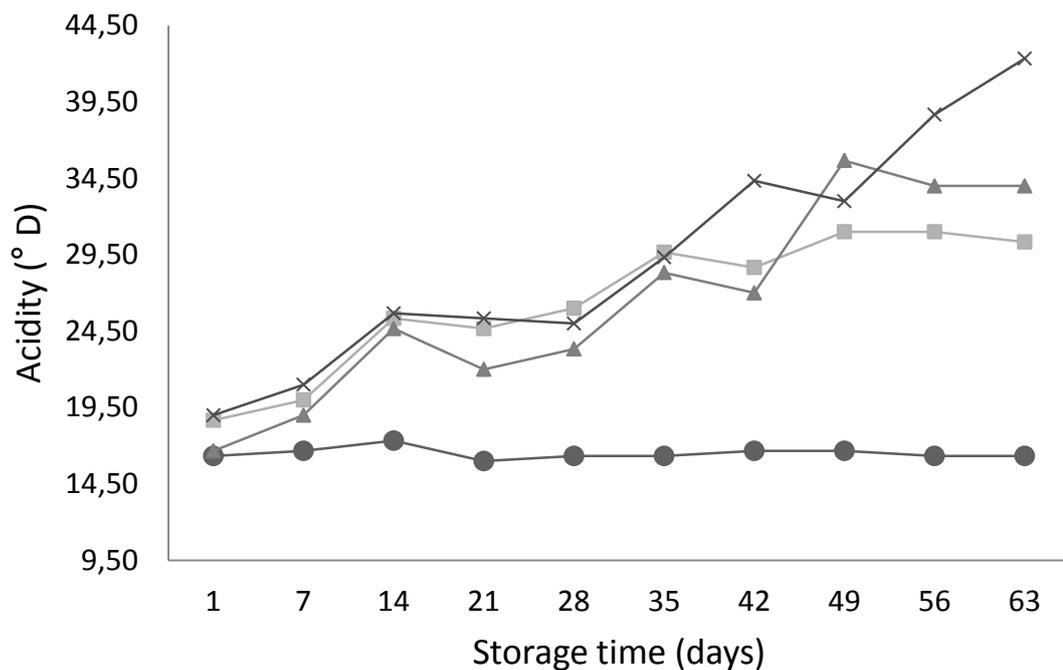


Figure 1. Values of Dornic acidity (°D) during storage of petit-suisse cheese.

Petit-suisse cheese without addition of lactobacilli ( ● Control); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 ( ■ Lferm); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 ( ▲ Lplan); Petit-suisse cheese with addition of 2% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and 2% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 ( × Lplan+Lferm).

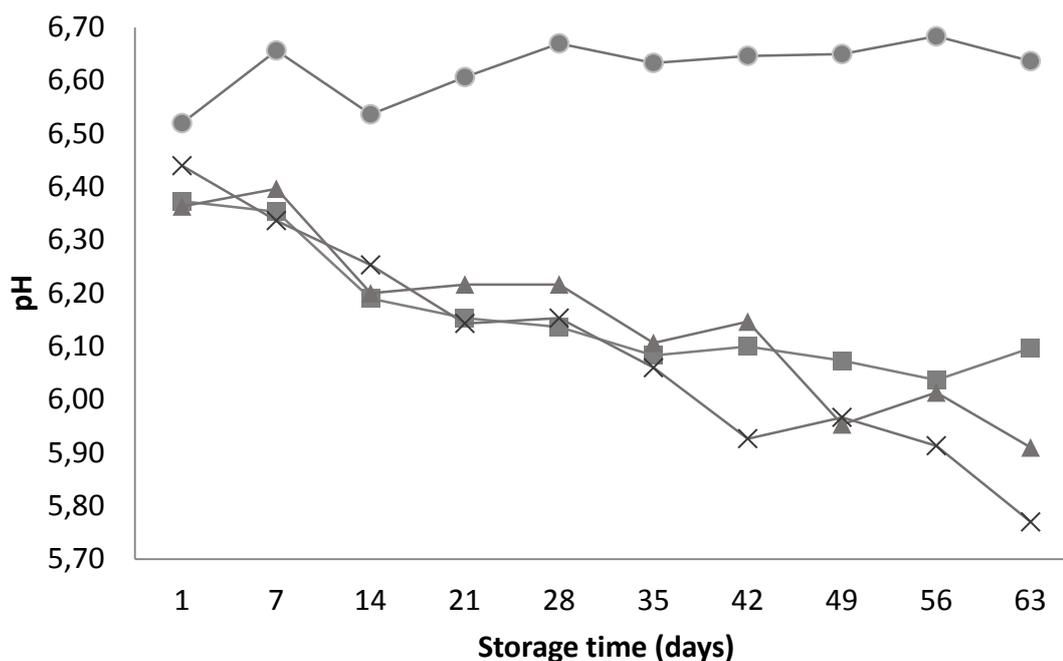


Figure 2. pH curve during storage of petit-suisse cheese.

Petit-suisse cheese without addition of lactobacilli ( ● Control); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 ( ■ Lferm); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 ( ▲ Lplan); Petit-suisse cheese with addition of 2% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and 2% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 ( × Lplan+Lferm).

### 3.2 Microbiological evaluation of petit-suisse cheese during storage

All treatments evaluated during the storage period presented values lower than 10 CFU/g of total coliforms, thermotolerant coliforms (*E. coli*), filamentous fungi and yeasts, and *Staphylococcus aureus*, which were lower than the established by Brazilian law, and the maximum limits were 100 MPN/g (Most Probable Number per gram), 10 MPN/g, 500 CFU/g and 10 CFU/g, respectively, indicating that the conditions of production and storage were adequate (Brazil, 1996). In addition, studies by Fioramonti et al. (2003) suggested that lactic bacteria inhibit *in vitro* the multiplication of enteric pathogens such as *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli* and *Clostridium perfringens*. According to Araújo and Gheller (2005), buffalo milk has a better microbiological quality than bovine milk, due to the higher concentration of protective molecules of the ceiling, such as keratin and melanin, and a higher concentration of antimicrobial substances in milk, such as lactoferrin and lactoperoxidase, as well as high antibacterial efficacy of buffalo leukocytes. In

addition, the heat treatment applied to skimmed milk (70°C for 30 min) was superior to what is commonly used in slow pasteurization (65°C for 30 min), ensuring a better microbiological quality of the product.

### 3.3 Evaluation of the viability of probiotic lineages during storage of petit-suisse cheese

Table 1 presents the viability results of the lactobacilli added to the petit-suisse cheese during storage ( $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ). In the control treatment the lactobacilli count during storage was below 1 log CFU/g, demonstrating that the heat treatment was able to significantly reduce the number of lactic bacteria present in the skimmed milk. Samples of petit-suisse cheese produced from buffalo skimmed milk from the Lplan, Lferm and Lplan+Lferm treatments showed lactic bacteria populations above 7 log CFU/g during storage for 63 days. These values are in agreement with the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA, 2008), which recommends a minimum consumption of viable probiotics in the range of 8 to 9 log Colony Forming Units in the daily consumption of the product, in which case the minimum intake of 10 g of the cheese studied in this work is necessary. Hoier et al. (1999); Vinderola, Prosello, Ghiberto, and Reinheimer (2000); Vinderola and Reinheimer (2000), also recommend these values to produce beneficial effects on host health. The Lplan and Lferm treatments samples showed Lactic bacteria count at 63 days of storage lower than Lplan+Lferm ( $p > 0.05$ ). These results caused the reduction of pH (0.67) and the increase of acidity (23.33 °D), proving the effect of the population of lactic bacteria on these surfaces.

A decrease of less than 1 log CFU/g was also observed during the storage period. Obtaining the petit-suisse cheese by enzymatic coagulation, submitted to storage at refrigeration temperatures, promoted a small decrease in pH values in cheeses and, consequently, a higher stability in the lactobacilli population. Saito et al. (2014) observed a reduction not exceeding 1 log CFU/g. of population of *L. fermentum* TcUESC01 and *L. plantarum* TcUESC02 during the storage at 4°C in soybean-based yogurts.

Table 1 - Lactic bacteria count (log CFU\*/g) during storage of petit-suisse cheese under refrigeration.

Treatments	Storage time (days)									
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	63 d
<b>Lplan</b>	7.84 ±	7.99 ±	7.86 ±	7.90 ±	7.72 ±	7.54 ±	7.38 ±	7.31 ±	7.60 ±	7.37 ±
	0.34 <sup>bA</sup>	0.09 <sup>aA</sup>	0.09 <sup>bA</sup>	0.09 <sup>aA</sup>	0.02 <sup>aB</sup>	0.04 <sup>aC</sup>	0.04 <sup>bD</sup>	0.03 <sup>bD</sup>	0.10 <sup>aC</sup>	0.04 <sup>bD</sup>
<b>Lferm</b>	8.03 ±	7.95 ±	7.75 ±	7.58 ±	7.54 ±	7.46 ±	7.20 ±	7.26 ±	7.62 ±	7.47 ±
	0.02 <sup>aA</sup>	0.05 <sup>aA</sup>	0.05 <sup>bB</sup>	0.07 <sup>bC</sup>	0.04 <sup>aC</sup>	0.09 <sup>aC</sup>	0.07 <sup>cD</sup>	0.12 <sup>bD</sup>	0.03 <sup>aC</sup>	0.06 <sup>bC</sup>
<b>Lplan+Lferm</b>	8.09 ±	8.08 ±	7.97 ±	7.55 ±	7.63 ±	7.53 ±	7.62 ±	7.57 ±	7.71 ±	7.71 ±
	0.13 <sup>aA</sup>	0.04 <sup>aA</sup>	0.16 <sup>aA</sup>	0.06 <sup>bB</sup>	0.06 <sup>aB</sup>	0.06 <sup>aB</sup>	0.03 <sup>aB</sup>	0.05 <sup>aB</sup>	0.07 <sup>aB</sup>	0.08 <sup>aB</sup>

<sup>a-c</sup>: Averages with different lowercase letters differ from each other in the same column (p>0.05).

