



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos

Mariana Batista Soares

**"Avaliação da sobrevivência de esporos de *Bacillus spp.*
probióticos em matrizes alimentares e seus efeitos à saúde"**

Campinas-SP

2017

Mariana Batista Soares

“Avaliação da sobrevivência de esporos de *Bacillus spp.* probióticos em matrizes alimentares e seus efeitos à saúde”

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Orientador: **Prof. Dr. Anderson de Souza Sant’Ana.**

Co-orientador: **Dr. Rafael Chacon Ruiz Martinez.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO MARIANA BATISTA SOARES E ORIENTADO PELO PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT’ANA

Campinas-SP

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/21544-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

So11a Soares, Mariana Batista, 1987-
Avaliação da sobrevivência de esporos de *Bacillus* sp. probióticos em matrizes alimentares e seus efeitos à saúde / Mariana Batista Soares. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Coorientador: Rafael Chacon Ruiz Martinez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Probióticos. 2. Trato gastrointestinal. 3. Requeijão cremoso. 4. Modelagem preditiva. 5. Esporos. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Martinez, Rafael Chacon Ruiz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the survival *Bacillus* sp. spores in food matrices and their effects on health

Palavras-chave em inglês:

Probiotics

Gastrointestinal tract

Requeijão cremoso

Predictive modeling

Spores

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Adriano Gomes da Cruz

Eliene Penha Rodrigues Pereira

Matheus de Souza Barbosa

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Data de defesa: 11-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana
Universidade Estadual de Campinas – FEA/UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz
Instituto Federal do Rio de Janeiro
Membro Titular

Prof. Dr. Matheus de Souza Barbosa
Faculdade de Tecnologia de Diadema
Membro Titular

Dra. Patricia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá
Instituto de Tecnologia de Alimentos/TECNOLAT
Membro Titular

Dra. Eliene Penha Rodrigues Pereira
Pós-Doc Universidade Federal Fluminense
Membro Titular

A ATA da defesa, com as respectivas assinaturas dos membros, encontram-se no processo de vida acadêmica do aluno

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a **Maurício Saraiva**, amor da minha vida, por acreditar em mim e ter sido o meu maior incentivador e companheiro, além dos seus grandes ensinamentos e paciência em toda essa jornada. Esse sonho nunca teria sido realizado sem você ao meu lado. Amo você.*

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, minha base e força em todas as minhas caminhadas, por essa oportunidade, que dentre tantas pessoas fui escolhida..

A minha família: meu pai Silvestre, minha mãe Glailde, meu irmão Filipe, meus avós, tias, tios e primos, que são razão da minha existência, que sempre torceu por mim e nunca mediu esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Ao meu marido, Maurício Saraiva, por todo cuidado, incentivo e amor. E ao meu filho dog Trip, que sempre foi alegria em dias difíceis. Obrigada por vocês me ensinarem a amar.

A Campinas que me proporcionou um crescimento pessoal inagualável e me apresentou pessoas incríveis.

Ao professor e orientador Anderson de Souza Sant'Ana por ter me conduzido na área acadêmica e confiado a mim um trabalho tão bonito, em uma das melhores universidades do país. Obrigada pelos ensinamentos!

Ao meu co-orientador e amigo Rafael Chacon Ruiz Martinez que sempre esteve de prontidão para me ensinar e alimentar a paixão pelo mundo dos probióticos, além de ter sido meu companheiro nas idas e vindas ao supermercado e na vida campineira.

Aos membros da banca por dispor do seu tempo para correção, colaboração e sugestões para o meu trabalho.

Ao Departamento de Ciência de Alimentos por me proporcionar a pesquisa.

A FAPESP pelo apoio financeiro à minha pesquisa.

Ao Prof. Jaime Farfan, Pablo Lollo, Carol Moura, Priscila Morato e Adriano Cruz pela colaboração e disponibilidade em me ajudar na pesquisa, sempre que precisei e ceder espaço nos seus laboratórios para realização de parte do meu trabalho.

A Suzana, por ter compartilhado comigo momentos de amizade e por ter me ensinado a cuidar tão bem dos meus ratinhos. Seu bom astral contagia!

A professora e amiga Lilian Pantoja que me apresentou o fantástico mundo acadêmico e a pesquisa, que despertou minha curiosidade de sempre saber mais. Você é minha mãe científica e serei sempre grata.

A todos os meus amigos e sempre colegas do LabVin – Diamantina/MG que sempre acreditaram e torceram pelo meu sucesso.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos (LMQA): Ligia, Damares, Evélin, Marianna, Ramon, Monyca, Carine, Carol Almada, Bruna, Leo, Tarcísio, Olavo, Fernanda, Rodrigo, Amin, Grazi, Marcelo, Letícia, Lucas, Isadora, Juliana, Libia, que

estiveram junto a mim nessa jornada, que sabemos que não é fácil, mas que vale a pena. Obrigada pelos momentos e conhecimentos compartilhados. O saber é uma dádiva e une as pessoas!

À Verônica e Rafael Chaves pelas longas conversas sobre microbiologia e ensinamentos.

Ao Allan Munford, meu amigo irmão de outras vidas, que ganhei em Campinas, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando, compartilhando erros e acertos dentro e fora do laboratório, sem medir esforços para me ajudar sempre.

À Juliana Lane, minha grande amiga, que desde a fila de aprovação para a pós graduação foi disponível, amorosa e meu braço direito.

À amiga Yanet Magdevis, pela nossa cumplicidade e amizade verdadeira, que me mostra todo dia o que é resiliência. Eu admiro muito você! Obrigada por tudo!

À Carol Rezende, pela amizade, conversas e por deixar eu participar da sua vida. Você é um grande presente que essa pós me deu.

À amiga Beatriz Severino por ter me socorrido em tantas horas de sufoco de análises, cuidar de mim e me receber sempre em sua casa com a maior alegria do mundo.

À Ana Paula Maciel por ter sido minha companheira de viradas de noite, de saídas pós laboratório para relaxar, conversas sem fim e por sempre me apoiar. Obrigada amiga por deixar Minas um pouco mais pertim de mim!

Ao meu amigo Humberto Hungaro, que foi luz no meu caminho dentro da Microbiologia de Alimentos e nas discussões do meu trabalho.

À Larissa Margalho, meu mascotinho que tanto amo, pela oportunidade de ter alguém tão humano e humilde como você na minha vida. Você me ensinou tanto pretinha!

Ao Arthur, esse garoto que tem nos olhos e na fala o encanto pela ciência, obrigada por todo apoio durante meu trabalho prático.

Aos meus amigos longe ou perto que compreenderam a minha ausência, e sempre torceram para que esse sonho se realizasse.

Aos amigos e colegas de trabalho de Itajubá: Rafael Ribeiro, Erika Visoto, Mariane Pereira, Ana Menicali, Shirley Alves, Daniela Renó, Priscila Nazareth, Gabrielle Avelar, Vanessa Souza, Wanessa Werner que cuidaram da minha saúde física e mental durante esse período e torceram pelo término desse ciclo.

À minha coach e cumade Bianca Mingatto que me ajudou no final desse processo e fez eu descobrir que sou mais forte do que pensava. Obrigada amiga!

Aos meus pacientes que torceram por minha evolução profissional e acompanharam a minha busca incessante pelo conhecimento. Obrigada pela compreensão das desmarcações de consulta ou imprevistos para que esse trabalho fosse concluído.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE ESPOROS DE *BACILLUS SPP.* PROBIÓTICOS EM MATRIZES ALIMENTARES E SEUS EFEITOS À SAÚDE.

