

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências e Tecnologia – FACET
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental

Manoel Armando Delgado Junior

**CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus clausii* PARA USO COMO
PROBIÓTICO**

Dourados-MS

2022

Manoel Armando Delgado Junior

CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus clausii* PARA USO COMO PROBIÓTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia Ambiental, área de concentração em Ciência Ambiental.

Orientadora Prof.^a Dr. Kelly Cristina da Silva Brabes

Co-orientadora Prof.^a Dr. Danielle Marques Vilela

Dourados - MS

2022

Dedico este trabalho aos meus pais, pois essa dissertação é a prova de que todo seu investimento e dedicação valeram a pena.

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre presente em minha vida e tornar tudo possível.

Aos meus pais, por serem meu exemplo de vida, pelo carinho e compreensão. Obrigado por tudo que tens feito por mim!

Aos demais familiares, que me ajudaram de alguma forma nessa caminhada.

A minha orientadora, Professora Doutora Kelly Cristina da Silva Brabes, por toda atenção, paciência, confiança, apoio, incentivo, ensinamentos e amizade nessa longa caminhada.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e que tudo que conseguiu foi através de esforços e os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas”.

Charlie Chaplin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de *Bacillus clausii* em log de UFC/mL⁻¹ (p <0,05) após a exposição dos esporos ao pH 2 e 3, nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas.....51

Tabela 2 – Contagem de *Bacillus clausii* em log de UFC/mL⁻¹ (p <0,05) após a exposição dos esporos 0,3% de sais biliares, nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas.....51

Tabela 3 – Contagem de *Bacillus clausii* em log de UFC/mL⁻¹ (p <0,05) após a exposição a pepsina nos tempos de 0, 1, 2, e 3 horas, e a pancreatina nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas.....51

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Atividade da hidrólise de sais biliares (BSH) na concentração de 0,3%. A) apresentada pela placa controle, sem a adição de sais biliares e a ausência de halos precipitados ao redor das colônias. B) placa suplementada com 0,3% de sais biliares e com presença de halos precipitados ao redor das colônias.....49

Figura 2 - Teste da atividade hemolítica de *Bacillus clausii*. A) apresentada pela placa com crescimento de cultura de *Bacillus clausii* e com ausência de atividade hemolítica. B) Representada pela placa controle, com crescimento de cultura de *Bacillus cereus* ATCC 11778 e com presença de hemólise.....49

Figura 3 - Teste de β -galactosidase utilizando o ONPG como substrato. A) apresentado como teste positivo para hidrólise de ONPG e produção de ONP (o-nitrofenol) de cor amarela. B) apresentada como teste controle, sem alteração de cor.....49

Resumo

Um alimento pode ser considerado funcional se possuir efeitos construtivos nas funções alvo do organismo humano. Entre os diversos alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde encontram-se os probióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro. O uso de bactérias probióticas como *Bacillus spp.*, tem aumentado devido a capacidade de formar esporos resultando em maior resistência durante os processos de produção, armazenamento e comercialização, esta característica dá-lhes uma vantagem dupla em termos de sobrevivência (tolerância ao calor e maior vida útil) em diversos ambientes em comparação com outros probióticos, como *Lactobacillus spp.* O *Bacillus clausii* está no mercado há mais de 55 anos e é caracterizado pela presença de quatro cepas probióticas (O/C, SIN, N/R e T). Neste estudo o *Bacillus clausii*, proveniente do produto comercial Enterogermina® da Sanofi, foi obtido em Farmácias e Drogarias do município de Dourados-MS. Para caracterizar *Bacillus clausii* para uso como probiótico foram realizadas as seguintes análises e testes: análise de pH ácido 2 e 3, teste de tolerância e hidrólise de sais biliares a 0,3%, teste de tolerância a pepsina e pancreatina, teste de adesão, produção de exopolissacarídeo (EPS), atividade de hemólise, atividade de antioxidante e atividade de β -galactosidase. Nas análises de tolerância ao pH ácido, aos sais biliares, a pepsina e pancreatina, não apresentaram diferenças significativas se comparados com o log de UFC/mL⁻¹ de células iniciais. Apresentou atividade de hidrólise sais biliares e de γ -hemolítica em ágar com sangue. Foi capaz de eliminar 27% de DPPH, 67% de se aderir a chapa de aço inox e produção de 67mg/L de EPS, além de hidrolisar o-nitrofenil- β -D-galactopiranosose (ONPG). Dessa forma indicando grande potencial probiótico.

Palavras-chaves: Microbiota Intestinal, Caracterização Bioquímica, Atividade Antioxidante, Atividade de β -galactosidase.

Abstract

A food can be considered functional if it has constructive effects on the target functions of the human organism. Among the various foods with claims of functional and/or health properties are probiotics. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. The use of probiotic bacteria such as *Bacillus* spp., has increased due to the ability to form spores resulting in greater resistance during the production, storage and marketing processes, this characteristic gives them a double advantage in terms of survival (heat tolerance and greater shelf life) in different environments compared to other probiotics such as *Lactobacillus* spp. *Bacillus clausii* has been on the market for over 55 years and is characterized by the presence of four probiotic strains (O/C, SIN, N/R and T). In this study, *Bacillus clausii*, from Sanofi's commercial product Enterogermina®, was obtained from Pharmacies and Drugstores in the city of Dourados-MS. To characterize *Bacillus clausii* for use as a probiotic, the following analyzes and tests were performed: acid pH analysis 2 and 3, tolerance test and 0.3% bile salt hydrolysis, pepsin and pancreatin tolerance test, adhesion test, exopolysaccharide (EPS) production, hemolysis activity, antioxidant activity and β -galactosidase activity. In the analysis of tolerance to acid pH, bile salts, pepsin and pancreatin, there were no significant differences when compared to the log of CFU/mL⁻¹ of initial cells. It showed bile salt hydrolysis and γ -hemolytic activity on blood agar. It was able to eliminate 27% of DPPH, 67% of adhesion to stainless steel sheet and production of 67mg/L of EPS, in addition to hydrolyzing o-nitrophenyl- β -D-galactopyranose (ONPG). Thus indicating great probiotic potential.

Keywords: Intestinal Microbiota, Biochemical Characterization, Antioxidant Activity, β -galactosidase Activity.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	12
Capítulo 1: Referencial Teórico.....	14
1. Alimentos Funcionais.....	14
1.1 Probióticos.....	16
1.1.1 Definição e Histórico.....	16
1.1.2 Benefícios e mecanismos de ação.....	18
1.2 <i>Bacillus</i> ssp. como probiótico.....	21
1.2.1 Esporos de <i>Bacillus clausii</i> como probiótico.....	22
1.2.2 <i>Bacillus clausii</i>	23
1.3 Características e parâmetros das cepas probióticas para a fabricação e aplicação em produtos alimentícios.....	26
Referências.....	29
Capitulo 2- Artigo Cientifico.....	33
Caracterização do potencial bioquímico e funcional do probiótico <i>Bacillus clausii</i>	33
Resumo.....	34
Introdução.....	35
Materiais e Métodos.....	36
Tolerância ao pH ácido.....	36
Teste de tolerância a pepsina e pancreatina.....	36
Teste de tolerância a sais biliares.....	37
Hidrólise de sais biliares (BSH).....	37
Teste de Adesão.....	37
Produção de Exopolissacarídeos.....	37
Atividade Antioxidante.....	38
Atividade de β -galactosidase.....	38
Resultados e Discussões.....	39
Tolerância ao pH ácido.....	39
Teste de tolerância a pepsina e pancreatina.....	39
Teste de tolerância a sais biliares.....	40
Hidrólise de sais biliares (BSH).....	41
Teste de Hemólise.....	41
Atividade Antioxidante.....	42
Teste de Adesão.....	42
Produção de Exopolissacarídeos.....	43

Atividade de β-galactosidase	43
Conclusão	44
Agradecimentos	45
Referências	46
Legenda de Figuras	49
Figuras	50
Tabelas	51

INTRODUÇÃO

Os alimentos não são apenas destinados a suprir a fome e fornecer os nutrientes necessários para os humanos, mas também servem para prevenir ou reduzir o desenvolvimento de doenças relacionadas à nutrição e melhorar o bem-estar físico e mental, nesse sentido, os alimentos funcionais desempenham este papel (ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020).

Um alimento pode ser considerado funcional se possuir efeitos construtivos nas funções alvo do organismo humano, além dos efeitos nutricionais, com o objetivo de promoção da saúde e bem-estar e/ou redução de doenças crônicas e atualmente estão ganhando destaque globalmente e fazem parte da dieta diária dos consumidores (KONSTANTINIDI; KOUTELIDAKIS, 2019).

Os alimentos funcionais podem ser classificados com base no tipo de alimento ou nos componentes ativos adicionados ou naturalmente presentes nos alimentos, ou seja, fibras, flavonoides, vitaminas, minerais, ácidos graxos, carotenoides e assim por diante (ASHAOLU, 2020). Entre os diversos alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde encontram-se os probióticos, que são alimentos contendo culturas vivas de micro-organismos que vem sendo aplicado no tratamento e prevenção de doenças, uma vez que é um método eficaz e não invasivo, ou seja, não oferecem nenhum perigo ou risco à saúde (BRASIL, 2019).

Os probióticos são micro-organismos vivos que contribuem para a saúde geral do hospedeiro quando fornecidos em quantidades adequadas (FAO/ WHO, 2001), vários benefícios têm sido associados ao consumo de produtos probióticos, como tratamento de diarreia, alívio dos sintomas de intolerância à lactose, redução do colesterol no sangue, tratamento da síndrome do intestino irritável e doença inflamatória do intestino, propriedades anticancerígenas, síntese de vitaminas e aumento da imunidade (ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020).

Entre as muitas espécies probióticas descobertas, as espécies de *Bacillus* demonstraram possuir melhores propriedades probióticas atribuíveis à sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas que são ativas contra muitos micro-organismos e não são patogênicas e tóxicas, juntamente com sua capacidade de esporulação, ou seja, capacidade de estender seu período de eficácia. (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019).

Bacillus clausii está no mercado há mais de 55 anos e é caracterizado pela presença de quatro cepas probióticas (denominadas devido aos seus distintos perfis de resistência a antibióticos: O/C resistente ao cloranfenicol, N/R resistente a novobiocina e rifampicina, T resistente a tetraciclina e SIN resistente a neomicina e estreptomicina. Sua resistência a condições físicas e químicas (como calor, antibióticos e pH gástrico) é atribuída aos seus esporos. Como o *Bacillus clausii* é altamente resistente a maioria dos antibióticos, sua eficácia não é alterada pela antibioterapia concomitante. Além disso, *Bacillus clausii* é único por seu rápido crescimento em ambientes aeróbios e anaeróbios (CASTRO; GUNO; PEREZ, 2019).