<sup>A-D</sup>: Averages with different capital letters differ in the same line (p>0.05).

\* Colony Forming Unit

Petit-suisse cheese without addition of Lactobacilli (Control); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (Lferm); Petit-suisse cheese with addition of 2% *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and 2% *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan+Lferm).

### 3.4 Centesimal composition of petit-suisse cheese

Centesimal composition of cheeses can influence pH values, Dornic acidity, viability of lactobacilli, instrumental texture and sensorial evaluation. The results of the Fixed Mineral Residue (FMR), Fatty Matter (FM), Crude Protein (CP), Total Carbohydrate (TC) and Humidity (HU) are presented in Table 2. There were no significant differences (p> 0.05) in results obtained for FMR and FM. CP and TC levels were higher in the samples from the control treatment, being consequently lower for the HU.

These results were influenced by the effect of dilution by the addition of lactobacilli in sterilized skim milk during the preparation of the Lplan, Lferm and Lplan+Lferm treatments. The centesimal composition of the petit-suisse cheese samples presented is in agreement with Brazil (2011), which establishes minimum levels of 6% for milk protein and 55% of humidity for petit-suisse cheese obtained from milk of cow. According to Brazil (1998), all samples can be denominated as Zero-total-fat, which establishes a maximum limit of 0.5% of fats for solid foods.

Table 2 - Centesimal composition of petit-suisse cheese samples

Treatments	Centesimal composition (%)				
	FMR	FM	CP	TC	HU
<b>Control</b>	1.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.38 ± 0.23 <sup>a</sup>	20.38 ± 0.15 <sup>a</sup>	69.82 ± 0.12 <sup>c</sup>
<b>Lplan</b>	1.29 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	7.60 ± 0.21 <sup>b</sup>	17.31 ± 0.12 <sup>b</sup>	73.79 ± 0.23 <sup>b</sup>
<b>Lferm</b>	1.24 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	7.71 ± 0.16 <sup>b</sup>	17.03 ± 0.32 <sup>b</sup>	74.00 ± 0.21 <sup>b</sup>
<b>Lplan+Lferm</b>	1.29 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	7.67 ± 0.22 <sup>b</sup>	16.50 ± 0.30 <sup>c</sup>	74.51 ± 0.20 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup>: Averages with different lowercase letters differ from each other in the same column ( $p > 0.05$ ).

Petit-suisse cheese without addition of lactobacilli (Control); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (Lferm); Petit-suisse cheese with addition of 2% *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and 2% *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan+Lferm).

Fixed Mineral Residue (FMR), Fatty Matter (FM), Crude Protein (CP), Total Carbohydrate (TC) and Humidity (HU)

### 3.5 Instrumental texture profile of petit-suisse cheese

The values for analysis of the instrumental texture profile (TPA) hardness, TPA elasticity and TPA gumminess were higher for the control (table 3). This is due to the lower level of humidity identified in this treatment. In addition, the high pH and stable Dornic acidity observed during the storage of this cheese contributed to obtain higher values in these studied parameters. On the other hand, the petit-suisse Lplan+Lferm presented the lowest values for hardness because it had the highest humidity level. In addition, together with the cheese added only from Lplan, it presented higher value for adhesiveness (-18.199 gfs) and lower value for elasticity (0.756). There were no significant differences between the treatments in the values for cohesiveness, which corresponds to a measure in which, in this case, the cheese can be deformed before breaking, depending on the strength of internal protein bonds (Gunasekaran and Ak, 2002).

Table 3 - Instrumental texture profile of petit-suisse cheeses

Treatments	Instrumental Texture Profile				
	Hardness (gf)	Adhesiveness (gfs)	Elasticity	Cohesiveness	Guminess (gf)
Control	18.060 ± 2.071 <sup>a</sup>	-46.396 ± 4.983 <sup>c</sup>	0.922 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.685 ± 0.042 <sup>a</sup>	12.374 ± 1.576 <sup>a</sup>
Lplan	8.859 ± 1.090 <sup>b</sup>	-19.744 ± 3.683 <sup>a</sup>	0.792 ± 0.058 <sup>c</sup>	0.639 ± 0.047 <sup>a</sup>	5.661 ± 0.806 <sup>b</sup>
Lferm	11.387 ± 2.751 <sup>b</sup>	-28.954 ± 4.794 <sup>b</sup>	0.843 ± 0.054 <sup>b</sup>	0.609 ± 0.010 <sup>a</sup>	6.951 ± 1.780 <sup>b</sup>
Lplan+Lferm	7.425 ± 1.131 <sup>c</sup>	-18.199 ± 2.368 <sup>a</sup>	0.756 ± 0.069 <sup>c</sup>	0.633 ± 0.056 <sup>a</sup>	4.741 ± 1.062 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>: Averages with different lowercase letters differ from each other in the same column ( $p > 0.05$ ). Petit-suisse cheese without addition of Lactobacilli (Control); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (Lferm); Petit-suisse cheese with addition 2% *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and 2% *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan+Lferm).

### 3.6 Sensory evaluation of petit-suisse cheeses

#### 3.6.1 Acceptance Testing

The acceptance of samples of petit-suisse cheeses with the addition of probiotic lineages evaluated ranged from "Indifferent (5)" to "I liked it moderately (7)" when evaluating the attributes overall impression, colour, consistency and flavour (Figure 3).

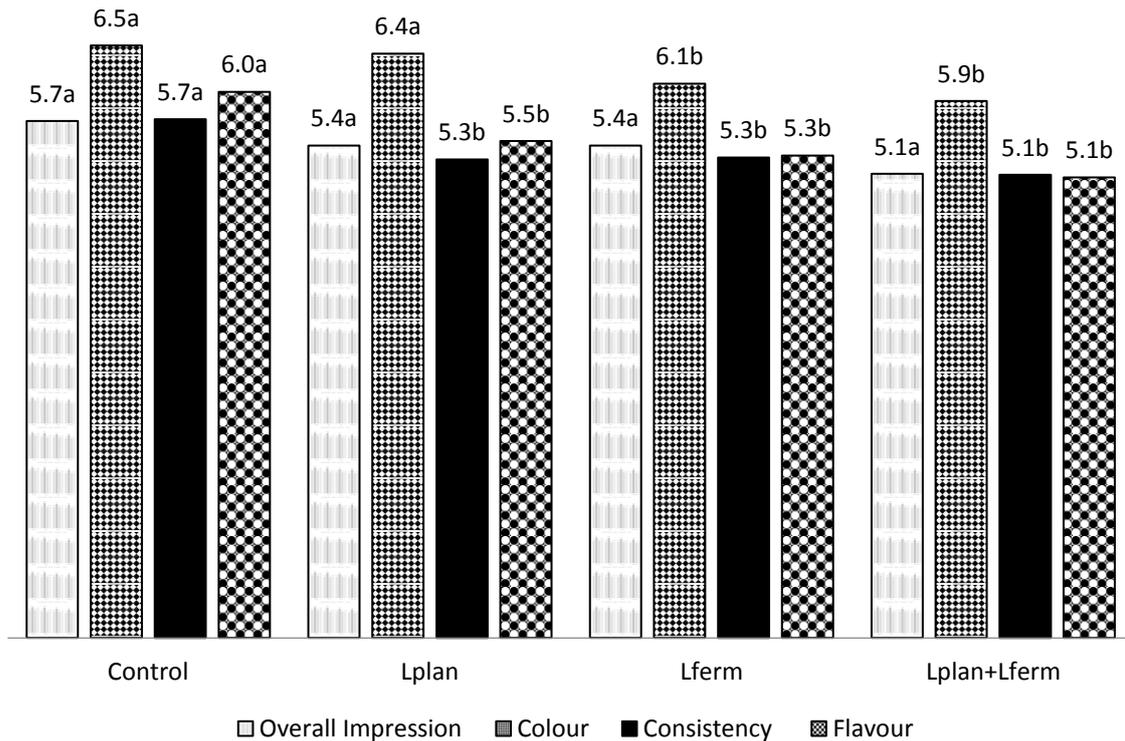


Figure 3 - Sensorial acceptance of petit-suisse cheeses made with buffalo skimmed milk with the addition of probiotic lineages.

Petit-suisse cheese without addition of lactobacilli (Control); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (Lferm); Petit-suisse cheese with addition of 2% *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and 2% *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan+Lferm).

<sup>a-c</sup>: Averages with different lowercase letters differ from each other ( $p > 0.05$ ).