O emprego de esporos probióticos de *Bacillus* é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos alimentos probióticos, visto que micro-organismos probióticos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* possuem baixa resistência a etapas do processamento de alimentos que são mais agressivos. Apesar disso, em nosso conhecimento não existem estudos sobre a aplicação de micro-organismos esporulados probióticos em alimentos no Brasil. O uso de matrizes alimentícias como carreadoras de probióticos são importantes, visto que seu consumo além de fornecer nutrientes, podem ser veículos para micro-organismos benéficos à saúde. O requeijão cremoso é um produto tipicamente brasileiro e de alto consumo, o que faz dele uma matriz promissora para inoculação de bactérias probióticas a fim de possibilitar ingestão contínua, propiciando maior viabilidade do probiótico e promover saúde. Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de esporos probióticos em matrizes alimentícias (requeijão cremoso, suco de laranja e pão caseiro), no seu processamento e estocagem, e frente às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI), assim como avaliar parâmetros de saúde de ratos Wistar alimentados com requeijão cremoso adicionado de esporos de *Bacillus* probiótico. Além disso, fez-se uso da modelagem preditiva visando o entendimento da cinética de inativação de micro-organismos probióticos em condições simuladas dos fluidos gastrointestinais (estática e dinâmica). Os esporos probióticos de *Bacillus* apresentaram elevada sobrevivência (acima de 80%) quando comparadas às bactérias ácido lácticas (BAL) probióticas, expostos as condições do TGI ao final da vida de prateleira dos alimentos testados, obtendo contagens acima de 6 log UFC/g ou mL do produto. A adição dos esporos de *Bacillus* probióticos na etapa de fusão do requeijão cremoso (90°/5 min) mostrou-se a mais apropriada, facilitando o processo tecnológico, mantendo boa viabilidade das cepas probióticas e evitando a recontaminação do produto final. Durante o processamento do requeijão cremoso, esporos probióticos de *B. coagulans* GBI-30 6086 apresentaram melhor sobrevivência durante todas as etapas do processamento do requeijão cremoso, exibindo populações acima de 6 log esporos/g ao longo da vida de prateleira do produto (45 dias a 6°C). O consumo dessa matriz probiótica, por ratos saudáveis, não afetou a homeostase metabólica dos animais estudados, sem alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e moleculares (estresse e antioxidante), indicando que esporos probióticos em estudo são seguros. Os dados das contagens das populações de micro-organismos probióticos expostos às diferentes valores de pH nas condições gástricas simuladas foram modulados em um modelo cinético de inativação log linear com cauda. Os esporos dos *Bacillus* probióticos mantiveram-se estáveis durante toda a digestão, mostrando uma boa resistência às soluções do trato gastrointestinal, não gerando modelo matemático. A avaliação dos parâmetros de inativação para *L. paracasei* PXN 37 foi significativo em pH 1 ($R^2 > 0,90$), onde apresentou contagens de células viáveis baixas (aproximadamente 1 ciclo log UFC/g ou mL), no suco de laranja e no requeijão cremoso. Dessa maneira, o emprego de esporos probióticos de *Bacillus spp.* inoculados em alimentos deve ser mais explorado, possibilitando a indústria alimentícia elaborar diferentes matrizes alimentares com atributos funcionais, alcançando maior parcela da população e propiciando saúde de forma preventiva e natural.

Palavras chaves: probióticos esporulados, trato gastrointestinal, requeijão cremoso, modelagem preditiva, *Bacillus* probióticos, viabilidade.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE SURVIVAL *BACILLUS SPP.* SPORES IN FOOD MATRICES AND THEIR EFFECTS ON HEALTH.

The use of *Bacillus* spores probiotic is a promising alternative for the development of novel probiotic foods, since probiotic microorganisms of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* have low resistance to food processing steps that are more aggressive. Despite this, in our knowledge there are no studies on the application of probiotic sporeforming microorganisms in foods in Brazil. The use of food matrices as probiotic carriers is important, since their consumption in addition to providing nutrients, can be vehicles of microorganisms beneficial to health. The spreadable processed cheese (requeijão cremoso) is a typical Brazilian product with a high consumption, which makes it a promising matrix for the inoculation of probiotic bacteria in order to allow continuous ingestion, providing greater viability and promoting health. The objective of this study was to evaluate the behavior of these microorganisms in food matrices (spreadable processed cheese, orange juice and homemade bread), in their processing and storage, and against the simulated gastrointestinal tract (TGI) conditions, as well as to evaluate health parameters in Wistar rats fed with spreadable processed cheese added with probiotic *Bacillus* spores. In addition, predictive modeling was used to understand the kinetics of inactivation of probiotic microorganisms under simulated conditions of gastrointestinal (static and dynamic) fluids. *Bacillus* probiotic spores showed a high percentage of survival (over 80%) when compared to probiotic lactic acid bacteria (BAL), exposed to TGI conditions at the end of the shelf life of the tested foods, being above 6 log CFU/g or ml of the product. The addition of the probiotic *Bacillus* spores in the cream cheese (90°/5 min) fusion stage proved to be the most appropriate, facilitating the technological process, maintaining good viability of the probiotic strains and avoiding the recontamination of the final product. During processing of the spreadable processed cheese, probiotic spores of *B. coagulans* GBI-30 6086 showed better survival during all stages of spreadable processed cheese processing, exhibiting populations above 6 log spores/g over the shelf life of the product (45 days at 6°C). The consumption of this probiotic matrix by healthy rats did not affect the metabolic homeostasis of the studied animals, without alterations in hematological, biochemical and molecular parameters (stress and antioxidant), indicating that probiotic spores are safe. Data from the counts of populations of probiotic microorganisms exposed to different pH values in the simulated gastric conditions were modulated in a log linear inactivation kinetic model with tail. *Bacillus* spores probiotics remained stable throughout the digestion, showing good resistance to gastrointestinal tract solutions, not generating a mathematical model. The evaluation of the inactivation parameters for *L. paracasei* PXN 37 was significant at pH 1 ($R^2 > 0.90$), where it presented low viable cell counts (approximately 1 log cycle CFU/g or mL), orange juice and spreadable processed cheese. Thus, the use of *Bacillus spp.* spores probiotics inoculated in food should be further explored, allowing the food industry to elaborate different food matrices with functional attributes, reaching a larger portion of the population and providing health in a preventive and natural way.

Key words: sporeforming probiotics, gastrointestinal tract, creamy curd cheese, *Bacillus* probiotic, predictive modeling, viability.

SUMÁRIO

Introdução geral	13
Capítulo 1: Revisão bibliográfica: Bactérias probióticas esporuladas: características, benefícios para a saúde e implicações tecnológicas de suas aplicações em alimentos e bebidas	16
Resumo	18
1. Introdução	19
2. O esporo bacteriano – estrutura de resistência física e química	22
3. Bactérias esporuladas como micro-organismos probióticos	23
3.1. Bacillus	23
3.2. Sporolactobacillus	27
3.3. Brevibacillus	27
4. Avaliação do potencial probiótico e segurança de cepas esporuladas	28
5. Forma de apresentação dos probióticos esporulados.....	28
5.1. Probióticos Esporulados como Medicamento Biológicos	37
5.2. Probióticos Esporulados em Ração Animal	42
5.3. Probióticos Esporulados em Alimentos destinado ao consumo humano	44
6. Aspectos tecnológicos da aplicação dos probióticos esporulados em alimentos	45
6.1. Produtos lácteos	47
6.2. Produtos cárneos	48
6.3. Produtos de origem vegetal	49
6.4. Alimentos com baixa atividade de água	49
7. Efeitos benéficos à saúde dos probióticos esporulados	50
8. Conclusões	56
9. Referências Bibliográficas	55
Capítulo 2: Resistência de cepas probióticas dos gêneros Bacillus, Bifidobacterium e Lactobacillus em diferentes matrizes alimentícias submetidas às condições simuladas do trato gastrintestinal	71
Resumo	73
1. Introdução	74
2. Material e métodos	76
2.1. Micro-organismos e preparo dos inóculos	76
2.2. Preparo das matrizes alimentícias	76
2.2.1. Requeijão cremoso	76
2.2.2. Suco de laranja	78
2.2.3. Pão caseiro	78
2.3. Avaliação da viabilidade das cepas probióticas em diferentes matrizes alimentícias ao longo da vida de prateleira	79
2.4. Determinação da viabilidade dos micro-organismos probióticos em diferentes matrizes alimentícias expostos aos fluidos simulados do TGI	79
2.5. Enumeração dos micro-organismos probióticos	80
2.6. Análise estatística	80
3. Resultados e Discussão	82
3.1. Viabilidade das cepas probióticas ao longo da vida de prateleira	82
3.1.1. Viabilidade na vida de prateleira do requeijão cremoso	84
3.1.2. Viabilidade na vida de prateleira do suco de laranja	85
3.1.3. Viabilidade na vida de prateleira do pão caseiro	86