Diante disso, esse trabalho tem como objetivo, caracterizar a capacidade probiótica funcional de *Bacillus clausii*, simulando as condições do trato gastrointestinal, seu aspecto de segurança, de acordo com as normas de vigilância existente, além do potencial bioquímico e funcional.

Capítulo 1: Referencial Teórico

1. Alimentos Funcionais

Nos últimos anos, houve uma crescente mudança no hábito dos consumidores ao escolher um produto alimentar, tendo em vista a forte relação entre dieta e saúde humana, na qual mudou consideravelmente as preferências alimentares nas sociedades modernas, o que leva os consumidores a escolher um produto alimentar. Em vez de outro com o objetivo de obter uma melhor qualidade de saúde, e nesse sentido, os produtos funcionais são excelentes opções alimentares, pois visam melhorar a qualidade de vida, prevenindo doenças relacionadas à nutrição (DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIS; CÁMARA, 2020).

Primeiramente o termo, alimentos funcionais, foi denominado em inglês FOSHU (*foods for specified health uses*, alimentos para usos específicos para a saúde), no início dos anos 80, pelo governo japonês, quando o Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão estabeleceu um sistema regulatório para alimentos que possuem possíveis benefícios à saúde (KONSTANTINIDI; KOUTELIDAKIS, 2019), com o objetivo de desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos em saúde pública e atingir a prevenção de certas doenças para uma população com elevada expectativa de vida (CAÑAS; BRAIBANTE, 2019).

As definições conferidas aos alimentos funcionais são numerosas e incluem alimentos comercializados com alegações de saúde; fontes de alimentos com propriedades fisiológicas positivas além de seus usos nutricionais de fornecimento de nutrientes essenciais; substâncias naturais que podem ser consumidas diariamente destinadas a regular ou afetar um sistema do corpo após a ingestão (ASHAOLU, 2020).

No Brasil, alimentos funcionais são definidos, por meio da Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil, como todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão brasileiro que avalia e defere a utilização de alegações de propriedades dos alimentos funcionais através da Comissão Técnico-Científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais

e Novos Alimentos (CTCAF), por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 02 de 07 de janeiro de 2002, que aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticas isoladas com alegação de propriedade funcional ou de saúde (BRASIL, 2002).

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2018) as alegações de propriedades funcionais e de saúde estão relacionadas com produtos que contenham ácidos graxos (ômega-3), carotenoides (licopeno, luteína e zeaxantina), fibras (fibras alimentares, beta glucana, dextrina resistente, frutooligossacarídeo, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, psyllium e quitosana), fitoesteróis, polióis (manitol, xilitol, sorbitol), probióticos e proteína de soja.

Contudo, para ser considerado um alimento funcional, o mesmo deve ser satisfatoriamente demonstrado que afeta benéficamente uma ou mais funções-alvo no corpo, além de efeitos nutricionais adequados, de alguma forma que seja relevante para uma melhoria do estado de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doença (GONZÁLEZ-DÍAZ; VILAPLANA-APARICIO; IGLESIAS-GARCÍA, 2020).

Os alimentos de competência da ANVISA que veiculem essas alegações devem ser enquadrados e registrados na categoria de alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde conforme a Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999 ou na categoria de substâncias bioativas e probióticos isolados prevista na Resolução n. 02, de 07 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2019).

De acordo com a Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999 da ANVISA (BRASIL, 1999), o registro de um alimento funcional só pode ser realizado após comprovada a alegação de propriedades funcionais ou de saúde de acordo com o consumo previsto ou recomendado pelo fabricante ou sua finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso, haver evidências científicas com a composição química ou caracterização molecular da formulação do produto, devendo também haver ensaios bioquímicos, ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação, estudos epidemiológicos, ensaios clínicos, além de evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecidas sob propriedades e características do produto e comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde.

Porém, não são aprovadas alegações para ingredientes ou componentes dos alimentos, e sim para o produto final que tenha esses ingredientes ou componentes, diante disso e de acordo com o item 3.3 da Resolução nº 18/1999, as alegações aprovadas relacionam a propriedade funcional e ou de saúde de um nutriente ou não nutriente do alimento, contudo a comprovação da eficácia da alegação deve ser realizada considerando a formulação e as características do alimento (BRASIL, 2019).

Dentre os diversos alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, encontram-se os probióticos por possuírem culturas de micro-organismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro (BRASIL, 2019).

1.1 Probióticos

1.1.1 Definição e Histórico

O termo probiótico foi originalmente derivado da palavra grega “pro” (para) e “bios” (vida), portanto, significando “para vida”, esse termo foi utilizado pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell como fatores secretados por um micro-organismo que estimulam o crescimento de outro (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

Em 1974, Parker, redefiniu o termo probiótico como “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal” (BRITTON; HOFFMANN; KHORUTS, 2021), porém o termo “substância” é muito amplo para ser vinculado aos probióticos, e dessa forma, essa definição caiu em desuso (ALETA; HRVAT; DŽUHO, 2020). Então, Roy Fuller, em 1989, definiu pela primeira vez, probióticos, como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal” (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que administrados em quantidade adequadas proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro, pois contribuem para a melhoria da microbiota intestinal (FAO/WHO, 2001).

Finalmente, em 2013, Cientistas Internacionais no encontro da Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) forneceu uma pequena correção gramatical e reformulou a definição anterior como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro", (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020), uma definição que foi ligeiramente revisada da definição original estabelecida pela OMS em 2001 (ZUCKO et al., 2020).

Embora o termo “probiótico” e sua definição tenha se originado atualmente, a história dos mesmos, no entanto, aparenta se aproximar da história do homem, quando a humanidade começou a cultivar junto com, e posteriormente substituindo a caça e coleta, cerca de 10.000 anos atrás, passou a produzir também alimentos e bebidas fermentadas, muitos dos quais ainda estão em uso hoje, incluindo iogurte, kefir, kimchi, chucrute, tempeh, missô e kombucha, que fazem parte das dietas em diferentes culturas e etnias (PACE; MACCHINI; CASTAGNA, 2020).

Os primeiros estudos científicos sobre os benefícios dos micro-organismos no trato gastrointestinal humano, vieram a partir de Elie Metchnikoff, no início de 1900 (KUMARI *et al.*, 2020), onde sugeriu que "micróbios formadores de ácido de leite azedo" poderiam ser "inimigos úteis" dos micróbios "nocivos" no intestino (BRITTON; HOFFMANN; KHORUTS, 2021).

Metchnikoff, então propôs a teoria de que a manipulação da composição do microbioma intestinal com certas bactérias benéficas tem a capacidade de melhorar a saúde e prolongar a vida (CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020), sugerindo que a “auto-intoxicação intestinal” e o fator de envelhecimento poderiam ser reprimidos pela modificação da microbiota intestinal e substituição de micro-organismos proteolíticos como o *Clostridium*, que produzem substâncias tóxicas como amônia, fenóis e indóis a partir da digestão de proteínas (AHMED; KOUL, 2021).

Dessa forma, formulou a hipótese de que o envelhecimento resulta da putrefação intestinal, que poderia ser bloqueada da mesma forma que a fermentação evita o apodrecimento dos alimentos (BRITTON; HOFFMANN; KHORUTS, 2021), acreditando que a dieta ocidental estimulava a produção de autotoxinas redutoras de vida produzidas por organismos intestinais prejudiciais e que a ingestão diária de

probióticos, por exemplo, de leite azedo, atenuasse esses efeitos. (CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020).

Na mesma época, o pediatra francês Henry Tissier, observou que as crianças com diarreia tinham nas fezes um baixo número de bactérias irregulares em forma de Y (bífidas), nas quais foram chamadas de *Bacillus bifiduscommunis* e mais tarde foram designadas ao gênero *Bifidobacterium* (bífidas) (NWOBODO; UGWU, 2020), do contrário, essas bactérias eram abundantes em crianças saudáveis, sugerindo a ingestão desses micro-organismos no tratamento da diarreia (KHORUTS; HOFFMANN; BRITTON, 2020).

Em 1917, o professor alemão, Alfred Nissle, isolou uma cepa não patogênica de *Escherichia coli* das fezes de um soldado da Primeira Guerra Mundial que não tinha desenvolvido enterocolite durante um surto grave de shigellose, dessa forma usando a cepa Nissle 1917 de *Escherichia coli*, como probiótico em distúrbio intestinal, sendo o primeiro pesquisador a utilizar bactérias não BAL (Bactérias do Ácido Lático) como probiótico (AHMED; KOUL, 2021).

Em 1930, o microbiologista japonês Minoru Shirota conseguiu cultivar bactérias de ácido láctico (*Lactobacillus*) e garantir que atingisse o intestino ainda vivo, ele a chamou de Shirota *Lactobacillus casei* (*Lactobacillus casei* estirpe Shirota) que foi utilizada na produção de uma bebida fermentada, que hoje é comercializada como Yakult (OKUNO, 2020).

1.1.2 Benefícios e mecanismos de ação

Um importante grupo dos alimentos funcionais é dos probióticos, que conferem efeitos benéficos a saúde por meio de diferentes mecanismos que envolvem uma ampla gama de compostos bioativos (CHUG; KAMAL-ELDIN, 2020), onde a intenção de consumi-los, é aproveitar seus benefícios em uma relação simbiótica ou comensal com a microbiota intestinal (ASHAOLU, 2020).

Os mecanismos de ação dos probióticos interferem na composição e funções das células epiteliais e imunológicas do intestino do hospedeiro, sendo que nem todos os mecanismos foram confirmados em todas as cepas porque uma célula probiótica pode exibir vários mecanismos simultaneamente, ainda mais complexos por diversos

fatores, dessa forma, não havendo uma cepa que forneça todos os benefícios no organismo (ASHAOLU, 2020).

Os benefícios dos probióticos para a saúde foram amplamente demonstrados (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020), os probióticos são bem conhecidos por aumentar a imunidade dos seres humanos, protegendo contra patógenos gastrointestinais, portanto, os mecanismos de ação pelos quais eles exercem seus efeitos benéficos no hospedeiro incluem secreção de substâncias antimicrobianas, exclusão competitiva em locais de adesão e fontes nutricionais, aumento a função da barreira intestinal e imunomodulação (ASHAOLU, 2020).