There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) among the treatments evaluated in the overall impression attribute. As for colour, the values for the control and Lplan were higher than those obtained for Lferm and Lplan+Lferm. The control presented was more accepted than the treatments Lplan, Lferm and Lplan+Lferm in the attributes consistency and flavour. These results may be related to higher humidity levels and pH values in the treatment samples without the addition of lactobacilli. Consequently, the values of the texture profile (hardness, adhesiveness, elasticity and gumminess) also influenced these results. Buriti et al. (2005), evaluating the effects of the addition of *Lactobacillus acidophilus* on the minas frescal cheese on the sensorial properties, observed an increase in the sensorial acceptance due to the increase in pH.

### 3.6.2 Preference Test and Purchase Intent

The evaluation of the preference of the petit-suisse cheeses performed by the tasters through the sorting test is presented in table 4. Friedman's sum orders showed that there were no significant differences ( $p < 0.05$ ) regarding the preference of the tasters for the Control and Lplan and Lferm treatments, with the Lplan+Lferm treatment being less preferred. This behaviour can be related to the lower value for hardness, higher humidity content, higher Dornic acidity and lower pH when compared to the other treatments.

When evaluated the intention to buy, 64% of the tasters expressed interest in buying the most preferred petit-suisse cheeses. In this way it can be inferred that, although the treatments Lplan and Lferm have less acceptance for the sensory attributes consistency and flavour, when they are compared with the control, they have the same preference by the tasters, when the Friedman's sum of orders test is used.

Table 4 - Results of the preference of the judges on the petit-suisse cheese made with buffalo skimmed milk with the addition of probiotic lineages through the Ordination test

	Treatments			
	Controle	Lplan	Lferm	Lplan+Lferm
<b>Sum of Orders *</b>	249 A	206 A	212 A	203 B
Significant difference	44			

\* Sum of orders followed by the same letter do not differ from each other, by Friedman's sum of orders test, at 5% probability ( $p < 0.05$ ).

Petit-suisse cheese without addition of lactobacilli (Control); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan); Petit-suisse cheese with addition of 4% of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (Lferm); Petit-suisse cheese with addition of 2% *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and 2% *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (Lplan+Lferm).

## 4. Conclusion

The production of petit-suisse cheeses from the enzymatic coagulation of buffalo skimmed milk with addition of lactobacilli isolated from cocoa fermentation has been shown as a good alternative for the development of

functional dairy products due to the survival in adequate numbers of probiotic microorganisms for nine weeks, under refrigeration. In addition, the product presented good microbiological quality during storage. The petit-suisse cheeses with the addition of 4% of *L. fermentum* TcUESC01 and the addition of 4% of *L. plantarum* TcUESC02 stood out as a promising alternative for the development of new products, due to the good performance in the sensorial evaluation, microbiological quality and viability of probiotic lactobacilli.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Fazenda Diamantina (Ipiaú, Bahia, Brazil) for the supply of buffalo milk, to IF Baiano (Internal Edict - New Masters 9/2013) for their financial support and to the Food Technology Center (IF BAIANO, Campus Uruçuca-BA) for the availability of laboratories for the execution of the experiment.

## References

ANVISA, 2008. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. In: Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. [http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno_lista_alega.htm) (Acessado em: 21.11.2016).

Araujo, D.K.G., Gheller, V.A., 2005. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 29, 77-83.

AOAC -ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 2000. Official methods of analysis of the association of analytical chemistry. 14<sup>a</sup> edição. Washington. Nova Iorque.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. Brasília. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>

BRASIL, 1998. Ministério da Agricultura e do abastecimento. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Brasília. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA\\_27\\_1998.pdf/72db7422-ee47-4527-9071-859f1f7a5f29](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_27_1998.pdf/72db7422-ee47-4527-9071-859f1f7a5f29).

BRASIL, 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Tipo Petit-Suisse. **Instrução Normativa Nº 53, de 29 de dezembro de 2000**. Brasília. Disponível em: [http://www.agais.com/normas/leite/queijo\\_petit\\_suisse.htm](http://www.agais.com/normas/leite/queijo_petit_suisse.htm)

BRASIL. 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Brasília, DF. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_02\\_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_02_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c)

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C., 1998. A qualidade do leite. Tortuga, Juiz de Fora: /São Paulo: Tortuga, pp. 88-89 (EMBRAPA, Manual técnico 3).

Buriti, F.C.A., Rocha, J.S., Saad, S.M.I., 2005. Incorporation of Lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. International Dairy Journal.15, 1279-1288.

Buriti, F.C.A., Saad, S.M.I., 2007. Bactérias do grupo Lactobacillus casei: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 57, 373-376.

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 synbiotic petit-suisse cheese. LWT-Food Science and Technology, 41, 1037-1046.

Cunha Neto, O.C., Oliveira, C.A.F., Hotta, R.M., Sobral, P. J. A., 2005. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25, 448-453.

Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35, 1039-1042.

Ferreira, V., Almeida, T., Pettinelli, M., Silva, M., Chaves, J., Barbosa, E., 2000, Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. Campinas, pp. 125-127. (SBCTA, Manual: Série Qualidade).

Fioramonti, J., Theodorou, V., Bueno, L., 2003. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17, 711-724.

Gunasekaran, S., Ak, M.M., 2002. Cheese rheology and texture. CRC press. Washington, New York.

Hoier, E., Janzen, T., Rattray, F., Sorensen, K., Borsting, M. W., Brockmann, E., Johansen, E., 1999. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. *Technology of cheesemaking*, 99-131.

Melo, T. A., dos Santos, T. F., de Almeida, M. E., Junior, L. A. G. F., Andrade, E. F., Rezende, R. P., Marques, L.M., Romano, C. C., 2016. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC microbiology*, 16, (1), 250. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0871-8> (Acessado em: 11.01.2016).

Oliveira, M. N., Sivieri, K., Alegro, J.H.A., Saad, S.M.I., 2002. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38, 01-21.

Paéz, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinheimer, J., 2012. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 48, 748-754.

Saito, V.S.T., Santos, T.F., Vinderola, C.G., Romano, C., Nicoli, J.R., Araújo, L.S., Uetanabaro, A.P.T., 2014. Viability and Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. *Journal of food science*, 79, 208-213.

Santos, T.F., Melo, T.A., Almeida, M.E., Rezende, R.P, Romano, C.C., 2016. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on Intestinal Epithelial and Mononuclear Cells. *BioMed Research International*, 2016, 1-8.

Sawitzki, M. C., Fiorentini, Â. M., Brod, F.C.A., Tagliari, C., Bertol, T.M., Arisi, A.C.M., Sant'Anna, E.S., 2007. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 547-552.

Stone, H., Bleibaum, R., Thomas, H.A., 2012. Sensory evaluation practices, Academic Press, Quarta edição. Nova Iorque , Nova Iorque.

Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A., 2000. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10, 271–275.

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

***In vitro* and *in vivo* evaluation of two potential probiotic lactobacilli  
isolated from cocoa fermentation (*Theobroma cacao* L.)**

Oliveira JS,<sup>1,4\*</sup> Costa K<sup>2</sup>, Acurcio LB,<sup>2</sup> Sandes SHC,<sup>2</sup> Cassali GD,<sup>3</sup> Uetanabaro APT,<sup>4</sup> Nicoli JR,<sup>2</sup> Neumann E,<sup>2</sup> Porto ALF,<sup>5</sup>

**Abstract**

*Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF) and *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP) isolated from the fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) were evaluated as potential probiotics. Both lactobacilli showed antagonism by diffusible inhibitory compounds against six pathogenic indicator bacteria. In mice orally challenged with *Salmonella* Typhimurium, a possible protective effect of oral administration of the lactobacilli was evaluated by determination of survival, translocation to spleen and liver, IgA levels in intestinal fluid, pro- and anti-inflammatory expression of cytokines in ileum, as well as by histological and morphometric analysis determination in ileum and liver. The LF and LP showed to be potential probiotics based on better results obtained by *in vitro* evaluations (production of diffusible inhibitory compounds) as well as per *in vivo* experiments (higher survival after enteropathogen challenge, lower hepatic and splenic translocation of enteropathogen, higher IgA ileal production, lower histopathological lesions in liver and anti-inflammatory pattern of immunological response).

**Keywords:** Probiotic, *Lactobacillus*, cocoa fermentation, mice, antagonism.

---

<sup>1</sup>Centro de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Uruçuca, BA, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

**\*Corresponding author:** Oliveira JS, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Uruçuca, BA, Brazil. Phone: +55 73 3239 2222 E-mail: josueso2@yahoo.com.br

## 1. Introduction

Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer health benefits to the host (Joint, 2002). These microorganisms are generally isolated from the same host localization (gastrointestinal, vaginal or cutaneous) where they will be re-administered to obtain some benefits. However, some probiotics do not belong to the host indigenous microbiota and have been selected from another source such as fruit (*Saccharomyces*) (Martins et al. 2005) or fermented foods (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*) (Bambirra et al. 2007; Saito et al. 2014; Zanirati et al. 2015; Alvim et al. 2016; Santos et al. 2016; Melo et al. 2017; Ornellas et al. 2017). The advantage of these latest probiotics lies in the way of administration as fermented or supplemented food, which is already available and of common use. Additionally, they generally can confer a double protective action through antagonism against deteriorative or pathogenic agents in their food sources (cheese, sausage) as well as against enteropathogens in the host digestive tract after its ingestion (Bambirra et al. 2007).