3.2. Viabilidade de micro-organismos probióticos submetidos aos fluidos simulados do TGI	87
3.2.1. Viabilidade das cepas probióticas em requeijão cremoso expostas à digestão simulada	90
3.2.2. Viabilidade das cepas probióticas em suco de laranja expostas à digestão simulada	94
3.2.3. Viabilidade das cepas probióticas em pão caseiro expostas à digestão simulada	98
4. Conclusão	101
5. Referências Bibliográficas.....	102
Capítulo 3: Comportamento de diferentes cepas de Bacillus probiótico ao longo do processamento e armazenamento de requeijão cremoso	107
Resumo	109
1. Introdução	110
2. Material e métodos	111
2.1. Processamento do requeijão cremoso	111
2.1.1. Matérias-primas	111
2.1.2. Elaboração da matriz probiótica	112
2.2. Cepas probióticas.....	112
2.3. Inoculação das cepas probióticas de Bacillus em diferentes etapas do processamento do requeijão	113
2.3.1. Amostragem de Bacillus probióticos em diferentes etapas do processamento do requeijão	114
2.4. Avaliação do comportamento de esporos de Bacillus probióticos durante a vida de prateleira do requeijão cremoso	114
2.5. Enumeração dos esporos de Bacillus probióticos	115
2.6. Análise química	116
2.6.1. Composição centesimal	116
2.6.2. Proteólise	117
2.6.3. Perfil de ácidos graxos	117
2.7. Análises estatísticas.....	118
3. Resultados e discussão.....	118
3.1. Comportamento de esporos de Bacillus probióticos em diferentes etapas do processamento do requeijão	119
3.1.1. Pasteurização	120
3.1.2. Coagulação	123
3.1.3. Fusão	125
3.2. Avaliação do comportamento de esporos de Bacillus probióticos durante a vida de prateleira do requeijão cremoso	127
4. Conclusão	138
5. Referências Bibliográficas	138
Capítulo 4: Avaliação da expressão de proteínas antiestresse (HSPs) e de parâmetros de saúde de ratos alimentados com requeijão cremoso com esporos de Bacillus probióticos.....	144
Resumo	146
1. Introdução	147
2. Material e métodos	149
2.1. Cepa probiótica	149
2.2. Enumeração de B. Coagulans GBI-30 6086	149
2.3. Animais e Procedimentos Experimentais	150
2.4. Ração comercial e Dieta experimental.....	151

2.5. Acompanhamento do ganho de peso e consumo de ração comercial	152
2.6. Parâmetros bioquímicos	152
2.7. Parâmetros hematológicos	152
2.8. Extração de proteínas e imunotransferência	152
2.9. Análise estatística	153
3. Resultados e Discussão	153
4. Conclusão	164
5. Referências Bibliográficas	165
Capítulo 5: Avaliação do comportamento de micro-organismos probióticos em condições simuladas do trato gastrointestinal usando modelos preditivos	169
Resumo.....	171
1. Introdução.....	172
2. Material e métodos.....	174
2.1. Cepas probióticas	174
2.2. Matrizes probióticas	174
2.3. Preparo das soluções simuladas do TGI	176
2.4. Enumeração das cepas probióticas	176
2.5. Modelagem matemática em sistema estático do TGI	177
2.5.1. Estimativa dos parâmetros de inativação dos micro-organismos probióticos no sistema estático do TGI	177
2.5.2. Modelo matemático primário	178
2.5.3. Validação dos experimentos nas condições estáticas	179
2.5.4. Modelo matemático secundário	179
2.6. Modelagem matemática em sistema dinâmico do TGI	180
2.6.1. Micro-organismos probióticos	180
2.6.2. Simulador do trato gastrointestinal	180
2.6.3. Modelagem matemática e validação nas condições dinâmicos do TGI..	182
2.7. Análises estatísticas.....	182
3. Resultados e Discussão	183
3.1. Viabilidade das cepas probióticas nas matrizes	183
3.2. Comportamento dos esporos probióticos de <i>B. coagulans</i> GBI-30 6086 e <i>B. coagulans</i> MTCC 5856 durante o processo simulado de digestão estática	184
3.3. Comportamento de <i>L. paracasei</i> PXN 37 durante o processo simulado de digestão estática	187
3.4. Validação no sistema simulado do TGI estático	192
3.5. Modelagem preditiva no sistema simulado do TGI dinâmico	193
3.5.1. Viabilidade da cepa probiótica no sistema dinâmico	193
4. Conclusão	196
5. Referências Bibliográficas	197
Discussão geral.....	201
Conclusão geral.....	206
Referências Gerais	207
Apêndices	211
Anexos	213

INTRODUÇÃO GERAL

Os probióticos são definidos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill et al., 2014). Portanto, os probióticos são micro-organismos não patogênicos veiculados através de alimentos ou comercializados como sachês ou comprimidos como culturas puras ou mistas para consumo direto aos humanos (Makinen, Berger, Bel-Rhliid, & Ananta, 2012; Okamoto et al., 2012). Na literatura científica, populações de 10^6 - 10^8 UFC/g de micro-organismos probióticos nos alimentos no momento do consumo têm sido reportadas como quantidades adequadas para obtenção de efeitos benéficos a saúde humana (Gomes da Cruz, Alonso Buriti, Batista de Souza, Fonseca Faria, & Isay Saad, 2009; Salminen et al., 1998). A legislação brasileira permite que os estudos apontem a quantidade diária de células viáveis no produto pronto para consumo que seja suficiente para alcançar os benefícios à saúde, apresentando laudos de análises e estudos clínicos que comprove essa informação (ANVISA, 2016). Considerando-se o exposto anteriormente, para se alcançar os benefícios à saúde, o micro-organismo probiótico deve se manter viável desde o processamento até sua ingestão através do consumo contínuo dos mesmos. Além disso, também é necessário que os micro-organismos probióticos sobrevivam às condições do trato gastrointestinal (TGI) (Collado & Sanz, 2006).

Diversos gêneros e espécies de micro-organismos probióticos têm sido tradicionalmente utilizados na alimentação humana e também veiculados em alimentos produzidos pelas indústrias alimentícias, visando a obtenção de benefícios diversos. Dentre os micro-organismos mais relevantes, destacam-se as bactérias lácticas (BAL), como aquelas pertencentes aos gêneros, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (Nithya & Halami, 2012), uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (Marta & Saad, 2006) e possuem um longo histórico de uso seguro e evidências que suportam seus efeitos positivos (Van Dender, 2008).

Apesar de sua ampla aplicação em alimentos processados, os probióticos, especificamente as BAL, podem sofrer injúrias ou perda de viabilidade devido às condições adversas ou sub-ótimas encontradas em certos alimentos como queijos processados, cereais, produtos fermentados, bebidas, biscoitos, entre outros, cujos processos representam, atualmente, um desafio para a sobrevivência dos probióticos tradicionais, (Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2013).