Uma das principais atividades atribuídas aos probióticos é a produção e liberação de antimicrobianos, na qual consiste na síntese de diversas substâncias como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio ou a produção de toxinas específicas com faixas de morte muito estreitas, como bacteriocinas, bacteriófagos ou substâncias inibidoras semelhantes às bacteriocinas, que impedem a proliferação e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020).

Outro mecanismo de ação é a capacidade de adesão da bactéria probiótica de aderir às células epiteliais ou ao muco com propósito de proteger o organismo do hospedeiro tanto da invasão quanto da aderência de patógenos (KHANEGHAH, et al., 2020), além da exclusão competitiva, onde envolve locais de adesão e competição de nutrientes entre uma cepa probiótica e um micro-organismo patogênico (ASHAOLU, 2020).

Outro efeito benéfico do consumo de probióticos é a ativação posterior da modulação do sistema imunológico, onde os mesmos são capazes de modular e estabilizar a composição da microbiota o que pode levar a melhora ao sistema imunológico e prevenir respostas inflamatórias por inibição da produção do fator de transcrição NF- κ B (KHANEGHAH, et al., 2020), além de desempenharem papéis importantes na proteção das células epiteliais intestinais contra inflamação e distúrbios relacionados por meio da regulação de anticorpos, linfócitos, interleucinas e produção de citocinas e quimiocinas (CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020).

Além disso, de acordo com Chugh e Kamal-Eldin (2020), as bactérias probióticas possuem a capacidade de interagir com receptores toll-like (TLR) das células epiteliais e células dendríticas (DCs) e com monócitos / macrófagos e linfócitos B e linfócitos T, sendo capaz de suprir a inflamação intestinal ao diminuir a expressão de TLR e a secreção de metabólitos que inibem a entrada do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) nas células mononucleares do sangue e inibição da sinalização de NF- κ B, dessa forma modulam a imunidade e a expressão de genes inflamatórios, estimulando a produção interleucina-10 (IL-10) e imunoglobulina A (IgA), onde a produção de IgA, que prossegue via a ativação de células dendríticas, células T *naive* e células B induz efeitos imunomoduladores e eliminação de bactérias prejudiciais.

As bactérias probióticas também apresentam diferentes atividades metabólicas catalisadas por proteases, lipases, esterases e amilases que podem estar ausentes no hospedeiro, fora a produção das enzimas β -galactosidase e lactase e mitigam a intolerância à lactose (ZENDEBOODI, et al., 2020).

Eles também podem produzir nutrientes essenciais e fatores de crescimento, dos quais os mais importantes são a vitamina B12, que as plantas não podem sintetizar, e a vitamina K, que contribui para a estabilidade da microbiota intestinal. Além da vitamina B12, as bactérias probióticas são capazes de produzir várias vitaminas pertencentes ao complexo B, como folato e tiamina, além disso, são capazes de produzir menaquinona (vitamina K2) em contraste com a filoquinona (vitamina K1) produzida pelas plantas (CHUNGH; KAMAL-ELDIN, 2020).

As bactérias probióticas também são capazes de produzir compostos biologicamente importantes, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (principalmente acetato, propionato e butirato), por meio da conversão de carboidratos indigeríveis, que por sua vez medeiam efeitos relevantes na saúde do corpo humano (ZHONG, et al., 2020), como em especialmente o butirato, que apresenta efeitos terapêuticos contra várias doenças, incluindo doenças inflamatórias do intestino, câncer de cólon e doenças cardíacas e dessa forma a produção de butirato tem sido implicada na proteção contra obesidade, diabetes e câncer (CHUNGH; KAMAL-ELDIN, 2020).

Os probióticos apresentam ainda a capacidade de influenciar microbiota intestinal natural do corpo, sendo que muitas preparações têm sido usadas para tratar diarreia causada por antibióticos, além da existência de vários estudos que concluíram efeitos positivos em diferentes tipos de distúrbios extra-intestinais e gastrointestinais, incluindo síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal, infecções vaginais e reforço imunológico (AHMED; KOUL, 2021).

Para exercer esses benefícios à saúde, os probióticos devem ser fornecidos em quantidades adequadas, e a recomendação geral é de 10^6 - 10^7 UFC/mL ou g, outros estudos consideram 10^6 - 10^9 UFC/mL ou g como a dose inicial mínima, para que os probióticos possam sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal e alcançar o intestino, em quantidades suficientes para conferir tais benefícios (PIMENTEL, et al., 2021).

1.2 *Bacillus* ssp. como probiótico

O gênero *Bacillus* é composto por um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram-positivas, quimio-heterotróficas, aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase positiva (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019), sendo onipresentes no meio ambiente e são encontradas no solo, água, plantas, mamíferos, animais aquáticos, insetos e outros invertebrados (PLOMER; PEREZ; GREIFENBERG, 2020).

Esta capacidade de sobrevivência e crescimento em ecossistemas diferenciados é baseada na produção de esporos (XING; HAPER, 2020), que são caracterizados por sua notável capacidade de resistência e dormência, além dos tratamentos comuns de inativação e desinfecção, incluindo calor, radiação e vários produtos químicos (CHO; CHUNG, 2020), e com relação as propriedades fisiológicas e nas necessidades para o crescimento são de grande importância para a indústria de alimentos (SOARES et al., 2019).

Além disso, membros desse gênero têm sido usados na medicina e na indústria farmacêutica para controlar várias doenças em humanos, animais e plantas como um agente de controle biológico devido à sua capacidade de sintetizar uma ampla variedade de metabólitos com atividade antimicrobiana (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2020).

Ainda de acordo com Kuebutornye; Abarike; Lu (2020), os bacilos são microrganismos de baixo custo, não patogênicos e não tóxicos (embora não todos) e fontes mais eficazes de antibióticos, portanto, são desejáveis para a produção comercial.

1.2.1 Esporos de *Bacillus clausii* como probiótico

Em seus ecossistemas naturais, os micro-organismos são constantemente desafiados por mudanças desfavoráveis nas condições ambientais, os mesmos requerem vários mecanismos de adaptação, como as bactérias formadoras de esporos que esporulam em caso de condições desfavoráveis para sobreviver, formando esporos que podem persistir em um estado dormente por longos períodos (UGWUODO; NWAGU, 2021).

Os esporos bacterianos são pequenas estruturas com tamanhos variando de 0,5 µm a 2 µm, composto por um núcleo, um córtex, uma parede da célula germinativa e um revestimento constituído por proteínas, peptidoglicanos e lipídios (UGWUODO; NWAGU, 2021).

Podem permanecer dormentes por longos períodos de tempo e reter resistência significativa aos danos ambientais, como calor, radiação, produtos químicos tóxicos e pH extremo, podendo permanecer em seus estados dormentes e resistentes por anos, mas quando expostos a nutrientes específicos, os esporos retornam poucos minutos após a germinação e crescimento excessivo, desencadeada pela presença de nutrientes, incluindo aminoácidos, açúcares e nucleosídeos (CHO; CHUNG, 2020).

Entre as bactérias formadoras de esporos, as cepas de *Bacillus* têm sido as mais frequentemente empregadas como probióticos (SOARES et al., 2019), pois demonstraram possuir melhores propriedades probióticas atribuíveis à sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas que são ativas contra muitos micróbios e são não patogênicas e não tóxicas, juntamente com sua capacidade de esporulação (ou seja, que estender seu período de eficácia), dá-lhes uma vantagem dupla em termos de sobrevivência (tolerância ao calor e maior vida útil) em

diversos ambientes em comparação com outros probióticos, como *Lactobacillus* spp. (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019).

Além disso possuem características como a inibição de patógenos competindo por locais de adesão com micróbios patogênicos para inibir seu crescimento, bem como a produção de antibióticos e bacteriocinas, inibição da expressão do gene de virulência (extinção de “quórum”) e a produção de enzimas líticas, como proteases, quitinases, celulasas e β -1,3-glucanases que lisam a parede celular de micro-organismos patogênicos (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019).

Segundo Soares et al. (2019), os benefícios das cepas de *Bacillus* como probiótico, para saúde, descritas na literatura, destacam-se as melhorias na digestão de carboidratos de proteínas, modulação da microbiota de idosos e melhora da disbiose, redução do dano muscular e melhora da recuperação do exercício, redução do inchaço e dor abdominal, atividade antimicrobiana contra patógenos no trato gastrointestinal trato, parâmetros melhorados de colite induzida por *Clostridium difficile* em ratos, parâmetros de prevenção de obesidade, entre outros.

Produtos probióticos contendo esporos são comercializados em diversos países, sendo amplamente difundidos na Austrália, Ásia, EUA, América do Sul e Europa, já a Itália apresenta uma longa história sobre uso de probióticos à base de esporos para consumo humano, como a suspensão de esporos de *Bacillus clausii* que está disponível desde 1958 para tratamento de diarreia em crianças e para o controle dos efeitos colaterais dos antibióticos (CELANDRONI, et al., 2019).

1.2.2 *Bacillus clausii*

Bacillus clausii é uma bactéria móvel flagelada, Gram-positiva, formadora de esporos, aeróbio facultativo e catalase-positiva, não patogênica, que tolera meios alcalinos, possui um crescimento ótimo em temperatura de 30 a 50°C, em ambientes de salinidade de até 10% de NaCl e em pH de 7 a 10,5, sendo essa bactéria frequentemente encontrada como componente da microflora do solo e algumas de suas propriedades utilizadas para a aplicação em campos industriais e biotecnológicos (SANTOS; AMÊNDOLA; SANTOS, 2019).

Em 2001, algumas espécies de *B. subtilis* utilizadas na indústria de probióticos e sabonetes (KHATRI, SHARMA, SUBRAMANIAN, 2019), foram caracterizadas e catalogadas como pertencentes a uma genoespécie única identificadas como espécies tolerantes álcalis e alinhadas com membros do subgrupo na qual exibem um baixo nível de diversidade intra-espécies e exibem alto grau de conservação genômica, denominado de *B. clausii*, nome dado em homenagem a Dieter Claus, bacteriologista alemão que fez contribuições fundamentais para a taxonomia dos *Bacillus* (SANTOS; AMÊNDOLA; SANTOS, 2019).

Os esporos de *Bacillus clausii* podem ser administrados como suspensão líquida ou forma liofilizada, sendo capaz de sobreviver durante o trânsito gastrointestinal e manter quantidade considerável no intestino por até 12 dias após uma única dose (PLOMER; PEREZ; GREIFENBERG, 2020).