The fermentation of cocoa beans is an important step for the chocolate preparation that imparts desirable flavor to the final product. Yeasts, lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) are the essential microorganisms that are vital for successful cocoa pulp fermentation. In general, cocoa processing and subsequent changes occurring during fermentation lead to the dominance of LAB and yeasts that confer required product characteristics. LAB is pivotal between the yeast and the AAB in cocoa fermentation, converting citric acid and remaining carbohydrates in the pulp to lactic acid, resulting in a slight decrease in pH. *Lactobacillus fermentum* is generally the predominant species present during the fermentation process, followed by *Lactobacillus plantarum/paraplantarum* (Bortolini et al. 2017).

In humans, *Salmonella* is believed to cause over one billion infections annually, with consequences ranging from self-limiting gastroenteritis to typhoid fever. In contrast to the severe outcome of disease in humans, *Salmonella enterica* serovar Typhi is not virulent in most animals, including mice. However, the disease associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice closely resembles that of *S. Typhi* in humans. *S. Typhimurium* infection

in mice is therefore widely accepted as an experimental model for typhoid fever in humans (Santos et al. 2001). Infection of mice with *S. Typhimurium* induced significant clinical manifestations, tissue damage, and lethality. These manifestations are well known and described during experimental infection of murine models with *S. Typhimurium* and enteroinvasive *Escherichia coli*, and are the results of inflammation in the gut and liver of animals induced by the pathogenic bacteria through inflammation-associated signaling pathways (Eckmann et al. 2000; Guiney 2005; Huang 2009). A wide range of antibiotics are used to treat human salmonellosis, but genetic mutations and selective pressure have pushed bacteria to become resistant or multi-resistant to antibiotics (Whichard et al. 2007). Development of alternative processes for the treatment and prevention of gastrointestinal disorders, such as probiotics, has become an attractive option. *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 have been previously isolated from natural fermentation processes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) and selected as potential probiotics in previous studies (Saito et al, 2014; Melo et al. 2017).

In the present study, these two lactic acid bacteria were evaluated for probiotic application using *in vitro* (spot on the lawn antagonism) and *in vivo* (mortality, translocation, histopathology and mRNA cytokine gene expression during an experimental infection with *S. Typhimurium* in mice) assays.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Animals*

Three weeks old female Balb/c mice were supplied by the Centre for Animal Care (CEBIO) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. Animals were maintained in a ventilated animal caging system (Alesco, Monte Mor, Brazil) with controlled lighting (12 h light-dark cycle), humidity (60-80%) and temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Water and a commercial autoclavable diet (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, Brazil) were sterilized by steam and administered *ad libitum*. The Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA) from UFMG approved the study (Protocol number 390/2016).

## 2.2. Bacteria

*Lactobacillus fermentum* TcUESC01 and *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 were previously isolated from natural cocoa fermentation processes (*Theobroma cacao* L.) and selected as potential probiotics in previous studies (Saito et al, 2014; Melo et al. 2017). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 pertains to the collection of the Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG, Belo Horizonte, Brazil) and was activated twice from freezing storage by inoculation (2% v/v) in brain heart infusion broth (BHI, Acumedia, Lansing, USA) at 37°C for 18 h under aerobic conditions before use for murine infection. The pathogenic indicator bacteria used for the antagonistic assay were *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and *Shigella flexneri* (ATCC 12022). All bacteria were stored at -80°C in BHI broth (Acumedia) supplemented with 20% glycerol until use.

## 2.3. In vitro antagonistic assay

The antagonistic activity of the *Lactobacillus* isolates was evaluated by the double layer agar diffusion assay (spot on the lawn) as described by Teixeira et al. (2012). Aliquots of 5 µl from *Lactobacillus* cultures containing 10<sup>9</sup> CFU/ml were spotted onto plates containing de Man, Rogosa and Sharp (MRS, Acumedia) agar. After incubation for 24 h in an anaerobic chamber (Forma Scientific Company, Marietta, USA) containing an atmosphere of 85% N<sub>2</sub>, 15% H<sub>2</sub> and 10% CO<sub>2</sub>, lactobacilli were killed by exposure to chloroform for 30 min and the residual chloroform was allowed to evaporate for an equal period of time. The presence of antagonistic substances was revealed by overlaying the plate with 4 ml of BHI (Acumedia) soft agar medium (0.75%) supplemented with 10 µl of cultures of indicator bacteria (10<sup>9</sup> CFU/ml). After incubation for 24 h at 37°C, under aerobic conditions, the presence of inhibition halo around the *Lactobacillus* spot was observed and the diameter of the inhibitory zone determined with a digital caliper (Mitutoyo Digimatic Caliper, São Paulo, Brazil). Assays were performed in triplicate with at least one repetition.

#### 2.4. Experimental design

In a first set of experiments, determinations of survival and weight evolution were evaluated in the following three groups (with 10 animals each): (ST) treated with saline and challenged with *S. Typhimurium*; (LF+ST) treated with *L. fermentum* TcUESC01 and challenged with *S. Typhimurium*; and (LP+ST) treated with *L. plantarum* TcUESC02 and challenged with *S. Typhimurium*. Cumulative mortality and body weight evolution were evaluated during 28 days.

In a second set of experiments, each group was constituted of five animals, and a fourth group was added: (CTL) treated with saline and not challenged. Five days after the challenge, animals were killed by cervical dislocation under anesthesia, liver and spleen samples were aseptically collected for bacterial translocation measurement and ileum and liver samples were used for histological and morphometric analysis.

Finally, in the third set of experiments, mice were divided into the same four groups described above (five animals per group), and ileum contents and tissue samples from these animals were collected for determination of IgA concentration and mRNA cytokine expression, respectively, five days after challenge. For these experiments, two more groups were added: (LP) mice only treated with *L. plantarum* TcUESC02, and (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01.

#### 2.5. Treatment and challenge

Treatment with the *Lactobacillus* strains was conducted for ten days prior to *S. Typhimurium* infection. Experimental animals received 0.1 ml containing  $8.0 \log_{10}$  CFU/ml by oral gavage of a MRS culture (18 h at 37°C). The treatment continued until the end of each experiment. *S. Typhimurium* experimental infection was conducted also by oral gavage with 0.1 ml of  $6.0 \log_{10}$  CFU/ml of a BHI culture (24 h at 37°C). Control group was treated with 0.9% sterile saline instead of *Lactobacillus*.

## 2.6. Analysis

### 2.6.1. Mortality

Cumulative mortality and body weight variation in mice were determined up to 28 days after infection by *S. Typhimurium*. At the end of the experiment, all remaining mice were sacrificed by cervical dislocation under anesthesia.

### 2.6.2. Salmonella translocation

Liver and spleen samples from each mouse were weighted and then homogenized in sterile phosphate buffer saline (PBS, 1:10, w/v). Serial decimal dilutions were prepared for each organ and then plated onto MacConkey agar (Acumedia) for *Salmonella* specific count after incubation during 24 h at 37°C. Only colorless colonies (lactose negative) were considered. Translocation was expressed as log<sub>10</sub> CFU/g of organ.

### 2.6.3. Immunoglobulin type A

The determination of sIgA in the intestinal content was performed by capture ELISA method. Briefly, small intestine of animals was removed and its content was scraped off and collected in 15 ml tubes previously weighed. After collection, the tube was weighed again and a volume of PBS supplemented with protease inhibitors (1 µM aprotinin; 25 µM leupeptin, 1 µM pepstatin and 1 mM of PMSF) was added in a proportion of 2.0 ml to each 500 mg of collected intestinal contents. The mixture was subjected to a cycle of agitation by vortexing, and then centrifuged at 2,000 x g for 30 min at 4°C. After centrifugation, the supernatant was collected (1.0 ml) and kept at -80°C until analysis. For ELISA procedure, the plate was covered with 100 µl of mouse anti-IgA (Sigma, St Louis, USA) and incubated overnight at 4°C. Then, 200 µl of blocking solution (1% albumin in PBS Tween) were added and incubated for 1 h at room temperature. The plate was then emptied and washed five times with PBS Tween. Then, 100 µl of the diluted sample (1: 1000) were added and the plate incubated for 1 h at room temperature. After incubation, the plate was washed five times with PBS Tween, and 100 µl of conjugate (Sigma) diluted in PBS Tween (10 µg of conjugate in 10 ml of PBS Tween) were added and the plate incubated for an additional 1 h period at room temperature. The plate was emptied and 100 µl of peroxidase substrate added, followed by 40 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

and incubated for 10 min at room temperature. The reaction was stopped with dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:20 in distilled water). Reading was performed at 492 nm.

#### 2.6.4. Histopathology and morphometry

The distal portion of small intestine from each mouse was collected, cleaned and rolled into a spiral with the mucosa facing inward in order to form a Swiss roll with it. It was then fixed in buffered 4% formaldehyde, and processed for routine paraffin embedding. Liver from each animal was also collected, except for the small sample separated to evaluate bacterial translocation. From each sample, at least two histological sections (4–5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (HE), coded, and analysed by optical microscopy (Olympus BX40) by a single pathologist who was unaware of the experimental conditions of each group.

For morphometric examination, images were obtained with a Spot Insight Color (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, USA) by the image acquisition software SPOT software (version 3.4.5; SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA). To determine villus heights, at least 20 villi from three different fields from each animal were measured using the ImageJ 1.48v software (NIH, Bethesda, USA). To assess hepatic tissue integrity, number of inflammatory foci was evaluated in the liver samples. Inflammatory focus was defined as the accumulation of inflammatory cells in number higher than 10 cells, accompanied by necrotic alterations of the associated parenchyma. Presence of foci was assessed in at least ten fields per animal.