Dessa maneira, uma alternativa promissora para sobrepor tais limitações é a aplicação de culturas probióticas esporuladas. Dentre os micro-organismos probióticos esporulados mais

usualmente empregados na alimentação humana ou animal, destacam-se aqueles pertencentes aos dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* e *Brevibacillus* (Hong, Duc, & Cutting, 2005). A maior resistência dos esporos microbianos a altas temperaturas, menor pH, maior pressão, boa estabilidade e rápida germinação são propriedades extremamente desejáveis para a formulação inovadora de diversos alimentos probióticos (Durkee, 2010; Foligné et al., 2012; Nithya, Muthukumar, & Halami, 2012; Permpoonpattana et al., 2012; Vieira, 2010). Além desses aspectos, o uso desses micro-organismos na produção de alimentos poderá desmitificar a idéia de que são apenas patogênicos ou deterioradores de alimentos (Abriouel, Franz, Ben Omar, & Gálvez, 2011; Permpoonpattana et al., 2012).

Em virtude do aumento da procura por alimentos mais saudáveis e atrativos, o consumidor tem exigido uma diversidade de produtos inovadores no mercado, com novos ingredientes, sabores e mais benéficos à saúde, principalmente quando se considera os alimentos funcionais. A aplicação de cepas probióticas de *Bacillus*, principal gênero de cepas esporuladas estudada em alimentos (Duc et al., 2004; Jafari et al., 2017; Sanders et al., 2003; Surokulova, 2013) pode ser uma alternativa viável para se possibilitar o desenvolvimento de alimentos probióticos que atendam às necessidades do consumidor, de maneira viável e segura. No contexto da alimentação humana, o estudo da aplicação de micro-organismos probióticos esporulados em alimentos ainda é recente e, portanto, incipiente, apresentando escassos estudos a aplicação de micro-organismos esporulados probióticos em alimentos (Jafari et al., 2017, Surokulova, 2013). Assim, uma série de informações como o comportamento destes micro-organismos em matrizes alimentícias, a influência desta matriz na sobrevivência e comportamento destes micro-organismos em condições simuladas às dos fluídos gastrointestinais e seus efeitos potencialmente benéficos à saúde ainda não foram completamente elucidados. O requeijão cremoso como matriz alimentar principal estudada nesse trabalho é um tipo de queijo brasileiro de alto consumo pela população. O mesmo como matriz probiótica possibilita a ingestão constante do microrganismo benéfico, além de ser um ótimo carreador e ajudar a proteger bactérias probióticas das condições adversas do TGI, aumentando sua viabilidade e oferece nutrientes para sua multiplicação e colonização, promovendo seus efeitos benéficos.

A microbiologia preditiva baseia-se na premissa de que as respostas das populações de micro-organismos a fatores ambientais são reprodutíveis e que é possível, a partir de observações anteriores, prever respostas em um ambiente particular através da utilização de equações matemáticas que permitem prever as respostas dos micro-organismos em condições similares (Zwietering et al., 1991; McMeekin et al., 2002; McMeekin et al., 2008). A sua

aplicação na área de probióticos é ainda pouco explorada, porém de grande valia ao proporcionar informações sobre o comportamento desses micro-organismos em matrizes alimentícias, podendo economizar tempo e custos de ensaios *in vitro*, ajustar doses e avaliar a aplicação das melhores cepas em determinado alimento.

Esta tese teve como objetivo geral avaliar o comportamento de diferentes tipos de micro-organismos probióticos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacillus*) adicionados a diferentes matrizes alimentícias submetidas a condições simuladas de fluidos gastrointestinais *in vitro* e avaliar os benefícios à saúde *in vivo* associados ao consumo de requeijão cremoso adicionado de *Bacillus* probióticos. Além disso, o presente estudo aborda, pioneiramente, o uso da modelagem preditiva para a elucidação da cinética de inativação e/ou sobrevivência de micro-organismos probióticos em condições simuladas dos fluidos gastrointestinais. Tal abordagem fornece informações extremamente relevantes para o desenvolvimento e aplicação de micro-organismos probióticos em diferentes matrizes alimentícias.

Para concretização do objetivo geral, foram considerados nesta pesquisa, os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Selecionar cepas resistentes de *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em diferentes matrizes alimentícias e determinar sua viabilidade em condições simuladas do TGI estática.
- ❖ Avaliar o comportamento de *Bacillus* probiótico durante etapas do processamento (pasteurização, coagulação e fusão) e estocagem do requeijão cremoso nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 45 dias.
- ❖ Avaliar a sobrevivência das cepas resistentes de *Bacillus* e *Lactobacillus* em diferentes matrizes alimentícias em condições simuladas do TGI estático e dinâmica.
- ❖ Avaliar os efeitos benéficos à saúde associados ao consumo de requeijão cremoso adicionado de *Bacillus* probiótico utilizando-se ratos machos da linhagem Wistar, sobretudo em parâmetros bioquímicos, hematológicos e moleculares (proteínas do sistema de estresse e antioxidante).
- ❖ Aplicação de modelo matemático para determinar a sobrevivência de micro-organismos probióticos (*Bacillus* e *Lactobacillus*) em condições simuladas do TGI estático e dinâmico em diferentes matrizes alimentícias (requeijão, pão e suco de laranja) em função do pH e tempo de exposição.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

**Bactérias probióticas esporuladas: características,
benefícios para a saúde e implicações tecnológicas de suas
aplicações em alimentos e bebidas**

Bactérias probióticas esporuladas: características, benefícios para a saúde e implicações tecnológicas de suas aplicações em alimentos e bebidas

Mariana B. Soares^a, Carine Almada^a, Hugo L. A. Silva^b Adriano G. da Cruz^{bc}, Rafael C. R. Martinez, Anderson de Souza Sant'Ana^{a*}

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, Brasil.

^bDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

^cInstituto Federal Fluminense, Campos dos Goitacazes, RJ, Brasil.

.

*Autor correspondente: Prof. A. S. Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brasil. Contato: +55(19) 3521-2174.

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista “*Food Research International*”

Resumo

A maior resistência dos esporos microbianos a altas temperaturas, baixos valores de pH e elevadas pressões, aliada a características como boa estabilidade e rápida germinação fazem como que seu uso seja extremamente desejável para a formulação inovadora de diversos alimentos probióticos, principalmente devido às limitações tecnológicas inerentes às bactérias lácticas (BAL). Os esporos probióticos são resistentes a várias operações unitárias empregadas nas indústrias de alimentos, apresentando, conseqüentemente, elevada viabilidade e garantindo a funcionalidade de alimentos probióticos; além disso, são capazes de manter tais características durante toda a vida de prateleira desses produtos armazenados em temperatura ambiente ou sob refrigeração. Apesar de seu potencial para aplicação como probióticos, os esporos de *Bacillus* spp. são de difícil controle no processamento de alimentos, podendo germinar e deteriorar o alimento antes que eles possam ser ingeridos e promover benefícios à saúde do consumidor. No entanto, ainda se discute o consumo desses micro-organismos em relação à segurança dos alimentos e à saúde dos consumidores, assim como a eficiência das doses a serem utilizadas, uma vez que não são habitantes normais do trato gastrointestinal (TGI). Os probióticos esporulados podem ser encontrados em diferentes formas farmacêuticas (sachês, cápsulas, tabletes, comprimidos, suspensões líquidas) e utilizados nas áreas médica e veterinária, veiculados como suplementos alimentares e mais recentemente empregados na indústria de alimentos. Os reais benefícios à saúde advindos do consumo de probióticos esporulados devem ser intensamente estudados, avaliando seu comportamento no TGI e em outros sítios anatômicos, determinando-se os mecanismos de ação envolvidos e correlacionando-os com os principais efeitos benéficos à saúde. Neste artigo, é apresentada uma revisão das principais características, implicações tecnológicas, formas de consumo e benefícios à saúde de esporos de *Bacillus* potencialmente probióticos.