Na forma de esporos, resiste ao meio ácido por pelo menos 2 horas a uma temperatura de 37°C, para que possa chegar no duodeno nesse período intacto, resistindo aos sais biliares por 24 horas e calor úmido a 100°C por 20 a 30 minutos (SANTOS; AMÊNDOLA; SANTOS, 2019).

Os esporos de *B. clausii* previnem diarreia infantil, diminuem duração de infecção respiratória., contagens de eosinófilos reduzidas em crianças alérgicas e mostra o efeito positivo nos efeitos colaterais da terapia com *Helicobacter pylori* à base de antibióticos e nas infecções do trato urinário (PATEL; PATEL; ACHARYA, 2020). Cepas de *B. clausii* também demonstram produção aumentada de interferon, proliferação de células T mitogênicas e produção de linfocina induzida por mitogênio em modelos ex vivo e in vivo (LEE; WON-SUCK; PAIK, 2019).

Cepas probióticas de *B. clausii* são capazes de produzir uma substância antimicrobiana denominada clausina, que é ativa contra bactérias Gram-positivas como *C. difficile* e *Staphylococcus aureus*, nesse caso, *B. clausii* tem a função de neutralizar a toxina produzida por *C. difficile*, o principal fator de virulência do patógeno e ação imunomoduladora, regulação do crescimento e diferenciação celular, sinalização célula-célula, adesão celular, transcrição e transdução de sinal (comunicação de células através de mensageiros secundários), produção de

vitaminas e proteção intestinal a partir de agentes genotóxicos (SANTOS; AMÊNDOLA; SANTOS, 2019).

Bacillus clausii restabelece o equilíbrio da flora residente e pode, conseqüentemente, ser usada para o tratamento e prevenção da disbiose intestinal, como observada durante o tratamento com antibióticos ou quimioterapia, ou em pacientes com avitaminose endógena (NAVARRA, et al., 2021) como é altamente resistente à maioria dos antibióticos, sua eficácia não é alterada pela antibioterapia concomitante (CASTRO, GUNO, PEREZ, 2019).

A resistência aos antibióticos é atribuída às múltiplas cepas da bactéria, com cada cepa tendo seu próprio conjunto de resistência a uma ampla gama de antibióticos e isso permite que seja usada como adjuvante com outros antibióticos além disso, demonstra um baixo nível de atividade genômica intraespecífica e exibe um alto grau de conservação genômica nos últimos 25 anos (CASTRO et al., 2020).

A Enterogermina (Sanofi-Aventi®, Itália) é um medicamento probiótico que foi inicialmente registrado como preparação farmacêutica em 1958 e com um status medicinal de venda livre em 1999. Amplamente utilizado na Itália desde a década de 1960 (GHERLARDI, et al., 2015), caracteriza-se por um composto de uma mistura de quatro espécies esporuladas de *Bacillus clausii* (OC, NR, SIN, T) (KHATRI, SHARMA, SUBRAMANIAN, 2019).

Pois as designações dessas cepas bacterianas são derivadas da resistência dos esporos a diversos antibióticos: O/C, resistente ao cloranfenicol; N/R, resistente a novobiocina e rifampicina; SIN, resistente à neomicina e estreptomicina; T, resistente à tetraciclina (CASTRO et al., 2020).

Hoje em dia, é comercializado em 55 países ao redor do mundo em várias formulações: frascos líquidos (5 mL) ou cápsulas liofilizadas contendo 2×10^9 de UFC, frascos líquidos (5 mL) contendo 4×10^9 de UFC e pó liofilizado para suspensão e grânulos orodispersíveis contendo 6×10^9 de UFC (PLOMER; PEREZ; GREIFENBERG, 2020), todas as cepas derivadas da ATCC 9799, com resistência a condições físicas e químicas e a antibióticos (KHATRI, SHARMA, SUBRAMANIAN, 2019).

1.3 Características e parâmetros das cepas probióticas para a fabricação e aplicação em produtos alimentícios

Os probióticos contêm micro-organismos vivos que são adicionadas aos alimentos ou suplementos alimentares, dessa forma uma avaliação de segurança cuidadosa precisa ser realizada para verificar se os mesmos adicionados são seguros ou prejudiciais para o consumo, considerando a possibilidade de efeitos colaterais teóricos (KOIRALA; ANAL, 2021), então para ser empregada como probiótico, o micro-organismo deve possuir o selo de geralmente reconhecido como seguro ou *Generally Recognized as Safe* (GRAS) usado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (NYANZI; JOOSTE; COMPRA, 2021).

Candidatos a culturas microbianas destinadas ao uso como novas cepas probióticas precisam ser avaliados cuidadosamente, especialmente aqueles isolados de ecossistemas não convencionais (CASTRO-LÓPEZ, et al., 2021), pois os probióticos devem ser extremamente seguros e não devem representar nenhum risco para o hospedeiro (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

Para que seja considerado um micro-organismo probiótico, a OMS, FAO e *European Food Safety Authority* (EFSA), apresentam critérios cruciais para a seleção de cepas probiótica, os quais incluem segurança, bem como propriedades tecnológicas, sensoriais e funcionais das cepas (ZOMMITI, FEUILLOLEY, CONNILL, 2020).

O ponto central da avaliação de segurança de cepas probióticas potenciais é confirmar a classificação taxonômica em nível de espécie, mas também é necessário sequenciar todo o genoma de uma cepa específica para analisar genes de resistência a antibióticos, e é necessário determinar se a resistência é inerente (intransferível) ou adquirida. Além disso, os seguintes fatores devem ser considerados ao realizar a avaliação de segurança: a função fisiológica do probiótico, a saúde do receptor, o método de administração do probiótico (oral ou vaginal), a forma de administração (líquido ou pó) e a cepa probiótica envolvida (NYANZI; JOOSTE; COMPRA, 2021).

Já para avaliar a segurança geral de alimentos e bebidas à base de probióticos de acordo com Koirala e Anal (2021) são levadas em considerações a origem e natureza, patogenicidade, processo de administração, capacidade de transportar

genes de resistência a antibióticos ou não, nível de exposição, estado de saúde do hospedeiro e seu uso pretendido deve ser considerado.

A cepa probiótica usada em alimentos e bebidas não devem ser patogênicas e nem representar risco para o hospedeiro. Também é essencial comprovar a eficácia dos micro-organismo identificados por vários testes *in vitro* e potencialmente *in vivo* com testes clínicos em humanos com alimentos e bebidas reivindicados por probióticos (KOIRALA; ANAL, 2021).

No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da ANVISA, segundo requisitos da RDC nº 241, de 27 de julho de 2018. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (BRASIL, 2019).

A RDC nº 323/2003 exige a apresentação de estudos clínicos de fase III comprobatórios da segurança e eficácia terapêutica da proposta medicamentosa probiótica a ser lançada no mercado (BRASIL, 2003) enquanto que, para alimentos, a Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999 dispõe das exigências e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos e segurança de consumo (BRASIL, 1999).

Um fator importante é a viabilidade do produto probiótico, pois durante o processamento e armazenamento de alimentos, os probióticos devem ter a capacidade de suportar temperaturas de congelamento e manter a viabilidade em certos níveis até o momento do consumo, já que para alcançar os reivindicados efeitos benéficos para a saúde, contagens de pelo menos 6 log de UFC/g ou mL normalmente devem estar presente nos produtos finais (RANADHEERA, et al., 2020).

No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (Brasil, 1999) tem avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde aprovados no país. Anteriormente, a referida Comissão recomendou que um alimento funcional probiótico deveria apresentar uma concentração mínima de 6 log de UFC/g dentro do prazo de validade do produto (BRASIL, 2019).

Contudo, na atualidade a prescrição de probióticos é baseada em uma concentração mínima de 9 log de UFC por porção de alimento, sendo esse critério desenvolvido para compensar as perdas na viabilidade dos probióticos ao longo processamento e armazenamento dos alimentos e para garantir níveis adequados de sobrevivência probiótica através do trato gastrointestinal após o consumo (RANADHEERA, et al., 2020).

No Brasil, para um produto probiótico apresentar a alegação de promoção de saúde, no seu rótulo, a ANVISA estabelece que a quantidade mínima viável da cultura deva estar entre 8 a 9 log de UFC por porção do produto, sendo que valores menores que esses podem ser aceitos desde que o fabricante comprove sua eficácia, a quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação (BRASIL, 2008).

Referências

AHMED, S; KOUL, A. Industrial Production and Health Benefits of Probiotics. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 25, n. 1, 2021.

ALETA, A; HRVAT, F; DŽUHO, A. Probiotics Review and Future Aspects. **International Journal of Innovative Science and Research Technology**, v. 5, n. 5, 2020.

ASHAOLU, T. J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, 2020.

ASPRI, M; PAPADEMAS, P; TSALTAS, D. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. **Fermentation**, v. 6, n. 1, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999**. Institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento Tecno-científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, com a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegação de função em rótulos, submetidos por lei ao regime de vigilância sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 de maio de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/18_99.htm>. Acessado em 10 jul. 2020.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 2, de 07 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Rotulagem. Brasília: ANVISA, 2002. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=Mjl1Mw%2C%2C>> Acesso em: 10 jul. 2020.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico de registro, alteração e revalidação de registro dos medicamentos probióticos**. RDC nº 323, de 10 de novembro de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_323_2003_COMP.pdf/4e49fa80-4303-4733-b7a8-8aa2331ca184>.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. IX -Lista de alegações de propriedade funcional aprovada. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019**. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Brasília: ANVISA, 2019.

BRITTON, R. A; HOFFMANN, D. E; KHORUTS, A. Probiotics and the Microbiome - How Can We Help Patients Make Sense of Probiotics? **Gastroenterology**. v. 160, n. 2, p. 614–623, 2021.

CAÑAS, G. J. S.; BRAIBANTE, M. E. F. A Química dos Alimentos Funcionais. **Química Nova na Escola**, v. 41, n. 3, 2019.

CASTRO, C. *et al.* Genomics-based approaches to identify and predict the health-promoting and safety activities of promising probiotic strains – A probiogenomics review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, 2021.

CASTRO, J. A.; GUNO, M. J. V; PEREZ, M. O. *Bacillus clausii* as adjunctive treatment for acute community-acquired diarrhea among Filipino children: a large-scale, multicenter, open-label study (Coddle). **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**, v. 5, n. 1, 2019.