#### 2.6.5. Relative expression of cytokines in ileum

Small fragments (1 cm approximately) of ileum were collected and stored in RNAlater (Ambion, Austin, USA) at -80°C until RNA extraction, which was conducted according to TRIzol® Reagent's (Ambion) RNA isolation procedure. Samples were then treated with Turbo DNA-free Kit® (Ambion), according to manufacturer's instruction, for DNA removal. cDNA of each sample was produced with High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), according to its manual instructions. Quantitative PCR (qPCR) was performed using iTaq universal SYBR green supermix (Bio-rad, Hercules, CA, USA) and gene specific-primers for IFN-γ, IL-

6, IL-10, IL-17, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , as well as housekeeping genes for  $\beta$ -actin and GAPDH, according to Giulietti et al. (2001). Amplification reactions were performed in a final volume of 20  $\mu$ l, using 10  $\mu$ l of SYBR green master mix and 50 ng of cDNA. Expression levels in control group (with no treatment) were used as calibration data. Results are shown graphically as fold changes in gene expression, using the means and standard deviations of target cytokine expression amount ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) according to Hellemans et al. (2007).

#### 2.6.6. Statistical analysis

Differences between results (translocation, morphometry, and cytokines expression) were evaluated by analysis of variance (one-way ANOVA) with Tukey's post-test. For weight evolution, two-way ANOVA with Sidak's post-test was used. Log-rank (Mantel-cox) test was applied for survival test and comparison between groups. Fisher's exact test was employed for inflammatory focus analysis. All tests were performed using GraphPad Prism v. 6.0.1 for Windows from GraphPad Software (San Diego, CA, USA). Only results with  $P < 0.05$  or lower were considered significant.

### 3. Results

Table 1 shows that both lactobacilli were able to produce diffusible inhibitory compounds against all the enteropathogenic or deteriorative bacteria tested in the *in vitro* assay. The inhibitory zone was especially large against *S. Typhimurium* ATCC 14028.

There was no difference in body weight evolution between the three groups (data not shown). On the other hand, a discrete protective effect with the lactobacillus treatment was observed (Fig. 1) in relation to the survival frequency at the end of the experiments, which was more visible when *L. fermentum* TcUESC01 was used, even if this effect was not statistically significant ( $P > 0.05$ ).

Figure 2 shows a significant lower translocation of *S. Typhimurium* to the spleen and liver when mice were orally treated with *L. fermentum* TcUESC01 before the challenge.

During the infection with *S. Typhimurium*, there was a decrease of IgA levels in the ileum of the mice, and the previous treatment with *L. plantarum* TcUESC02 reduced significantly this decrease (Fig. 3).

The morphometric analysis showed a reduction of villus height with the bacterial challenge and, curiously, an even higher decrease when only the lactobacilli were administered (Fig. 4A). Treatment with the lactobacilli followed by challenge led to a reduction similar to that observed with the challenge alone. On the other hand, Figure 4B shows that the high frequency of inflammatory foci in the liver in mice only challenged with *S. Typhimurium* was reduced when animals were pre-treated with each of the *Lactobacillus*.

Figure 5 shows the influence of lactobacillus treatment and/or infection on the ileum expression of some regulatory and anti-inflammatory cytokines. An increase in IL-17 and IL-10 was observed during the infection after oral treatment with *L. plantarum* TcUESC02, and in TGF- $\beta$  by treatment with *L. fermentum* TcUESC01.

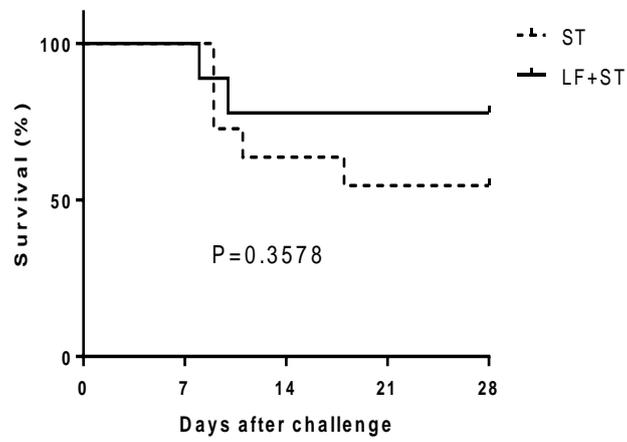
The influence of lactobacillus treatment and/or infection on the ileum expression of three pro-inflammatory cytokines is shown in Figure 6. As expected, an increase in TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 was observed after the enteropathogenic challenge. Both lactobacilli were able to reduce this inflammatory response.

**Table 1.** *In vitro* antagonism (diameter of inhibitory zone in mm  $\pm$  standard deviation) of *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 and *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against indicator pathogenic bacteria.

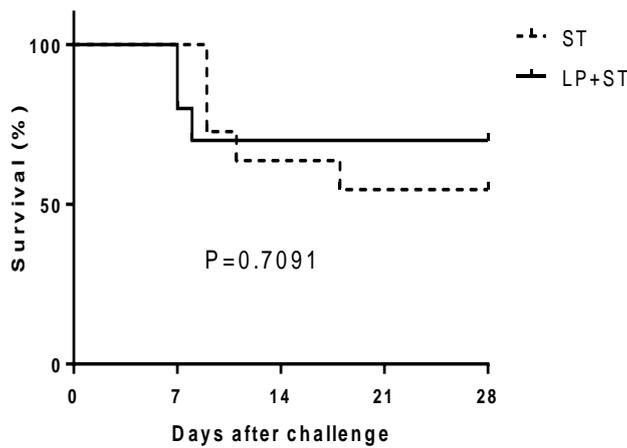
Indicator bacteria	<i>Lactobacillus</i> sample	
	<i>L. fermentum</i> TcUESC01	<i>L. plantarum</i> TcUESC02
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	90.00 $\pm$ 2.00	85.83 $\pm$ 1.53
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	31.29 $\pm$ 0.57	30.95 $\pm$ 5.99
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	39.30 $\pm$ 1.67	43.38 $\pm$ 0.44
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	43.58 $\pm$ 2.04	44.94 $\pm$ 1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	61.61 $\pm$ 2.28	56.03 $\pm$ 1.20
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	58.58 $\pm$ 2.67	59.36 $\pm$ 3.35

Average of three replicates with one repetition.

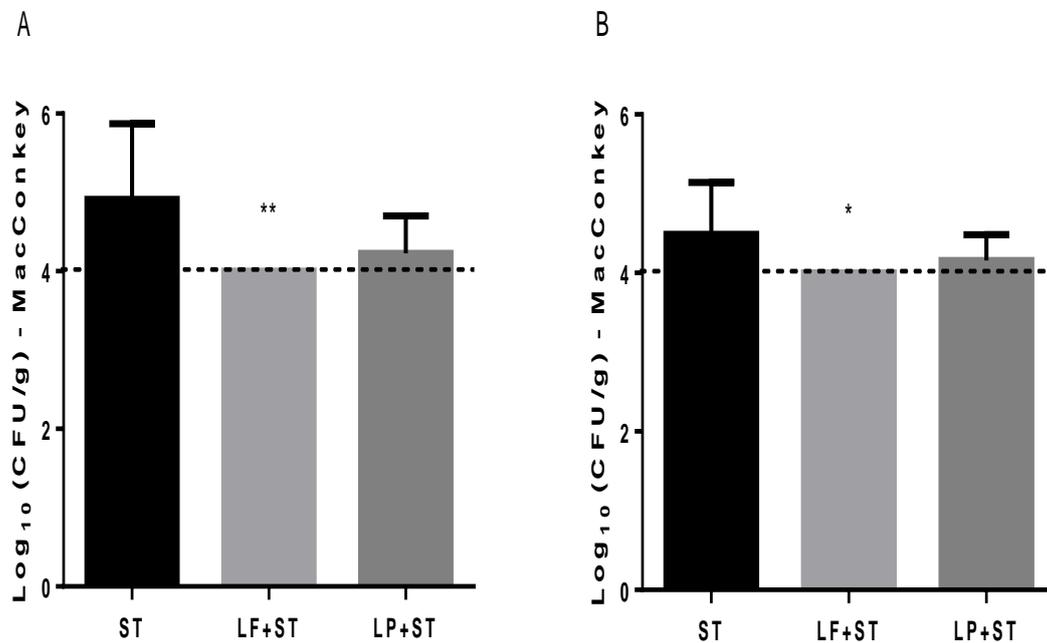
**A**



**B**

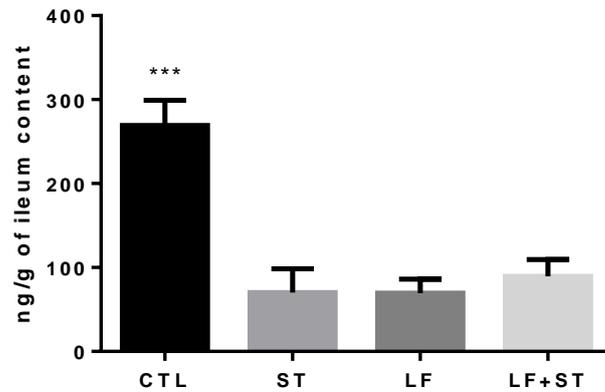


**Figure 1.** Survival of mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST) (A), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) (B) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. \*P < 0.05 (Log-rank, Mantel-cox test) (n=10).