Palavras chaves: *Bacillus*, resistência microbiana, esporos probióticos, condições simuladas do TGI.

1. Introdução

Os probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequadas, conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001; Hill et al., 2014). Os probióticos podem estar disponíveis em culturas puras ou mistas, serem aplicados diretamente aos alimentos ou serem consumidos como suplementos (Makinen et al., 2012; Okamoto et al., 2012).

As populações de micro-organismos probióticos nos alimentos no momento de seu consumo devem ter concentrações suficientes para que os efeitos benéficos sejam observados, o que deve ser reportado em laudos de análises e estudos epidemiológicos, como rege legislação brasileira (ANVISA, 2016). Anteriormente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e estudos da área de probióticos utilizavam a padronização de concentrações de 10^6 – 10^7 UFC/grama do produto pronto para caracterizá-los com potencial probiótico e promover efeitos positivos à saúde (ANVISA, 2008; Cruz et al., 2009; Martinez, Bedani, & Saad, 2015).

Partindo-se da premissa apresentada acima, torna-se patente a necessidade de manutenção da viabilidade e da atividade metabólica de micro-organismos probióticos desde o processamento do alimento até sua ingestão pelos consumidores (Homayoni Rad et al., 2012; Salminen et al., 1998; Saxelin, Korpela, & Mayra-Makinen, 2003), bem como durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) (Hill et al., 2014; Sanz, 2007).

Diversos micro-organismos vêm sendo aplicados como probióticos em matrizes diversas, alimentícias ou não. Podemos dividir estes grupos microbianos em: 1) bactérias produtoras de ácido láctico: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*; 2) bactérias produtoras de ácido não láctico: *Propionibacterium*; 3) micro-organismos eucarióticos não patogênicos (leveduras): *Saccharomyces*; 4) bactérias esporuladas: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* e *Brevibacillus* (Homayoni Rad et al., 2012).

As primeiras cepas probióticas descobertas pertenciam ao grupo de bactérias lácticas (BAL) (Ballus, Klajn, Cunha, de Oliveira, & Fiorentini, 2010; Heller, 2001). Cepas probióticas destes micro-organismos têm sido aplicadas na produção de alimentos probióticos, principalmente laticínios, incluindo leites fermentados, iogurtes, queijos e sobremesas com base lácteas (Casarotti & Penna, 2015; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010; Soccol et al., 2010). Este setor concentra a maior porcentagem de aplicações de probióticos, pois existe uma grande familiarização do consumidor com os leites fermentados, os quais reconhecem-nos como produtos benéficos à saúde por conterem micro-organismos vivos. Outra razão, é a possibilidade da veiculação destes micro-organismos em alimentos fermentados para a

promoção de melhorias das características sensoriais dos produtos, como sabor, aroma e textura (Chr-hansen, 2017; Felicio et al., 2016). Assim, os probióticos não são apenas importantes na indústria de laticínios para o desenvolvimento de alimentos funcionais, mas também para utilização como coadjuvantes de processos tecnológicos.

Apesar de sua ampla aplicação em alimentos processados, os probióticos, especificamente as cepas de BAL, podem sofrer injúrias ou perda de viabilidade devido às condições adversas ou sub-ótimas encontradas no processamento de certos alimentos ou devido às características intrínsecas dos mesmos. Por exemplo, mesmo sendo mais resistentes ao pH ácido que outras bactérias, as BAL probióticas exibem redução de sua viabilidade durante a vida de prateleira, quando adicionadas a alimentos ácidos, como sucos de frutas (Santos et al., 2008; Saarela et al., 2011). O congelamento ou a variação de temperatura durante o armazenamento de alimentos probióticos causa danos às células microbianas, devido à formação de cristais de gelo, os quais rompem a membrana citoplasmática, reduzindo a viabilidade desses micro-organismos (Davidson, Ducan, Hackney, Eigel, & Boling, 2000; Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2013). Além disso, sabe-se que durante o período de armazenamento a permeabilidade de embalagens ao oxigênio leva à redução das taxas de viabilidade dos probióticos veiculados em alimentos (Cruz et al., 2013). Isso é crítico para o desenvolvimento de alimentos probióticos, já que muitas cepas destes micro-organismos são anaeróbias ou microaeróbias (Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2013). Além desses aspectos, as BAL probióticas são, notoriamente, termossensíveis. Por exemplo, a cepa *Lactobacillus salivarius* UCC 118 apresenta um tempo de redução decimal de 1,1 minuto a 59°C ($D_{59^{\circ}\text{C}}=1,1\text{min}$) (Gardiner et al., 2000), o que inviabiliza a sua aplicação em alimentos já embalados e posteriormente submetidos a tratamentos térmicos. A alternativa de aplicação de probióticos após a etapa de pasteurização apresenta enorme limitação e encontra grande resistência por parte das indústrias de alimentos, seja pela possibilidade de recontaminação do alimento pós-tratamento térmico, seja por dificuldades técnicas para sua realização. Outros métodos de conservação, como irradiação e alta pressão, também podem resultar em perda de viabilidade de BAL probióticas e, portanto, limitam sua aplicação em uma ampla gama de produtos alimentícios (Maiken et al., 2012).

Assim, uma alternativa promissora para superar tais limitações é a aplicação de culturas probióticas esporuladas. Dentre os micro-organismos probióticos esporulados mais comumente utilizados na alimentação humana ou animal, destacam-se aqueles pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* e *Brevibacillus* (Hong et al., 2005). A maior resistência dos esporos microbianos a altas temperaturas, baixos valores de pH e elevadas

pressões, aliada às características como, boa estabilidade e rápida germinação, fazem com que seu uso seja extremamente desejável para a formulação inovadora de diversos alimentos probióticos (Durkee, 2010; Foligné et al., 2012; Nithya, Muthukumar, & Halami, 2012; Permponpattana, Hong, Khaneja, & Cutting, 2012; Vieira, 2010).

Em contrapartida, diversas técnicas têm sido utilizadas nos últimos anos para aumentar a viabilidade e sobrevivência de probióticos a condições sub-letais e letais do processamento de alimentos, tais como tecnologia de células imobilizadas, microencapsulação, modificação genética, combinação de diferentes cepas sinérgicas, e incorporação de nutrientes e prebióticos à matriz (Homayoni Rad et al., 2012), mas algumas dessas oneram o processo industrial e o inviabiliza. No entanto, é interessante destacar que a aplicação de probióticos esporulados possui a vantagem de que seus esporos atravessarem intactos a barreira estomacal. Além disso, seus esporos são intrinsecamente resistentes à várias operações unitárias empregadas nas indústrias de alimentos, apresentando, conseqüentemente, elevada viabilidade e garantindo a funcionalidade de alimentos probióticos; além disso, são capazes de manter tais características durante toda a vida de prateleira de produtos mantidos em temperatura ambiente ou sob refrigeração (Coelho, 2013; Cutting, 2011). Finalmente, o uso desses micro-organismos esporulados na produção de alimentos poderá desmitificar a ideia de que são apenas patogênicos ou deterioradores de alimentos (Abriouel, Franz, Ben Omar, & Gálvez, 2011; Permponpattana, Hong, Khaneja, & Cutting, 2012).