CASTRO, J. *et al.* Recommendations for the adjuvant use of the poly-antibiotic-resistant probiotic *Bacillus clausii* (O/C, SIN, N/R, T) in acute, chronic, and antibiotic-associated diarrhea in children: consensus from Asian experts. **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**, v. 6, n. 1, 2020.

CELANDRONI, F. *et al.* Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotics formulations. **Plos one**, v. 14, n. 5, 2019.

CHO, W; CHUNG, M. *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 11, 2020.

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

DÍAZ, L. D; FERNÁNDEZ-RUIZ, V; CÁMARA, M. An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. **Journal of Functional Foods**, v. 68, 2020.

FAO/WHO (2001). **Report Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf> >.

GHERLARDI, E. *et al.* Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, 2015.

GONZÁLEZ-DÍAZ, C; VILAPLANA-APARICIO, M. J; IGLESIAS-GARCÍA, M. How Is Functional Food Advertising Understood? An Approximation in University Students. **Nutrients**, v. 12, n. 11, 2020.

KHANEGHAH, M. A. *et al.* Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, 2020.

- KHATRI, I; SHARMA, G; SUBRAMANIAN, S. Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, 2019.
- KHORUTS, A; HOFFMANN, D. E; BRITTON, R. A. Probiotics: Promise, Evidence, and Hope. **Gastroenterology**, v. 159, n. 2, 2020.
- KOIRALA, S; ANAL A. K. Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. **Future Foods**, v. 3, 2021.
- KONSTANTINIDI, M; KOUTELIDAKIS, A. E. Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. **Medicines**, v. 6, n. 3, 2019.
- KRORUTS, A; HOFFMANN, D. E. BRITTON, R. A. Probiotics: Promise, Evidence, and Hope. **Gastroenterology**, v. 159, n. 2, 2020.
- KUEBUTORNYE, F. K. A; ABARIKE, E. D; LU, Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, 2019.
- KUMARI, R. et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Current status and future uses for human health. **New and future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, 2020.
- LEE, N; KIM, W; PAIK, H. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 5, 2019.
- NAVARRA, P. et al. Kinetics of Intestinal Presence of Spores Following Oral Administration of *Bacillus clausii* Formulations: Three Single-Centre, Crossover, Randomised, Open-Label Studies. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 46, n. 3, 2021.
- NWOBODO, D. C; UGWU, M. C. Immunomodulatory Potentials of Probiotics: A Review. **Asian Journal of Immunology**, v. 3, n. 2, 2020.
- NYANZI, R; JOOSTE, P. J; BUYS, E. M. Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, 2021.
- OKUNO, A. The Philosophy of the Yakult Group and Its Propagator, the Yakult Lady. **Cultural Translation of Management Philosophy in Asian Companies**, v. 21, 2020.
- PACE, F; MACCHINI, F; CASTAGNA, V. M. Safety of probiotics in humans: A dark side realed?. **Digestive and Liver Disease**. v. 52, n.9, 2020.
- PATEL, C; PATEL, P; ACHARYA, S. Therapeutic Proséctive of a Spore – Forming Probiotic – *Bacillus clausii* UBBC07 Against Acetaminophen – Induced Uremia in Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, 2020.

- PIMENTEL, T. C. *et al.* Probiotic non-dairy frozen dessert: Technological and sensory aspects and industrial challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 107, 2021.
- PLOMER, M; PEREZ, M; GREIFENBERG, D. M. Effect of *Bacillus clausii* Capsules in Reducing Adverse Effects Associated with Helicobacter pylori Eradication Therapy: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 9, n. 4, 2020.
- PRADHAN, D; MALLAPPA, R. H; GROVER, S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control**, v. 108, 2020.
- RANADHEERA, C. S., *et al.* Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019.
- SANTOS, D. F; AMÊNDOLA, I; SANTOS, S. S. F. *Bacillus clausii*: Revisão de características e aplicações na medicina, biotecnologia e indústria alimentícia. **Revista Biociências**, v. 25 n. 2, 2019.
- SOARES, M. B. *et al.* The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. **Food Research International**, v. 125, 2019.
- UGWUODO, C. J; NWAGU, T. N. Stabilizing enzymes by immobilization on bacterial spores: A review of literature. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, 2021.
- XING, Y; HARPER, W. F. *Bacillus* spore awakening: recent discoveries and technological developments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 64, 2020.
- ZENDEBOODI, F. *et al.* Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, 2020.
- ZHONG, C. *et al.* Short-Chain Cello-oligosaccharides: Intensification and Scale-up of Their Enzymatic Production and Selective Growth Promotion among Probiotic Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, 2020.
- ZOMMITI, M; FEUILLOLEY, M. G. J; CONNIL, N. Update of Probiotics in Human World: A Nonstop Source of Benefactions till the end of Time. **Microorganisms**, v.8, n. 12, 2020.
- ZUCKO, J. *et al.* Probiotic – friend or foe?. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, 2020.

Capítulo 2- Artigo Científico

Caracterização do potencial bioquímico e funcional do probiótico *Bacillus clausii*

Manoel Armando Delgado Junior¹
<https://orcid.org/0000-0002-9437-6476>

Kelly Cristina da Silva Brabes*¹
<https://orcid.org/0000-0001-7955-1849>

¹Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental; Universidade Federal da Grande Dourados - MS, Brasil.

Endereço Profissional

Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Engenharia. Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Aeroporto
79804-970 - Dourados, MS - Brasil - Caixa-postal: 533
Telefone: (67) 34113894
Fax: (67) 6734113894
URL da Homepage: www.ufgd.edu.br

Palavra-chave: Microbiota Intestinal, Caracterização Bioquímica, Atividade Antioxidante, Atividade de β -galactosidase.

Running title: Caracterização do potencial bioquímico e funcional do probiótico *Bacillus clausii*

Seção dos AABC à qual o artigo pertence: Microbiologia

*Kelly Cristina da Silva Brabes

Rodovia Dourados/Itahum, Km 12 - Unidade II | Caixa Postal: 364 | Cep: 79.804-970

Tel: (67) 98121-9614

kellybrabes@gmail.com

Resumo

O uso de bactérias probióticas formadoras de esporos como *Bacillus* spp., tem aumentado devido a capacidade de formar esporos resultando em maior resistência durante os processos de produção, armazenamento e comercialização. O *Bacillus clausii* está no mercado há mais de 55 anos e é caracterizado pela presença de quatro cepas probióticas (O/C, SIN, N/R e T). Neste estudo o *Bacillus clausii*, proveniente do produto comercial Enterogermina®, foi obtido em Farmácias e Drogarias do município de Dourados-MS. Para caracterizar *Bacillus clausii* para uso como probiótico foi realizado a análise de pH 2 e 3, teste de tolerância e hidrólise de sais biliares a 0,3%, teste de tolerância a pepsina e pancreatina, teste de adesão, produção de exopolissacarídeo (EPS), atividade de hemólise, atividade de antioxidante e atividade de β -galactosidase. Nas análises de tolerância ao pH ácido, aos sais biliares, a pepsina e pancreatina, não apresentaram diferenças significativas se comparados com o log de UFC/mL⁻¹ de células iniciais. Apresentou atividade de hidrólise sais biliares e de γ -hemolítica em ágar com sangue. Foi capaz de eliminar 27% de DPPH, 67% de se aderir a chapa de aço inox e 67mg/L de EPS, além de hidrolisar ONPG. Dessa forma indicando grande potencial probiótico.

Palavra-chave: Microbiota Intestinal, Caracterização Bioquímica, Atividade Antioxidante, Atividade de β -galactosidase.

Introdução

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) descrevem os probióticos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (ZHU, et al., 2021). Vários benefícios têm sido associados ao seu consumo, tais como tratamento de diarreia, alívio dos sintomas de intolerância à lactose, redução do colesterol no sangue, tratamento da síndrome do intestino irritável (doença inflamatória do intestino), propriedades anticancerígenas, síntese de vitaminas e aumento da imunidade (ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020).

Entre as muitas bactérias probióticas descobertas as *Bacillus* spp. demonstraram possuir melhores propriedades probióticas atribuíveis à sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas que são ativas contra muitos micróbios e são não patogênicas e não tóxicas, juntamente com sua capacidade de esporulação (ou seja, estende seu período de eficácia), dá-lhes uma vantagem dupla em termos de sobrevivência (tolerância ao calor e maior vida útil) em diversos ambientes em comparação com outros probióticos (KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019).

Produtos probióticos medicamentosos contendo esporos são comercializados em diversos países, Itália apresenta uma longa história sobre o uso de probiótico à base de esporos para consumo humano, por exemplo, a disponibilização no mercado italiano da suspensão de esporos de *Bacillus clausii* que está disponível desde 1958 para tratamento de diarreia em crianças e para o controle dos efeitos colaterais dos antibióticos (CELANDRONI, et al., 2019).

A Enterogermina® (Sanofi-Aventi®, Itália) é um medicamento probiótico contendo esporos de quatro cepas de *B. clausii* resistentes a antibióticos (O/C, N/R, SIN, T), disponível em 55 países ao redor do mundo em várias formulações: frascos líquidos ou cápsulas liofilizadas contendo 2 bilhões de unidades formadoras de colônias (UFC), frascos líquidos contendo 4 bilhões de UFC e pó liofilizado para suspensão e grânulos orodispersíveis contendo 6 bilhões de UFC (PLOMER; PEREZ; GREIFENBERG, 2020).

Nos últimos anos tem aumentado o uso de bactérias probióticas formadoras de esporos como *Bacillus* spp., pois a sua capacidade de formar esporos resulta em maior resistência durante os processos de produção industrial, armazenamento e comercialização, além da sua capacidade de tolerância ao pH e enzimas digestivas, desta forma estas bactérias são melhor absorvidas pelo organismo pois resistem ao pH estomacal e as enzimas digestivas do estômago e do intestino (MAZKOUR, et al., 2021).

Diante disso, esse trabalho tem como objetivo, caracterizar a capacidade probiótica funcional de *Bacillus clausii*, simulando as condições do trato gastrointestinal, seu aspecto de segurança, de acordo com as normas de vigilância existente, além do potencial bioquímico e funcional

Materiais e Métodos

A mistura comercialmente disponível de cepas de *B. clausii* investigadas neste estudo (Enterogermina®), foi obtido em Farmácias e Drogarias do Município de Dourados-MS e armazenada no Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) para a posterior realização das análises.

Os flaconetes de *B. clausii* foram centrifugados a 12000 rpm a 8°C por 15 minutos em tubo falcon, após a centrifugação o sobrenadante foi dispensado e foi utilizado somente a biomassa para as análises de pH, pepsina, pancreatina e tolerância de sais biliares.