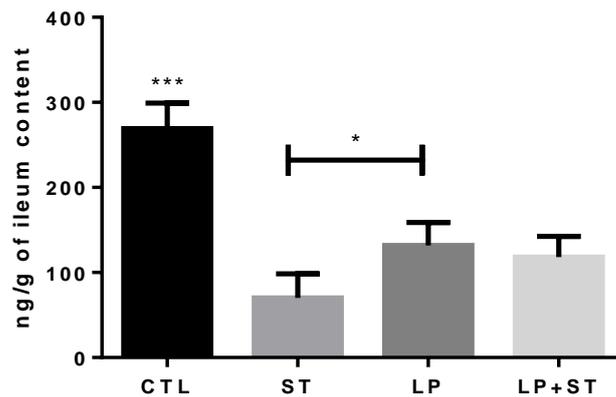


**Figure 2.** Translocation of *Salmonella Typhimurium* (log<sub>10</sub> CFU/g of organ) to spleen (A) and liver (B) in mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella Typhimurium*. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test) (n = 5).

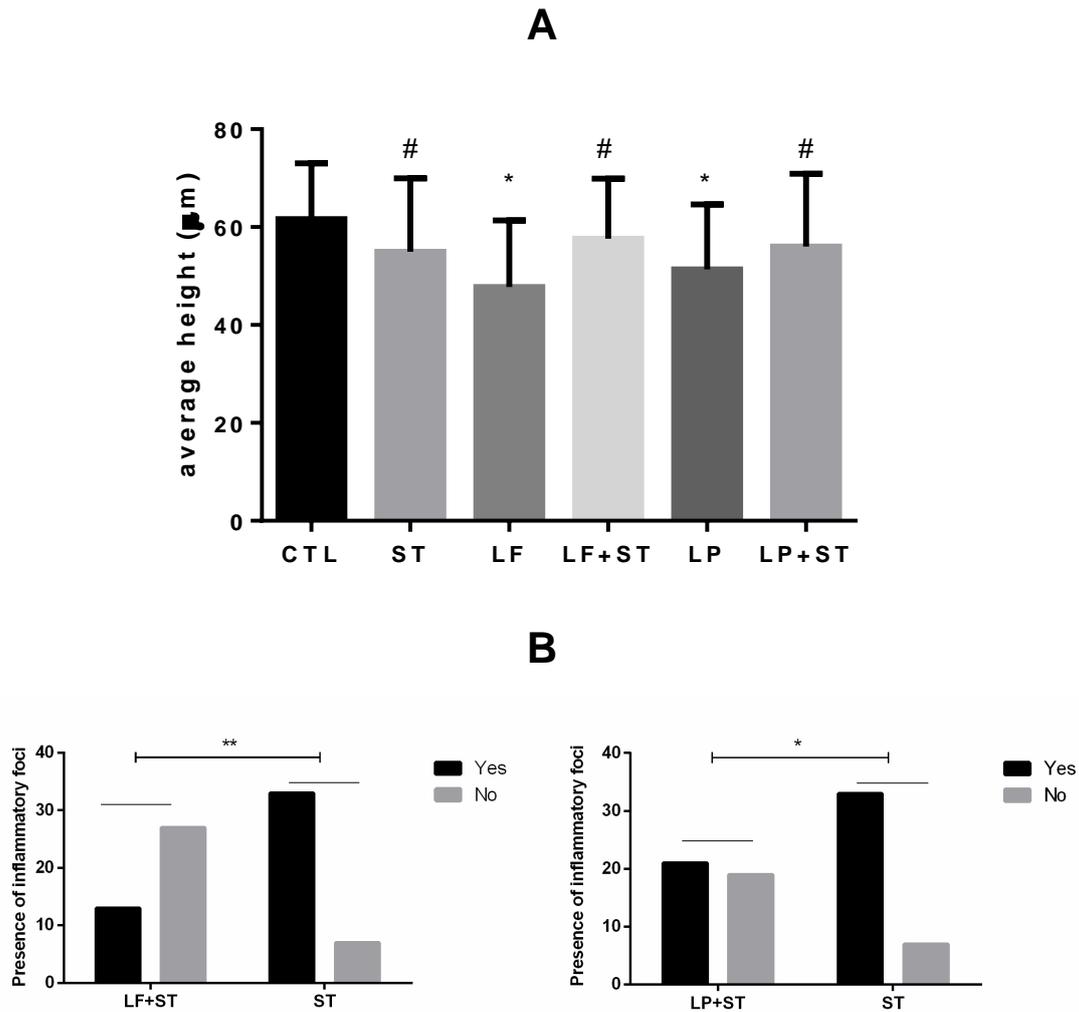
**A**



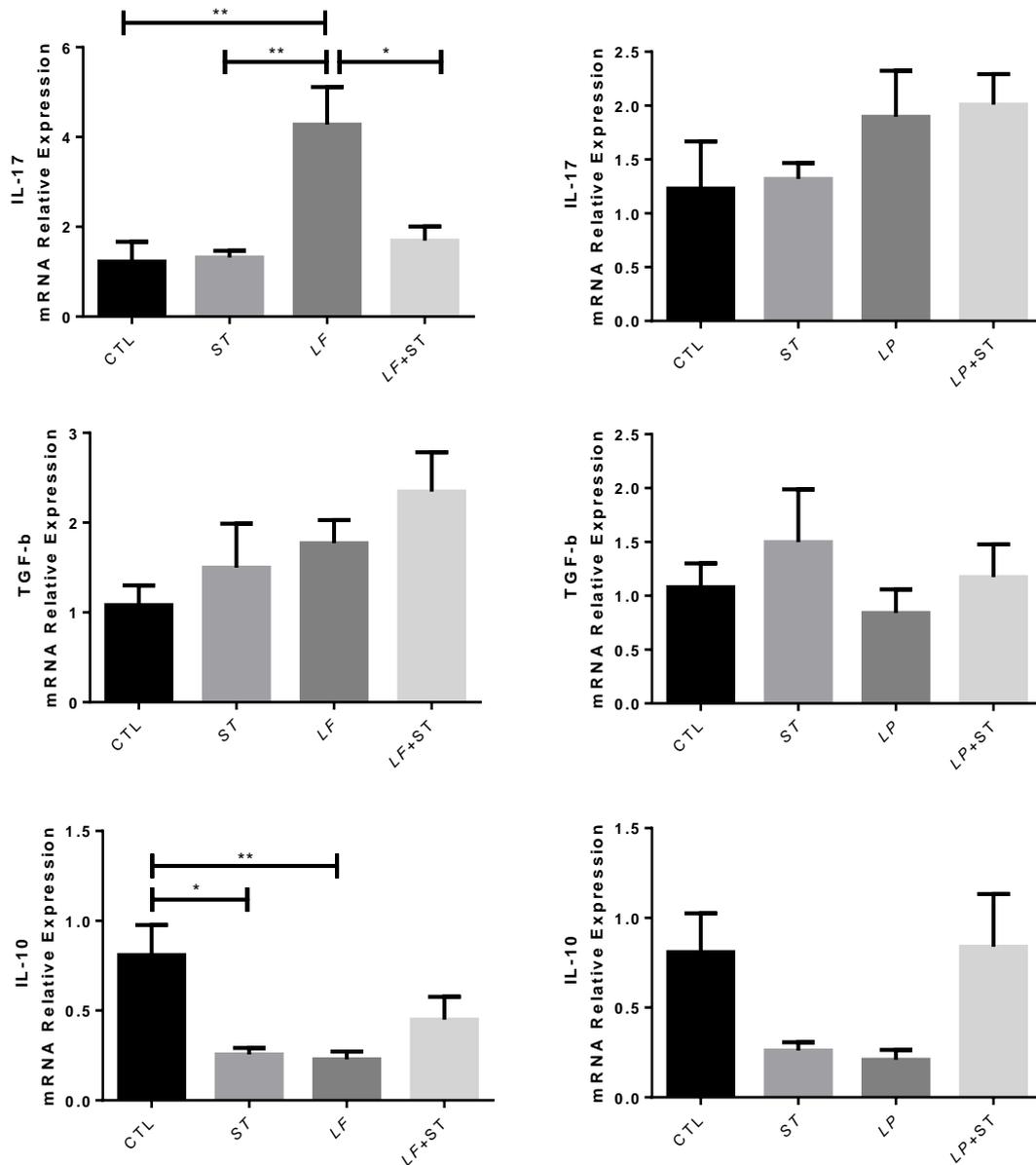
**B**



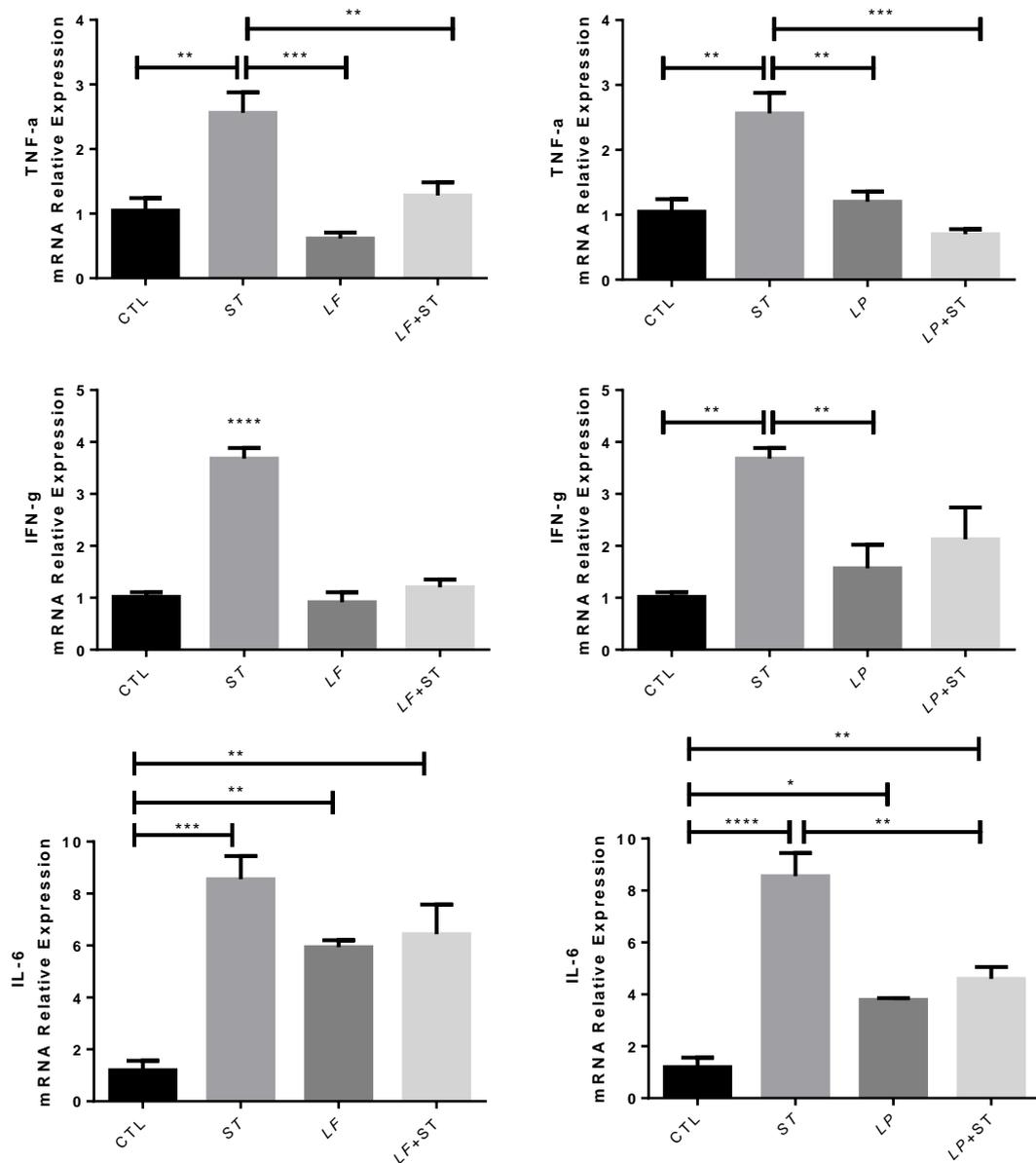
**Figure 3.** Total IgA (ng/g of ileum content) in the ileum fluid of mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (A - LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (B – LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only treated with *Lactobacillus plantarum* TcUESC02. Only colorless colonies on MacConkey agar were considered. \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001 (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test) (n = 5).



**Figure 4.** Ileum villus heights (A) and number of hepatic inflammatory foci (B) in mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only treated with *Lactobacillus plantarum* TcUESC02. (A) \*P<0.05 when compared to control group (CTL); # P<0.05 when compared to all challenged groups (ST, LF+ST and LP+ST); #P<0.01 when compared to control group (CTL). (B) \*P < 0.01, \*\*P < 0.001 (Fisher's exact test). (n = 4).



**Figure 5.** mRNA relative expression of cytokines (IL-17, TGF- $\beta$ , IL-10) in ileum of mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only treated with *L. plantarum* TcUESC02. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test) (n = 5).



**Figure 6.** mRNA relative expression of cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) in ileum of mice treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 (LF+ST), *Lactobacillus plantarum* TcUESC02 (LP+ST) or sterile saline (ST) during ten days and then infected with *Salmonella* Typhimurium. (CTL) not treated and not infected, (LF) mice only treated with *Lactobacillus fermentum* TcUESC01, and (LP) mice only treated with *Lactobacillus plantarum* TcUESC02. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001 (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test) (n = 5).

#### 4. Discussion

In the majority of cases, infectious diarrhea is treated through rehydration and eventual use of antibiotics. However, the World Health Organization (WHO) has recommended the search for alternative treatments for infection, and probiotics have been proposed for this purpose. The probiotics most commonly used in humans belong to genera of the lactic acid bacteria (LAB) group and *Bifidobacterium* genus, and come from its own body tracts to be thus better adapted when reintroduced. However, the use of selected probiotics from alternative sources known as “unconventional sources” is likely to increase. Various unconventional sources of microorganisms have been used for isolation and screening of potential probiotics, such as traditional fermented foods, traditional fermented drinks, vegetables, and fruit juices (Somplang and Piyadeatsoontorn 2016).

The production of antimicrobial compounds by candidate to probiotic use is probably one of the most important mechanisms responsible for a protective effect against pathogenic agents. Probiotics can secrete substances such as organic acids and bacteriocins that may have bactericidal or bacteriostatic effects against pathogenic bacteria. Lactic acid is the primary product of LAB metabolism and acts on protein denaturation, altering the permeability of the outer membrane of bacteria. Bacteriocins are inhibitory proteic substances frequently produced by LAB (such as nisin, diplococcin, lactocidin, bulgaricin, reuterin) which act against pathogens like pathogenic *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella* spp. (Todorov and Dicks 2005). Although the presence of these antimicrobial metabolites has been demonstrated generally *in vitro*, it is unclear whether they are produced in a similar way or have any activity *in vivo*. In the present study, both lactobacillus were able to produce diffusible inhibitory substances against all the indicator bacteria tested, but the chemical identity of these compounds was not determined.