De fato, probióticos esporulados já vêm sendo amplamente comercializados como suplementos (cápsulas) para consumo humano. Além disso, sua aplicação na alimentação animal, aplicados em ração para frangos, porcos e na aquicultura, tem sido bastante estudada objetivando-se melhorar, entre outros, o crescimento dos animais e a inibição de patógenos (Abriouel et al., 2011; Cavazzoni, Adami, & Castrovilli, 1998; Hendricks & Guo, 2006; Murillo & Villamil, 2011; Permponpattana, Hong, Khaneja, & Cutting, 2012; Thirabunyanon & Thongwittaya, 2012).

Considerando-se o crescente interesse por micro-organismos esporulados com propriedades probióticas, o presente trabalho teve como objetivo principal revisar os principais micro-organismos probióticos esporulados, suas características, formas de apresentação, testes de segurança empregados para seu uso, benefícios à saúde e implicações tecnológicas de sua aplicação em alimentos.

2. O esporo bacteriano – estrutura de resistência física e química

O esporo é uma estrutura de resistência formada por certas bactérias após exposição a condições de estresse (Madigan, Martinko & Parker, 2004; Setlow, 2013). Os esporos são estruturas extremamente desidratadas, ricas em cálcio e ácido dipicolínico (DAP), os quais contribuem para a integridade das proteínas no interior do núcleo frente às condições de “estresse”. Além disso, a impermeabilidade do córtex e da camada externa (capa), as atividades metabólica e enzimática mínimas, aliadas à desidratação do seu núcleo devido à presença da SASP (Small Acid Soluble Spore Protein), a qual se liga ao DNA da bactéria, são fatores que conferem resistência aos esporos (Madigan, Martinko & Parker, 2004). Os esporos são metabolicamente dormentes e apresentam níveis ínfimos de pequenas moléculas de alta energia, como ATP, e reduzido número de nucleotídeos de piridina (Pan, Kim, & Yun, 2012).

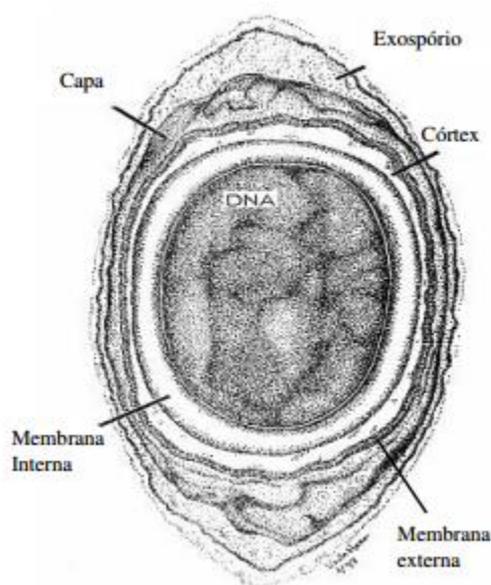


Figura 1. Estrutura de esporo bacteriano.

Fonte: www.farmaciaminhavida.blogspot.com.br

Os esporos são ubíquos, podendo ser encontrados no solo, ar, água, vegetais e animais. Bactérias esporuladas são capazes de multiplicar e exibir atividade metabólica apenas durante o estado vegetativo; além disso, podem esporular novamente quando há escassez de nutrientes ou presença de fatores de risco para perda da viabilidade (Setlow, 2013).

A capacidade de certas bactérias em formar esporos é um atributo específico de alguns bastonetes aeróbios e anaeróbios e alguns cocos (Madigan, Martinko & Parker, 2004). Dentre

estes, destacam-se os micro-organismos do gênero *Bacillus* spp. Algumas espécies pertencentes à família Bacillaceae, possuem esporos que são agentes responsáveis pela deterioração de alimentos, e outras que causam intoxicação alimentar e grande número de outras doenças em humanos e animais. Por outro lado, alguns esporos já são aplicados como probióticos na alimentação animal e humana (Setlow, 2013). Embora os esporos sejam dormentes e, por si mesmos não possam causar efeitos deletérios, ao encontrarem condições propícias ao seu desenvolvimento, podem rapidamente germinar e se transformar em uma célula vegetativa (Setlow, 2013). Assim, o intestino delgado é um sítio anatômico rico em nutrientes, podendo induzir sua germinação e multiplicação (Coelho, 2013). Na realidade, para promoção de seus benefícios à saúde do hospedeiro, os esporos devem ser inicialmente ativados no estômago e, a seguir, no intestino, por meio da ação de diferentes enzimas (Hong et al., 2005).

3. Bactérias esporuladas como micro-organismos probióticos

Embora a utilização de probióticos esporulados ainda seja limitada, a resistência inerente dos esporos ao estresse ambiental constitui um importante atrativo para aplicação comercial, especialmente na indústria de alimentos para humanos e animais. Dentre os micro-organismos probióticos esporulados mais usuais, destacam-se espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, uma vez que atendem às exigências mais comuns para a caracterização de uma cepa como probiótica/ potencialmente probiótica, incluindo viabilidade durante a passagem TGI (resistência à bile e ao ácido estomacal e aos movimentos peristálticos) e a capacidade de síntese de diferentes compostos úteis para os seres humanos. Além disso, esses micro-organismos podem sobreviver a processos térmicos empregados na fabricação de alimentos, além de conseguirem manter sua população estável ao longo da vida de prateleira do produto mantido em temperatura ambiente ou sob refrigeração (Cutting, 2011; Nithya & Halami, 2012).

i. *Bacillus* spp.

Os *Bacillus* spp. são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes, esporuladas, móveis e aeróbias em sua maioria. O principal *habitat* dos esporos desses micro-organismos são o solo e a vegetação, estando, portanto, amplamente distribuídos na natureza (Bergey & Holt & Holt, 1994). O solo tem sido, tradicionalmente, considerado o reservatório das espécies de *Bacillus*. Apesar disso, a atual teoria preponderante sugere que *Bacillus* spp. não são apenas capazes de sobreviver, mas também estar em simbiose dentro de ambientes intestinais. Dessa maneira, o micro-organismo é capaz de encontrar condições apropriadas para a germinação de seus

esporos no intestino, multiplicando-se e finalmente re-esporulando (Miller & Ouwehand, 2013).

No gênero *Bacillus*, as espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus anthracis* compreendem os patógenos de animais e seres humanos mais conhecidos. Dentre as espécies deterioradoras de alimentos, principalmente de produtos processados e que são acondicionados em embalagens herméticas, destacam-se *B. cereus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, e *B. coagulans* (Baril et al., 2012; Carlin, 2011; Viedma et al., 2009).

Apesar de sua importância na deterioração de alimentos, algumas cepas do gênero *Bacillus* têm diversas aplicações biotecnológicas como a produção de enzimas, aminoácidos, antibióticos e agentes de controle de pragas (Hong et al., 2005; Nithya & Halami, 2012; Nithya et al., 2012; Sorokulova, 2008) e utilização como probióticos na alimentação animal e para consumo humano, na forma de cápsulas. As principais cepas de *Bacillus* probióticas descritas até o momento são *Bacillus cereus* IP5832b, *B. subtilis* 2335, *B. licheniformis* 2336, *B. polyfermenticus* SCD, *Bacillus laterosporus* BOD, *B. subtilis* strain RO179, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. pumulis* e *B. polymyxa* (Cutting, 2011; Sanders, Morelli, & Tompkins, 2003).

No contexto da alimentação humana, pesquisas têm explorado, como caráter inovador, a veiculação de cepas esporuladas probióticas em alimentos. Contudo, a maior parte desses estudos ainda tem como objetivo principal a avaliação do potencial probiótico dos micro-organismos estudados.