Tolerância ao pH ácido

Após a centrifugação do flaconete, os esporos foram suspensos em tubos com 10 mililitro (mL) de caldo Mueller-Hinton (MH), o pH foi ajustado para 2 e 3. As suspensões preparadas foram incubadas a 37°C durante 0, 1, 2, 3 e 4h. Ao final da incubação, a inoculação foi feita em placas de ágar MH pela técnica de Spread plate e os resultados foram apresentados em log UFC/mL⁻¹ (TOPÇU; KAYA; KABAN, 2020).

Teste de tolerância a pepsina e pancreatina

Para a resistência à pepsina e pancreatina os esporos centrifugados foram suspensos em uma solução de 10mL de caldo MH (pH 2,0) contendo pepsina (3 mg/mL) e em 10mL de caldo MH (pH 8,0) contendo pancreatina (1 mg/mL). As

populações de células viáveis foram determinadas em ágar MH a 37°C no tempo de 0, 1, 2 e 3h com pepsina e 0, 1, 2, 3 e 4h com pancreatina, respectivamente (MONTZOURANI et al., 2019).

Teste de tolerância a sais biliares

A tolerância a sais biliares foi avaliada por meio da suspensão de esporos centrifugados em tubos com 10 mL de caldo MH (pH 8,0) contendo 0,3 % de sais biliares, as suspensões preparadas foram incubadas a 37°C nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4h e feito a contagem de colônias após 24 horas em ágar MH (MONTZOURANI et al., 2019).

Hidrólise de sais biliares (BSH)

Para investigar a atividade de BSH das cepas, o método pela técnica de esgotamento. As culturas foram semeadas em ágar MH acrescido 0,3% de sais biliares. As placas foram incubadas a 37°C durante 72h. Os resultados foram confirmados com a presença de halos precipitados ao redor das colônias (SHARMA, et al., 2021).

Teste de Adesão

O ensaio de aderência foi determinado em placas de aço inoxidável, para tal, foram utilizadas placas de 2,5 cm x 0,8 cm x 0,5 mm, que foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos.

O inóculo foi padronizado na escala de 0,5 de MacFaland e adicionado em um tubo de vidro contendo 9 mL do caldo MH e uma placa de aço inoxidável. Após 24 horas de incubação a 37°C a placa foi removida assepticamente, lavada com 10 mL água peptonada a 1%. Em seguida foi colocada dentro de um tubo contendo 10 mL de água peptonada estéril a 1% e agitadas em vórtex por 3 minutos a fim de criar uma suspensão das células aderidas à superfície. Os números de células desta suspensão foram determinados em ágar MH após incubação a 37°C por 24 horas (MULAW et al., 2019).

Produção de Exopolissacarídeos

As cepas de *Bacillus clausii* foram padronizadas na escala 0,5 de MacFarland e cultivadas em caldo MH suplementado com 2% de sacarose por 3 dias (72 horas) a 37 °C. As células foram centrifugadas (12000 rpm por 20 min, 20 ° C), misturadas a

uma taxa de 1:2 com 95% de etanol à frio, mantidas a 4 °C por 24 h para induzir a precipitação do exopolissacarídeo (EPS). Os precipitados foram ressuspendido por centrifugação (12000 rpm por 15 min, 4 ° C), lavados com água destilada e secos a 55 °C até peso constante. Obteve-se o peso seco (mg/L) para determinar a quantidade de EPS produzido (ALBUQUERQUE, et al., 2018).

Teste de Hemólise

Para testar a atividade hemolítica a cepa de *Bacillus clausii*, em incubação overnight, foi semeada em placas com ágar MH contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubado por 24 horas a 37°C. A atividade hemolítica foi observada através de zonas de hidrólise entorno das colônias em tons de marrom (β -hemólise), tons verdes (α -hemólise) e nenhuma alteração, para controle foi utilizado *Bacillus cereus* ATCC 11778 (γ -hemólise) (BRASIL, 2019).

Atividade Antioxidante

A atividade de eliminação de radicais livres baseou-se na captura do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), as substâncias antioxidantes ao capturar o DPPH produzem uma diminuição na absorbância a 490 nm. O DPPH foi utilizado na concentração de 11 μ MOL, dissolvido em álcool metílico, homogeneizado e transferido para um frasco âmbar, mantido em ambiente sem luz. No escuro, as alíquotas de 0,1 μ L de amostra (sobrenadantes brutos) foram transferidos para 200 μ L de solução de DPPH e homogeneizadas. Após 30 min, a atividade de eliminação do DPPH foi mensurada em espectrofotômetro (iMark™ Microplate Absorbance Reader) a 490 nm. A mesma proporção de 0,1 μ L de água destilada e 200 μ L de DPPH foram utilizados como controle e o álcool metílico foi usado como espaço em branco. A atividade antioxidante foi calculada pela fórmula $[1-(A_0 - A) / A_0] \times 100$, onde A_0 é a absorbância do branco do reagente e A é a absorbância das amostras (SAIF; SAKR, 2020)

Atividade de β -galactosidase

A avaliação da atividade de β -galactosidase foi realizada segundo Paula e colaboradores (2020) utilizando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosose (ONPG) como substrato. Uma colônia da cultura de *Bacillus clausii* foi transferida e misturada em um

tubo contendo 1 mL de substrato e incubado a 37°C/24h, posteriormente, foi avaliado quando a ocorrência de alteração colorimétrica, presença e ausência da cor amarela.

Resultados e Discussões

Tolerância ao pH ácido

A sobrevivência das bactérias no suco gástrico depende da sua capacidade de tolerar o pH ácido do estômago, que é uma das principais características das bactérias probióticas (PATEL; PATEL; ACHARYA, 2020), no presente estudo, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada na análise realizada de esporos de *B. clausii* incubado em pH 2 e 3 no intervalo de tempo de 0 a 4 horas, comparado com o log de UFC/mL⁻¹ de células iniciais (9,3), como apresentado na tabela I.

As bactérias probióticas devem permanecer vivas no hospedeiro durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) para atuar como probiótico (BORICHA, et al., 2019). O pH no estômago humano varia de 1,5 durante o jejum a 4,5 após uma refeição, a ingestão de alimentos pode levar até 3h (SALIBA, et al., 2021), dessa forma o presente estudo indicou que os esporos de *B. clausii* são capazes de resistir as condições altamente ácidas semelhantes à do estômago.

Tais resultados coincidem com os obtidos por Jeon et al. (2017), que ao avaliar esporos de *B. clausii* ATCC 700160, tratado com suco gástrico artificial (pH 2,5) por 3h, houve uma redução apenas de 0,38 log de UFC/mL⁻¹, ou seja, não ocorreu alterações significativas se comparada com o número inicial de células analisadas, como o que ocorreu nesse estudo.

Já na análise realizada por Patel, Patel e Acharya (2020) a cepa *B. clausii* UBBC07 exibiu 85,33%, 75,33% e 71,33% de capacidade de sobrevivência após 1h, 2h e 3h, respectivamente em pH 2,0 e no 3,0, ou seja, uma redução populacional.

Teste de tolerância a pepsina e pancreatina

Para proporcionar os benefícios de saúde esperados os micro-organismos probióticos devem ter mecanismos de exclusão ou resistência a algumas condições impostas pelo trato gastrointestinal (TGI) (ÖZKAN; DEMIRCI; AKIN, 2021), dessa forma os esporos de *Bacillus clausii* não sofreram alterações significativas em log de

UFC/mL⁻¹ quando exposto a pepsina e pancreatina nos tempos determinados de, 0, 1, 2 e 3 horas para pepsina e 0, 1, 2, 3 e 4 horas para pancreatina, como demonstrado na tabela II.

Vecchione et al., (2018) e Prakash et al. (2020), ao estudar os esporos de *Bacillus clausii* proveniente do produto comercial Enterogermina® e os esporos de *Bacillus clausii* UBB07, respectivamente, em ambos expostos a pepsina, não se verificou alterações significativas em log de UFC/mL⁻¹, semelhante aos resultados no presente estudo.

Já Ahire, Kashikar e Madempudi (2020), ao verificarem a sobrevivência dos esporos também de *Bacillus clausii* UBB07, Vecchione, et al., (2018) com os esporos de *Bacillus clausii* proveniente do produto comercial Enterogermina® submetido a pancreatina, ambas pesquisas não obtiveram mudança significativa registrada, equiparando com os resultados obtidos nessa pesquisa.

Teste de tolerância a sais biliares

As concentrações de sais biliares são cruciais como mecanismo de defesa do organismo inibindo a sobrevivência de micro-organismos nocivos à saúde (SABO, et al., 2020), dessa forma a resistência aos sais biliares é uma das qualidades mais significativas dos probióticos, pois os sais dissolvem os lipídios das membranas dos micro-organismos levando ao vazamento e morte celular (SHARMA, et al., 2021).

A análise de tolerância aos sais biliares é essencial para que o probiótico sobreviva no intestino delgado humano, onde a concentração de bile varia de 0,1% a 0,3% (SALIBA, et al., 2021). Diante disso, a variação de log de UFC/mL⁻¹ não apresentou alterações relevantes quando comparado com o valor obtido na contagem de célula inicial, como apresentado na tabela III, podendo evidenciar que os esporos de *Bacillus clausii* são capazes de tolerar uma concentração de 0,3% de sais biliares por 4 horas.

Vecchione, et al., (2018) ao averiguar a suspensão de Enterogermina® (*Bacillus clausii*) na concentração de 0,3% de sais biliares por 6 horas, as bactérias presentes foram capazes de se replicar, com um aumento significativo em seu número a partir de 240 min (4 horas) de incubação. Já no trabalho de Jeon et al., (2017) os

esporos de *Bacillus clausii* ATCC 700160 na presença de sais biliares artificiais por 24h, os números populacionais aumentaram mais do que no controle.

Patel, Patel, Acharya (2020) avaliando esporos de *Bacillus clausii* UBBC07 exibiu 90,4%, 84,3% e 78,3% de capacidade de sobrevivência após 1h, 2h e 3h de incubação a 0,3% de sal biliar, respectivamente, ou seja, houve uma diminuição populacional com o aumento do tempo de exposição aos sais biliares, divergindo, com os resultados obtidos nesse estudo.