During an infection by enteropathogens, the first cells encountered by these agents are intestinal epithelial cells, dendritic cells (DCs) and macrophages (Coburn et al. 2007). The interaction with these cells induces the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , leading to a massive influx of neutrophils, macrophages and immature DC, which are

important for the control of bacterial growth in sub-lethal infections by pathogens (Mastroeni and Grant, 2011). The TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokines are important in the inflammatory process, having a central role as mediators in the activation and recruitment of neutrophils to the affected region (Dougan et al., 2011). However, in case of exaggerated response and production of these cytokines, an epithelial barrier dysfunction can occur, thereby contributing to an invasion by pathogenic bacteria (Castillo et al., 2013). To avoid such problem, regulatory and anti-inflammatory cytokines, such as IL-17, IL-10 and TGF- $\beta$ , have to be produced to down-regulate the expression of pro-inflammatory cytokine genes. The reduction of pro-inflammatory cytokines expression observed in the present study when mice were pre-treated with lactobacillus before the challenge with *S. Typhimurium* can be explained at least by three mechanisms acting simultaneously or separately. The enteropathogenic bacterium could be killed by inhibitory compounds produced by the lactobacilli and/or its adhesion to the intestinal epithelium prevented by co-aggregation, for example, to the lactobacilli. Another explanation could be the production by the lactobacilli of a compound that might interfere on the pro-inflammatory cellular signaling pathways stimulated by the enteropathogen adhesion. As an example, an active protein fraction of 8.7 kDa of *L. plantarum* 10hk2 was able to induce IL-10 production, suppress the induction of NF- $\kappa$ B and inhibit phosphorylation of I- $\kappa$ B and p38 MAPK in a RAW 264.7 murine macrophage cell line stimulated with LPS (Chon et al., 2010).

Finally, an important aspect in the development of a probiotic product is the safety of its use. No clinical signals were observed in the animals only treated with *L. fermentum* TcUESC01 or *L. plantarum* TcUESC02. However, analysis of histological aspect of the ileum of these mice showed a reduction in villus height. On the other hand, results from antimicrobial susceptibility assays (data not shown) showed a pattern common to lactobacilli from alimentary origin (Santos et al. 2016).

## 5. Conclusion

*L. fermentum* TcUESC01 and *L. plantarum* TcUESC02 showed to be potential probiotics based on better results obtained by *in vitro* evaluations

(production of diffusible inhibitory compounds) as well as *in vivo* experiments (higher survival after enteropathogen challenge, lower hepatic and splenic translocation of enteropathogen, higher IgA ileal production, lower histopathological lesions in liver and anti-inflammatory pattern of immunological response).

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## **References**

- Alvim, L. B., Sandes, S. H. C., Silva, B. C., Steinberg, R. S., Campos, M. H. A., Acurcio, L. B., Arantes RME, Nicoli JR, Neumann E, Nunes, A. C. (2016). Weissella paramesenteroides WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. *Beneficial microbes*, 7(1), 61-73.
- Bambirra, F. H. S., Lima, K. G. C., Franco, B. D. G. M., Cara, D. C., Nardi, R. M. D., Barbosa, F. H. F., & Nicoli, J. R. (2007). Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice. *Letters in applied microbiology*, 45(6), 663-667.
- Bortolini, C., Patrone, V., Puglisi, E., & Morelli, L. (2016). Detailed analyses of the bacterial populations in processed cocoa beans of different geographic origin, subject to varied fermentation conditions. *International journal of food microbiology*, 236, 98-106.