As principais espécies de *Bacillus* probióticos descritas na literatura e suas principais características e propriedades são:

❖ *Bacillus clausii*: é um micro-organismo móvel, encontrado no solo, apresenta forma de haste, é Gram-positivo, multiplica-se em temperatura de 15-50°C e pH 7-10,5. *B. clausii* pode reduzir o nitrato a nitrito, produz subtilisinas como proteases, apresenta colônias com margens filamentosas cremosas de coloração branca (Bergey & Holt, 1994). *B. clausii* (*Enterogermina*) produz esporos e é resistente a inúmeros antibióticos, incluindo a eritromicina, lincomicina, cefalosporinas e cicloserina (Green et al., 1999). Um estudo avaliou a eficácia do uso de células vegetativas e esporos de *B. clausii* potencialmente probióticos no tratamento de diarreias agudas, diarréias associadas ao uso de antibióticos e diminuição dos efeitos colaterais na terapia para *H. Pylori*, no qual apresentaram mecanismos de ação de colonização de nichos livres, competição para adesão de células epiteliais e/ou produção de antibióticos e enzimas no ambiente intestinal (Jayanthi & Sudha, 2015).

❖ *Bacillus subtilis*: é uma bactéria saprófita frequentemente isolada a partir do solo e da água, esporulada e não patogênica, produz colônias irregulares (contorno ondulado ou filamentoso) com diversas colorações dependendo da composição do meio de cultivo, as quais apresentam consistência cremosa e diâmetro entre 2 e 4 mm. Em cultivos mais velhos, no entanto, as colônias de *B. subtilis* apresentam um aspecto seco e rugoso e se incrustam no ágar. *B. subtilis* cresce à temperatura de 5 a 55°C e em pH entre 5,5-8,5 em meio contendo glicose, além disso utiliza o citrato e a amônia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Diversas cepas do micro-organismo são produtoras de peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana e capacidade de promover uma rápida digestão da caseína (Bergey & Holt, 1994). *B. subtilis* é uma das espécies mais importantes para a produção de metabólitos com atividade antifúngica e antimicrobiana (Gomes, 2013). *B. subtilis* apresenta esporos centrais ou terminais, esféricos ou ovóides, os quais não deformam a célula. Morfologicamente, *B. subtilis* é um bacilo com diâmetro inferior a 1 µm e não apresenta inclusões de poli-beta-hidroxitirato. Esporos de *Bacillus subtilis* 5230 ressuspensos em tampão fosfato em pH 7,0 exibiram valores D entre 0,44 e 0,54 min à temperatura de 121.1°C (Odlaug et al., 1981). *B. subtilis* CU1, potencialmente probiótico, demonstrou seguro e eficaz para utilização como suplemento ou ingredientes de alimentos em um estudo clínico ao melhorar parâmetros de imunidade de idosos (Lefevre et al., 2017).

❖ *Bacillus coagulans*: é uma bactéria móvel, termofílica, ácido-tolerante, catalase-positiva. O micro-organismo apresenta temperatura de multiplicação entre 15 e 60°C e pH ideal na faixa de 4-5. *B. coagulans* fermenta a glicose produzindo ácido lático, 2,3-butanediol, acetoina, ácido acético e etanol e pode multiplicar-se em alimentos ácidos e coagular produtos lácteos. Os esporos de *B. coagulans* são escassos no solo (Bergey & Holt, 1994). Morfologicamente, o micro-organismo é um bacilo com diâmetro inferior a 1 µm e desprovido de inclusões de poli-beta hidroxitirato. Além disso, *B. coagulans* apresenta esporo oval, às vezes esférico, geralmente subterminal, levando à ligeira deformação da célula. O micro-organismo é inibido na presença de solução a 5% de NaCl. Uma vez ressuspensos em tampão fosfato (pH 6,8), o micro-organismo apresenta valor D a 90 ° C estimado em 13,7 min, e valor Z de 12,1 ° C (Gomes, 2013). Além disso, observou-se que em polpa de manga, em pH 3,96, *B. coagulans* exibiu valores de D a 85°C de 32 min (Silva, 2000). O grupo de pesquisa americano da empresa Ganeden apresenta inúmeros trabalhos mostrando o potencial probiótico da cepa de *B. coagulans* GBI-30, a qual apresenta segurança e pode ser utilizada como ingredientes para alimentos devido boa resistência (Endres et al., 2009; Keller et al., 2010; Salvetti et al., 2016). A mesma cepa também esteve relacionada a diversos estudos apontando seus benefícios

entre eles: melhorar imunidade, diminuir danos ao músculo causado pelo exercício físico (Gepner et al., 2017; Jager et al., 2016), modulação do sistema imune e anti-inflamatório (Jensen et al., 2011), melhora dos sintomas da artrite reumatóide e do intestino irritável (Dolin, 2009; Mandel et al., 2010).

❖ *Bacillus cereus*: Trata-se de um micro-organismo Gram-positivo, que forma colônias grandes (2 a 7 mm de diâmetro), foscas ou granulosas e de forma variáveis (circulares ou não, com bordas regulares, denteadas ou filamentosas). *B. cereus* multiplica-se na presença de solução de NaCl a 7%, na faixa de temperatura de 10-45°C, decompõe tirosina e produz lecitinase e acetil-metil-carbonil (Bergey & Holt, 1994). A maioria das cepas de *B. cereus* é considerada patogênica ao homem causando intoxicação alimentar, levando ao desenvolvimento das síndromes diarreica e síndrome emética; além disso, pode causar mastites em bovinos (Gomes, 2013). O micro-organismo apresenta-se, morfológicamente, como bacilo com diâmetro superior a 1 µm e não possui inclusões de poli-beta-hidroxitirato. *B. cereus* tolera soluções de NaCl de 7,5-10% e a atividade mínima de água requerida para sua multiplicação é de 0,91-0,93. À temperatura de 100°C, o valor D de seus esporos é de aproximadamente 3 min, embora alguns esporos sejam muito mais resistentes (Tajkarimi, 2007). Os esporos probióticos de *B. cereus* CenBiot, particularmente, exibiram elevada resistência térmica (80°C/14h) para inibição de *Escherichia coli* e *Yersinia pseudotuberculosis* (Gil-Turnes, 1999). Em carne de porco, cepas de *B. cereus* obtiveram valor D determinado foi de 95°C/2min e 85°C/32min (Byrne, Dunne, & Bolton, 2006). Um estudo com pepinos do mar, muito utilizado na cozinha asiática, o uso de *B. cereus* G19 e *B. cereus* BC-01 potencialmente probióticos melhorou o seu crescimento e melhora do seu sistema imune (Yang et al., 2015).

❖ *Bacillus pumilus*: é uma bactéria que se multiplica em uma ampla faixa de temperatura (5-50°C), sendo que algumas cepas requerem biotina para fazê-lo. Certas espécies de *B. pumilus* são taxonomicamente relacionadas a *B. subtilis*. Os esporos de *B. pumilus* são ubíquos e podem ser encontrados no solo juntamente com os de *B. subtilis* (Bergey & Holt, 1994). Morfológicamente, o micro-organismo é um bacilo com diâmetro inferior a 1 µm e não apresenta inclusões de poli-beta-hidroxitirato. *B. pumilus* apresenta esporo central ou terminal, esféricos ou ovóides, os quais não deformam a célula. O micro-organismo se desenvolve na presença de solução de NaCl a 7% (Gomes, 2013). Já foi demonstrado que, em leite cru, *B. pumilus* apresenta valor D 95°C de 3,56 min (Janstová & Lukasová, 2001). *B. pumilus* AQAHBS01 foi utilizado como probiótico para resistência à estreptococose em

criações de tilápia do Nilo, mostrando sua eficiência na competição com a bactéria patogênica (Srisapoom & Areechon, 2017).