Hidrólise de sais biliares (BSH)

Após o crescimento em 72 horas as colônias de *B. clausii* exibiram atividade de hidrolase de sal biliar com halos precipitantes ao redor das colônias e morfologia de colônia diferenciada em placas de ágar MH suplementadas com 0,3% de sais biliares em comparação com as placas de ágar MH de controle, como observado na figura 1.

O resultado de BSH positivo é uma das características funcionais sugeridas para cepas probióticas pela FAO/WHO (2001), pois a capacidade do probiótico em produzir a enzima BSH é um dos critérios de seleção devido a capacidade de manejo da hipercolesterolemia (SALIBA et al., 2020), melhorando a viabilidade celular e aliviando a inflamação intestinal (WANG, et al., 2021).

Tais resultados também foram encontrados em pesquisas realizadas por Patel, Patel, Acharya, (2020), Patel, et al., (2021) que ao verificarem a atividade da hidrólise de sais biliares em ágar MRS suplementado com 0,5% as cepas de *B. clausii* UBBC07 ambos obtiveram resultados positivos de atividade BSH.

Teste de Hemólise

No presente estudo, o *Bacillus clausii* não apresentou atividade hemolítica (Figura 2A), sendo, portanto, considerada γ -hemolítica, dessa forma indicando a impossibilidade patogênica, diferenciando-se da cepa de *Bacillus cereus* ATCC 11778 usado como controle (Figura 2B), em que apresenta atividade hemolítica (β -hemolítica), descartando a possibilidade de ser um potencial probiótico.

Lakshmi, et al., (2017), ao verificar a segurança de *Bacillus clausii* UBBC07, Jeon, et al., (2017) de *B. clausii* ATCC 700160 e Nighat, et al., (2020) de *Bacillus clausii* KP10 ambos obtiveram os mesmos resultados verificando as atividades

hemolíticas das cepas, os mesmos também não apresentaram atividade hemolítica (γ -hemolítica).

E como a atividade hemolítica está associada à virulência de patógenos, tais resultados contribuem para a verificação de segurança das cepas de *Bacillus clausii* como probiótico, pois a atividade hemolítica é uma determinação exigida para garantir segurança, na utilização em produtos probióticos, mesmo entre um grupo de bactérias com o status de GRAS e, portanto, cepas probióticas precisam ser avaliadas quanto ao potencial hemolítico para descartar qualquer chance de hemólise sanguínea no consumo por humanos (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são compostos que podem atrasar ou inibir a oxidação de moléculas tais como lipídios, proteínas, ácido nucleico entre outras, inibindo a iniciação ou propagação de reações em cadeia de oxidação (GABER; EL-DAHY; SHALABY, 2021), nessa análise o *Bacillus clausii* apresentou uma média de 27% de eliminação do radical DPPH.

Se comparado com pesquisas realizadas relacionadas a eliminação de DPPH, do gênero *Bacillus*, Sui, et al., (2020), encontram um percentual de 35% de eliminação por *Bacillus coagulans* T242, Ragul, et al., (2020), ao averiguarem tal capacidade de *Bacillus safensis* e *Bacillus licheniformis*, observou 32,83% e 29,20%, respectivamente.

Essa característica propicia inúmeras aplicações nas indústrias farmacêutica e cosmética (YEHUI, et al., 2021), pois os consumos de antioxidantes em materiais alimentares protegem o corpo contra a ação de radicais livres, bem como os alimentos da deterioração da oxidação (FATIHA; ABDELKADER, 2019).

Teste de Adesão

A capacidade de adesão às superfícies mucosas e células epiteliais é uma característica crucial dos probióticos (Li et al., 2020), perante isso a capacidade de aderência de *Bacillus clausii* a chapa de aço inox foi de 67%, ou seja, mais da metade foram capazes de se aderir.

Por meio da mesma metodologia utilizada nesse estudo, Harnentis, et al., (2020) verificaram a capacidade de adesão de bactérias probióticas de ácido láctico

isoladas de alimentos fermentados indígenas do oeste de Sumatra, utilizando chapa de aço inoxidável, obteve a capacidade de adesão maiores que 84%, Mulaw et al., (2019), estudaram a capacidade de adesão de bactérias probióticas de bactérias de ácido láctico isoladas de alguns produtos alimentares encontrando 32,75 e 36,30% de adesão.

Produção de Exopolissacarídeos

Os EPS (Exopolissacarídeos) desempenham diferentes papéis funcionais em microrganismos, incluindo formação de biofilme, mecanismos de defesa celular para combater o estresse osmótico, estresse salino, dessecação, estresse de baixa / alta temperatura, antibióticos, anticorpos, entre outros (VINOTHKANNA, et al., 2021), neste estudo *B. clausii* produziu 67 mg/L de EPS após 72h de incubação.

Se comparado com as demais espécies de *Bacillus*, Vinothkanna, et al., (2021) ao examinar a produção de EPS de *B. licheniformis* AG-06, com o meio suplementado com 2% de sacarose, apresentou 556mg/L. Já Ravi et al., (2021) utilizou 10% de sacarose para verificação da produção de EPS por *B. aerophilus* rk1 (3,71g/L), *Bacillus tequilensis* –GM (2,9g/L), *B. mycoides* (2,78g/L), *B. megaterium* PFY-147(4,82g/L), em contrapartida Gupta et al., (2021) ao averiguar a produção de EPS por *Bacillus* sp. ISTL8 na concentração de 2% de sacarose obteve uma produção de 5,50mg/L.

Devido às suas atividades físico-químicas, reológicas e biológicas significativas, EPSs são amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, petrolífera, cosmética e médica como emulsificantes, biossurfactantes, agentes gelificantes, resinas de troca iônica, viscosificantes, biofloclulantes, estabilizantes, transportadores de drogas, entre outros (VINOTHKANNA, et al., 2021).

Atividade de β -galactosidase

Da análise para o potencial de produção de β -galactosidase utilizando o ONPG como substrato, *Bacillus clausii* apresentou a capacidade de, constatando a alteração de cor, modificando para um aspecto amarelado indicando a presença de OPN, como apresentado na figura 4, pois ONPG é um líquido incolor e após a hidrólise produz a galactose (incolor) e ONP (o-nitrofenol) que possui coloração amarela (BELYAEV, et al., 2020).

Tal propriedade é amplamente utilizada na indústria de alimentos para hidrolisar a lactose em glicose e galactose para ajudar as pessoas com intolerância à lactose no consumo de produtos lácteos (KALATHINATHAN; MUTHUKALIANNAN, 2020), pois quando há a má absorção de lactose o indivíduo apresenta vários sintomas, como distúrbios gastrointestinais, flatulência, náuseas, distensão intestinal e dor abdominal, é frequentemente referida como intolerância à lactose. (ÖZKAN; DEMIRCI; AKIN, 2021).

Prakash et al., 2020 que ao estimar a produção de β -galactosidase através de disco impregnado com ONPG de suspensões de esporos de *Bacillus clausii* (Enterogermina®), e se, levando em consideração o gênero *Bacillus*, outras pesquisas também foram capazes de identificar cepas desse gênero como produtor de β -galactosidase, como Ullah e colaboradores (2021), que ao estudar as características bioquímicas de *Bacillus filamentosus* e *Bacillus subtilis* com potencial de hidrolisar ONPG, ambos apresentaram tal capacidade. As mesmas características foram encontradas na pesquisa de Venkateswarulu et al., (2020), verificando, tal potencial em isolados de efluente da indústria de laticínios, sendo que, *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus artrophaeus*, apresentaram capacidade de hidrolisar ONPG, diferente de *Bacillus amyloliquefaciens* não apresentou essa propriedade.

Conclusão

O presente estudo indica que *Bacillus clausii* pode ser considerado um potencial agente probiótico pois os esporos foram capazes de sobreviver as condições semelhantes às do TGI sem alterações significativas nas análises. Apresentou a capacidade de hidrolisar sais biliares o que indica a possibilidade de auxiliar o manejo da hipercolesterolemia. Não apresentou potencial hemolítico, sendo considerado um probiótico seguro. Foi capaz de apresentar uma atividade antioxidante e de aderência nos percentuais de 27% e 67%, respectivamente, indicando a capacidade de eliminação de radicais livres e a capacidade de aderir a substratos como a parede intestinal. Na produção de EPS indicou a produção de 67 mg/L, além disso apresentou a capacidade de hidrolisar ONPG em ONP (o-nitrofenol), indicando a capacidade de hidrolisar a lactose em glicose e galactose, desta forma estas bactérias podem ser úteis às pessoas com intolerância à lactose possibilitando-as o consumo de produtos lácteos.

Agradecimentos

A Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela oportunidade da realização do meu mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental (CTA) pelo processo seletivo de entrada no programa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa durante o período de desenvolvimento do meu mestrado.

Referências

- AHIRE, J. J; KASHIKAR, M. S; MADEMPUDI, R. S. 2020. Survival and Germination of *Bacillus clausii* UBBC07 Spores in *in vitro* Human Gastrointestinal Tract Simulation Model and Evaluation of Clausin Production. **Frontiers in Microbiology** 11: 1010.
- ALBUQUERQUE, T. M. R. et al. 2018. In Vitro Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins** 10: 704-716.
- ASPRI, M; PAPADEMAS, P; TSALTAS, D. 2020. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. **Fermentation** 6: 30.
- BELYAEV, D. et al. 2020. Nanosensors-Assisted Quantitative Analysis of Biochemical Processes in Droplets. **Micromachines** 11: 138.
- BORICHA, A. A. et al. 2019. In vitro evaluation of probiotic properties of Lactobacillus species of food and human origin. **LWT** 106: 201-208.
- CASTRO, J. A; GUNO, M. J. V; PEREZ, M. O. 2019. *Bacillus clausii* as -adjunctive treatment for acute community-acquired diarrhea among Filipino children: a large-scale, multicenter, open-label study (Coddle). **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines** 5: 14.
- CELANDRONI, F. et al. 2019. Identification of *Bacillus* species: Implaction on the quality of probiotics formulations. **Plos one** 14: 5.
- FATIHA M, ABDELKADER T. 2019. Study of antioxidant activity of pyrimidinium betaines by DPPH radical scavenging method. **J Anal Pharm Res** 8: 2.
- GABER, N. B; EL-DAHY, S. I; SHALABY, E. A. 2021. Comparison of ABTS, DPPH, permanganate, and methylene blue assays for determining antioxidant potential of successive extracts from pomegranate and guava residues. **Biomass Conversion and Biorefinery** 10.
- GRUPTA, J. et al. 2021. Genomic insights into waste valorized extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Bacillus* sp. ISTL8. **Environmental Research** 192: 110277.
- HARNENTIS, H. et al. 2020. Novel probiotic lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented foods from West Sumatera, Indonesia. **Veterinary World** 13: 1922-1927.
- JEON, H. L. et al. 2017. Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology** 26: 1641–1648.
- KALATHINATHAN, P; MUTHUKALIANNAN, G. K. 2020. A statistical approach for enhanced production of β -galactosidase from *Paracoccus* sp. and synthesis of galacto-oligosaccharides. **Folia Microbiologica** 65: 811-822.
- KUEBUTORNYE, F. K. A; ABARIKE, E. D; LU, Y. 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology** 87: 820-828.