- Castillo, N. A., Moreno de LeBlanc, A., M Galdeano, C., & Perdigón, G. (2013). Comparative study of the protective capacity against Salmonella infection between probiotic and nonprobiotic Lactobacilli. *Journal of applied microbiology*, 114(3), 861-876.
- Chon, H., Choi, B., Jeong, G., Lee, E., & Lee, S. (2010). Suppression of proinflammatory cytokine production by specific metabolites of *Lactobacillus plantarum* 10hk2 via inhibiting NF- $\kappa$ B and p38 MAPK expressions. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 33(6), e41-e49.
- Dougan, G., John, V., Palmer, S., & Mastroeni, P. (2011). Immunity to salmonellosis. *Immunological reviews*, 240(1), 196-210.
- Eckmann, L., Smith, J. R., Housley, M. P., Dwinell, M. B., & Kagnoff, M. F. (2000). Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14084-14094.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4), 386-401.
- Guiney, D. G. (2005). The role of host cell death in *Salmonella* infections. In *Role of Apoptosis in Infection* (pp. 131-150). Springer Berlin Heidelberg.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), R19.

- Huang, F. C. (2009). Upregulation of Salmonella-induced IL-6 production in Caco-2 cells by PJ-34, PARP-1 inhibitor: involvement of PI3K, p38 MAPK, ERK, JNK, and NF- $\kappa$ B. *Mediators of inflammation*, 2009.
- Martins, F. S., Nardi, R. M., Arantes, R. M., Rosa, C. A., Neves, M. J., & Nicoli, J. R. (2005). Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *The Journal of general and applied microbiology*, 51(2), 83-92.
- Mastroeni, P., & Grant, A. J. (2011). Spread of Salmonella enterica in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert reviews in molecular medicine*, 13.
- Melo, T. A., dos Santos, T. F., Pereira, L. R., Passos, H. M., Rezende, R. P., & Romano, C. C. (2017). Functional profile evaluation of Lactobacillus fermentum TCUESC01: a new potential probiotic strain isolated during cocoa fermentation. *BioMed research international*, 2017.
- Ornellas, R. M. S., Santos T. T., Acurcio, L. B., Sandes, S. H. C., Oliveira, M. M., Dias, C. V., Silva, S. C., Uetanabaro, A. P. T., Vinderola, C. G., Nicoli, J. R. (2017) Selection of lactic acid bacteria with probiotic potential isolated from the fermentation process of “cupuaçu” (*Theobroma grandiflorum*). *Adv Microbiol Infect Dis Public Health* 7:1-16.
- Saito, V. S. T., Dos Santos, T. F., Vinderola, C. G., Romano, C., Nicoli, J. R., Araújo, L. S, Costa, M. M., Andrioli, J. L., Uetanabaro, A. P. T. (2014) Viability and resistance of *Lactobacilli* isolated from cocoa fermentation to simulated gastro-intestinal digestive steps in soy yogurt. *Journal of food science*, 79:208–213.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsohis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., & Bäumlner, A. J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and Infection*, 3(14), 1335-1344.

- Santos, T. T., Ornellas, R. M. S., Acurcio, L. B., Oliveira, M. M., Nicoli, J. R., Dias, C. V., Uetanabaro, A. P. T., Vinderola, G. (2016). Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 259-266.
- Sornplang, P., & Piyadeatsoontorn, S. (2016). Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of animal science and technology*, 58(1), 26.
- Teixeira, G. S., Carvalho, F. P., Arantes, R. M. E., Nunes, A. C., Moreira, J. L. S., Mendonca, M., Almeida, R. B., Farias, L. M., Carvalho, M. A. R., Nicoli, J. R. (2012). Characteristics of *Lactobacillus* and *Gardnerella vaginalis* from women with or without bacterial vaginosis and their relationships in gnotobiotic mice. *Journal of medical microbiology*, 61(8), 1074-1081.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2), 318-326.
- Whichard, J. M., Gay, K., Stevenson, J. E., Joyce, K. J., Cooper, K. L., Omondi, M., Medalla, F., Jacoby, G. A., Barrett, T. J. (2007). Human *Salmonella* and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended-spectrum cephalosporins. *Emerging infectious diseases*, 13(11), 1681.
- Joint, F. A. O. (2002). WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food (pp 1-11). FAO/WHO (Food and Agricultural Organization Working/World Health Organization) *London, Ontario, Canada*, 30.

Zanirati, D. F., Abatemarco, M., de Cicco Sandes, S. H., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70-76.

---

# Capítulo 5

## Conclusões

---

## 6. CONCLUSÕES

O tratamento obtido a partir da coagulação mista do leite desnatado bubalino com a adição 50% de edulcorantes e 50% de sacarose se destacou como promissor para o desenvolvimento de novos produtos lácteos para fins especiais, por apresentar satisfatória qualidade microbiológica, composição química e nutricional, bom desempenho na avaliação sensorial e por ser classificado “*light*”, podendo também ser utilizado como base para desenvolvimento de um queijo tipo *petit-suisse* com potencial probiótico.

Já a avaliação dos efeitos da incubação e uso de edulcorantes sobre a qualidade do queijo tipo *petit-suisse* produzido por coagulação enzimática, a partir leite bubalino desnatado e lactobacilos isolados da fermentação do cacau, demonstrou que, devido a qualidade na avaliação microbiológica, viabilidade de lactobacilos probióticos e acompanhamento do sabor durante a estocagem por 42 dias, as amostras do tratamento L.F+L.P 100% S S.F (*petit-suisse* não fermentado, com 100% de sacarose, adicionado de 2% de *L. fermentum* TcUESC01 mais 2% de *L. plantarum* TcUESC02) se apresentaram como a melhor alternativa para o desenvolvimento de um novo produto probiótico.

Também, a avaliação durante o período de estocagem (63 dias) dos queijos tipo *petit-suisse* produzidos a partir de diferentes combinações na adição dos lactobacilos isolados da fermentação do cacau, evidenciou que os tratamentos com a adição de 4% do *L. fermentum* TcUESC01 e o com a adição de 4% do *L. plantarum* TcUESC02 se destacaram como a melhor alternativa para a produção de derivado lácteo funcional, devido à sobrevivência em números adequados de micro-organismos probióticos e boa qualidade microbiológica durante a estocagem sob refrigeração. Além disto, o produto apresentou bom desempenho na avaliação sensorial, composição química e nutricional, podendo ser denominado como Queijo tipo *petit-suisse* probiótico de búfala Isento de gorduras totais.

Tanto o *L. fermentum* TcUESC01 como o *L. plantarum* TcUESC02 mostraram ser probióticos potenciais com base em melhores resultados obtidos por avaliações *in vitro* (alta produção de compostos inibitórios difusíveis), bem

como experimentos *in vivo* (maior sobrevivência após o desafio do enteropatógeno, translocação hepática e splênica do enteropatógeno , maior produção ileal de IgA, lesões histopatológicas mais baixas no fígado e padrão anti-inflamatório de resposta imunológica).

Submission Confirmation

**De :** International Dairy Journal  
<eesserver@eesmail.elsevier.com>

Seg, 13 de Nov de 2017 22:38

**Remetente :** eesserver@eesmail.elsevier.com

**Assunto :** Submission Confirmation

**Para :** josueso2@yahoo.com.br, josue oliveira  
<josue.oliveira@urucuca.ifbaiano.edu.br>

**Responder para :** International Dairy Journal <Thom.Huppertz@nizo.com>

Title: "Development of cheese with probiotic potential from buffalo milk with addition of lactobacilli obtained from fermentation of Brazilian cocoa"  
Article Type: Research Article

Dear Mr. Oliveira

We have received your article

Title: "Development of cheese with probiotic potential from buffalo milk with addition of lactobacilli obtained from fermentation of Brazilian cocoa"  
Article Type: Research Article

for consideration for publication in the  
International Dairy Journal.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.  
To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/inda/>
2. Enter these login details:  
Your username is: josueso2@yahoo.com.br  
If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/inda/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/inda/automail_query.asp)

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

International Dairy Journal

\*\*\*\*\*

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal.

To view a sample editorial process, please click here:

[http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample\\_editorial\\_process.pdf](http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf)

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Submission Confirmation

---

**De :** Journal of Functional Foods <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Qua, 10 de Jan de 2018 07:50

**Remetente :** eesserver@eesmail.elsevier.com**Assunto :** Submission Confirmation**Para :** josueso2@yahoo.com.br, josue oliveira  
<josue.oliveira@urucuca.ifbaiano.edu.br>**Responder para :** Journal of Functional Foods <jff@elsevier.com>

Full Length Article

Dear Oliveira, J.S,

We have received your article "In vitro and in vivo evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation (Theobroma cacao L.)" for consideration for publication in Journal of Functional Foods.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/jff/>

2. Enter these login details:

Your username is: josueso2@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/jff/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jff/automail_query.asp)

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Journal of Functional Foods

\*\*\*\*\*

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal.

To view a sample editorial process, please click here:

[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a\\_id/160](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/160)

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

---