- LAKSHMI, S. G. *et al.* 2017. Safety assesment of *Bacillus clausii* UBBC07, a spore forming probiotic. **Toxicology Reports** 4: 62-71.
- LI, M. *et al.* 2020. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Gastrointestinal Tract of a Wild Boar as Potential Probiotics. **Frontiers in Veterinary Science** 7: 49.
- MANTZOURANI, I. *et al.* 2019. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in in vitro xperimental systems. **Annals of Microbiology** 69: 751–763.
- MAZKOUR, S. *et al.* 2021. Effects of two probiotic spores of *Bacillus* species on hematological, biochemical, and inflammatory parameters in Salmonella Typhimurium infected rats. **Scientific Reports** 10: 8035.
- MULAW, G. *et al.* 2019. In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products. **International Journal of Microbiology** 2019: 7179514.
- NAVARRA, P. *et al.* 2021. Kinetics of Intestinal Presence of Spores Following Oral Administration of *Bacillus clausii* Formulations: Three Single-Centre, Crossover, Randomised, Open-Label Studies. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 46: 375-384.
- NIGHAT, F. *et al.* 2020. Cytotoxic, α -amylase inhibitory and thrombolytic activities of organic and aqueous extracts of *Bacillus clausii* KP10. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences** 33: 135-139.
- ÖZKAN, E. R; DEMIRCI, T; AKIN, N. 2021. In vitro assessment of probiotic and virulence potential of Enterococcus faecium strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. **LWT** 141: 110908.
- PATEL, C; PATEL, P; ACHARYA, S. 2020. Therapeutic Proséctive of a Spore – Forming Probiotic – *Bacillus clausii* UBBC07 Against Acetaminophen – Induced Uremia in Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins** 12: 253-258.
- PAULA, P. L. M. *et al.* 2020. Enterococcus faecium in artisanal ripeningcheese: technological and safety aspects. **Research, Society and Development** 9: e299119452.
- PLOMER, M; PEREZ, M; GREIFENBERG, D. M. 2020. Effect of *Bacillus clausii* Capsules in Reducing Adverse Effects Associated with Helicobacter pylori Eradication Therapy: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. **Infectious Diseases and Therapy** 9: 867-878.
- PRADHAN, D; MALLAPPA, R. H; GROVER, S. 2020. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control** 108: 106872.
- PRAKASH, V. *et al.* 2020. Lactobacillus fermentum strains from rice water and lemon pickle with potential probiotic properties and wastewater treatment applications. **Research Square**.

- RAGUL, K. et al. 2020. Evaluation of functional properties of potential probiotic isolates from fermented brine pickle. **Food Chemistry** 311: 126057.
- RAVI, G. et al. 2021. Optimization and characterization of exopolysaccharide produced by *Bacillus aerophilus* rk1 and its in vitro antioxidant activities. **Journal of King Saud University – Science** 33: 101571.
- SABO, S. S. et al. 2020. Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. **Scientific Reports** 10: 7235.
- SAIF, F. A. A; SAKR, E. A. 2020. Characterization and bioactivities of exopolysaccharide produced from probiotic *Lactobacillus plantarum* 47FE and *Lactobacillus pentosus* 68FE. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre** 24: 100231.
- SALIBA, L. et al. 2021. Probiotic and safety assessment of *Lactobacillus* strains isolated from Lebanese Baladi goat milk. **International Dairy Journal** 120: 105092.
- SHARMA, A. et al. 2021. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. **Saudi Journal of Biological Sciences** 28: 1622-1632.
- SUI, L. et al. 2020. In vitro assessment of probiotic and functional properties of *Bacillus coagulans* T242. **Food Bioscience** 36: 100675.
- TOPÇU, K. C; KAYA, M; KABAN, G. 2020. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma. **LWT** 134: 110216.
- VECCHIONE, A. et al. 2018. Compositional Quality and Potential Gastrointestinal Behavior of Probiotic Products Commercialized in Italy. **Frontiers in Medicine** 5: 59.
- VENKATESWARULU, T. C. et al. 2020. Biochemical and molecular characterization of lactase producing bacterium isolated from dairy effluent. **Journal of King Saud University – Science** 32: 1581-1585.
- VINOTHKANNA, A. et al. 2021. Structural characterization, functional and biological activities of an exopolysaccharide produced by probiotic *Bacillus licheniformis* AG-06 from Indian polyherbal fermented traditional medicine. **International Journal of Biological Macromolecules** 174: 144-152.
- WANG, Guangqiang. et al. 2021. Specific bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus plantarum* AR113 and relationship with bile salt resistance. **LWT**145: 111208.
- YEHUI G. et al. 2021. Optimising the DPPH Assay for Cell-Free Marine Microorganism Supernatants. **Marine Drugs**19: 256.
- ZHU, Y. et al. 2021. Biomaterial-based encapsulated probiotics for biomedical applications: Current status and future perspectives. **Materials & Design** 210: 110018.

Legenda de Figuras

Figura 1 - Atividade da hidrólise de sais biliares (BSH) na concentração de 0,3%. A) Placa controle, sem a adição de sais biliares e a ausência de halos precipitados ao redor das colônias; B) placa suplementada com 0,3% de sais biliares e com presença de halos precipitados ao redor das colônias.

Figura 2- Teste da atividade hemolítica de *Bacillus clausii*. A) Apresentada pela placa com crescimento de cultura de *Bacillus clausii* e com ausência de atividade hemolítica. B) Representada pela placa controle, com crescimento de cultura de *Bacillus cereus* ATCC 11778 e com presença de hemólise.

Figura 3- Teste de β -galactosidase utilizando o ONPG como substrato. A) apresentado como teste positivo para hidrólise de ONPG e produção de ONP (o-nitrofenol) de cor amarelada. B) apresentada como teste controle, sem alteração de cor.

Figuras

Figura 1

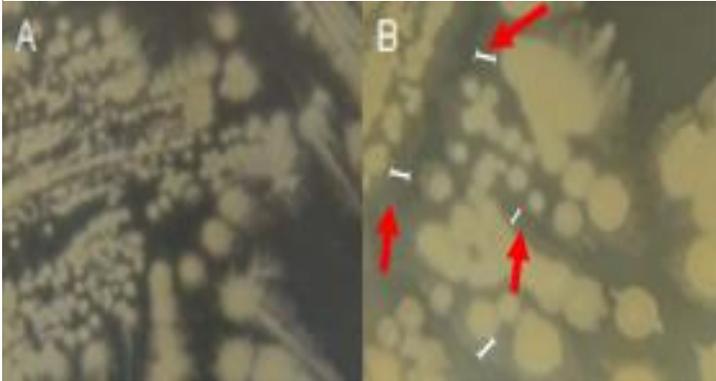


Figura 2

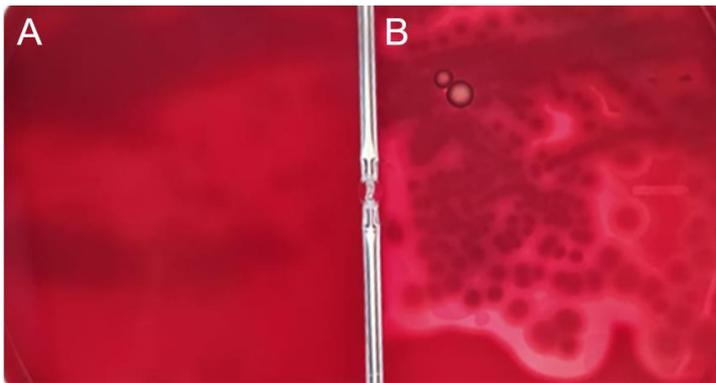
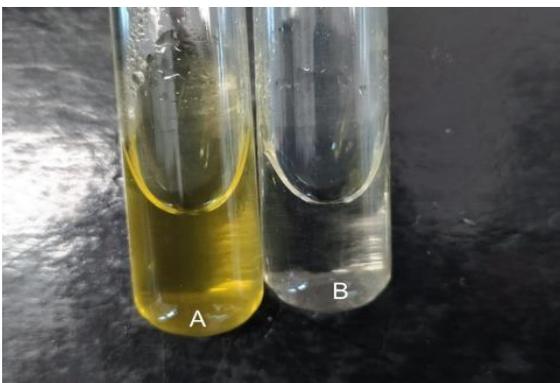


Figura 3



Tabelas

Tabela I - Contagem de *Bacillus clausii* em log de UFC/mL⁻¹ (p <0,05) após a exposição dos esporos ao pH 2 e 3, nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4h.

Horas	pH 2	pH3
0 hora	9,50 ± 0,01	9,41 ± 0,01
1 hora	9,56 ± 0,02	9,37 ± 0,02
2 horas	9,30 ± 0,01	9,58 ± 0,01
3 horas	9,38 ± 0,03	9,37 ± 0,02
4 horas	9,46 ± 0,01	9,44 ± 0,01

Tabela II - Contagem de *Bacillus clausii* em log de UFC/mL⁻¹ (p <0,05) após a exposição a pepsina nos tempos de 0, 1, 2, e 3 horas, e a pancreatina nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas.

	Pepsina	Pancreatina
0 hora	9,38 ± 0,01	9,46 ± 0,01
1 hora	9,36 ± 0,02	9,46 ± 0,01
2 horas	9,38 ± 0,03	9,42 ± 0,01
3 horas	9,44 ± 0,01	9,40 ± 0,01
4 horas	-----	9,44 ± 0,02

Tabela III – Contagem de *Bacillus clausii* em log de UFC/mL⁻¹ (p <0,05) após a exposição dos esporos 0,3% de sais biliares, nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas

Horas	Sais Biliares 0,3%
0 hora	9,40 ± 0,01
1 hora	9,43 ± 0,02
2 horas	9,68 ± 0,01
3 horas	9,47 ± 0,01
4 horas	9,44 ± 0,01