- ❖ *Bacillus licheniformis*: é uma bactéria termoresistente, capaz de multiplicar-se em temperaturas de 15 a 55°C; além disso, seus esporos podem sobreviver a severos tratamentos térmicos. *B. licheniformis* é um micro-organismo anaeróbio e produtor de pigmento vermelho (Bergey & Holt, 1994). Morfologicamente, trata-se de um bacilo com diâmetro inferior a 1 µm, o qual não possui inclusões de poli-beta-hidroxibutirato. De acordo com Silva (2000), esporos de *B. licheniformis* inoculados em polpa de manga, pH 3,96, exibiram valor D de 19 min a 85°C. Em purê de tomate, com pH 4,4, cepas de *B. licheniformis* apresentaram valor D de 4,5 min a 95°C e de 2 min a 100°C e valor Z de 14,9°C. Em tampão fosfato, pH 7,2, por sua vez, o valor D obtido foi de 7,8 min a 95°C (Montiville e Sapers, 1981). O micro-organismo apresenta esporo central ou terminal, esférico ou ovóide, os quais não deformam a célula. É importante destacarmos que a maioria dos *B. licheniformis* são patogênicos ao homem, causando infecções oculares, além de provocar abortos em ovinos e bovinos (Gomes, 2013). O *B. licheniformis* é mais utilizado como micro-organismo probiótico em animais. O sua adição em rações de galinhas foi relacionada à prevenção de doenças resistentes à utilização de antibióticos, como enterite necrótica causada por *Clostridium perfringens* (Knap et al., 2010).

ii. *Sporolactobacillus*

Esse gênero é composto por cinco espécies de micro-organismos catalase-negativos, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, formadores de esporos. Originalmente proposto como um membro do gênero *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus* foi posteriormente elevado ao status de gênero, pertencendo à família *Bacillaceae* (Sanders et al., 2003).

Dentre as espécies de *Sporolactobacillus*, destaca-se *S. inulinus*, a qual produz D (-) ácido láctico, multiplica-se em temperatura ótima de 35°C (intervalo de 15 a 40°C).

Micro-organismos do gênero *Sporolactobacillus* são raramente encontrados no solo. Seus habitats mais comuns são ração de galinha, produtos lácteos e picles. Já foi demonstrado que algumas cepas do micro-organismo são capazes de sobreviver sob condições adversas, tal qual baixo pH (Hyronimus et al., 2000).

iii. *Brevibacillus*

Brevibacillus é um gênero descoberto em 1996, e que engloba bactérias aeróbicas, formadoras de esporos. Este gênero resultou de uma reclassificação genética de cepas anteriormente como pertencentes ao grupo *brevis* do gênero *Bacillus* (Sanders et al., 2003d).

O *habitat* de *Brevibacillus* é o solo, embora também possa ser isolado a partir de produtos lácteos. Há pouca informação sobre a utilização de *Brevibacillus* como agentes probióticos. A cepa *Brev. brevis* foi avaliada para controle biológico de patógenos de plantas e na criação de larvas (Mahdhi, 2012), devido à sua capacidade de sintetizar compostos com ação antimicrobiana. Outro exemplo, é a cepa *Brev. choshinensis* HPD31, a qual é utilizada como eficiente produtor de fator de crescimento epidérmico humano (Sanders et al., 2003).

4. Avaliação do potencial probiótico e segurança de cepas esporuladas

O estudo da segurança da utilização de micro-organismos potencialmente probióticos baseia-se, inicialmente, na adequada identificação e caracterização da cepa probiótica (Salminen et al., 2010), incluindo a realização de testes de catalase, de hemólise, de hidrofobicidade e avaliação de sua: i) segurança, através da determinação da presença de genes de virulência, potencial de toxicidade e resistência a antibióticos; ii) estabilidade, através de ensaios para determinação de sua capacidade de adesão à parede intestinal e iii) funcionalidade, através da avaliação de sua resistência ao ácido estomacal e tolerância à bile. A avaliação da atividade antagonista frente a micro-organismos potencialmente patogênicos também é citada como um critério utilizado para avaliar uma cepa com potencial probiótico (Sorokulova, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS, 2002) desenvolveu parâmetros para avaliar e caracterizar as cepas com potencial probiótico para aplicação em alimentos. Assim, de acordo com a mesma, há a necessidade da realização de testes pré-clínicos, os quais incluem desde a adequada identificação das cepas e avaliação de sua segurança e eficácia, através da realização de testes *in vitro* e emprego de modelos animais (determinação de possíveis efeitos benéficos à saúde e mecanismos de ação), seguidos da realização de ensaios clínicos em humanos (duplo-cego, placebo-controlado) (Nithya & Halami, 2013; Maruo et al., 2006; Schillinger, Guigas, & Holzapfel, 2005; Sorokulova, 2008). Para a legislação brasileira é necessário fazer a caracterização do micro-organismo, sua identificação completa (gênero, espécie e cepa), saber sua origem e forma de obtenção, incluindo a informação se é geneticamente modificado, avaliar se há produção de toxinas e/ou bacteriocinas, analisar o perfil de resistência a antimicrobianos, determinar atividade hemolítica para espécies com potencial hemolítico, apresentar estudos disponíveis na literatura com efeitos adversos da cepa, demonstração da eficácia e viabilidade no uso, armazenamento e distribuição (ANVISA, 2016).

Técnicas moleculares (análises genéticas) podem ser utilizadas concomitantemente nas etapas de seleção e identificação de cepas não patogênicas, bem como no controle da utilização

segura desses micro-organismos como probióticos (Chr-Hansen, 2013; Hong et al., 2005; Nithya & Halami, 2012). Diferentes modelos podem ser empregados para determinação da viabilidade e da segurança de cepas potencialmente probióticas, como o uso de culturas de células ou de condições simuladas do TGI. Para este último, podem ser classificados como: *in vitro* estáticos (fluidos fisiológicos), *in vitro* dinâmicos (simulando o TGI) e *in vivo* (animais e homem). O primeiro possui a vantagem de ser mais rápido, simples e acessível, porém, não leva em consideração a influência da dieta e constituintes não-ácidos da secreção gástrica, além de seu tempo e espaço serem variáveis. O segundo, *in vitro* dinâmico, já se torna mais consistente com o teste *in vivo*, simulando os processos fisiológicos, sendo reproduzível e de fácil implantação, além de possibilitar a coleta de amostras em quaisquer etapas do processo digestivo. Contudo, este teste não é capaz de simular as interações dos probióticos com a microbiota intestinal. O último, *in vivo*, é o que mais se aproxima das condições reais (seres humanos); porém, ainda existem diversas restrições importantes à sua aplicação, principalmente aquelas relacionadas às questões éticas (dificuldade de obtenção de amostras biológicas), financeiras, entre outras (Roy, 2011).

Em relação à identificação de uma cepa probiótica, o conhecimento exato da sua taxonomia é muito importante, pois a atividade probiótica é cepa-específica. Além disso, as características intrínsecas de uma determinada cepa, como tolerância ao NaCl, hidrofobicidade, resistência térmica, pH ótimo e atividade de água são importantes para o controle de qualidade e para uma melhor compreensão de seu(s) mecanismo(s) de ação (Sorokulova, 2008).

As cepas probióticas esporuladas exigem uma investigação mais aprofundada em relação a sua segurança (por ex., determinação da presença de genes de virulência e do potencial de genotoxicidade), pois comumente estão envolvidas em surtos de infecções alimentares e/ou deterioração de alimentos (Coelho, 2013).

As técnicas tradicionalmente empregadas para avaliar o potencial probiótico de cepas de *Bacillus spp.* são baseadas na determinação da sobrevivência do probiótico à passagem pelo TGI, incluindo a resistência ao ácido gástrico e concentrações fisiológicas de bile. Além disso, a investigação da produção de substâncias antimicrobianas, capacidade de adesão às células epiteliais, sensibilidade a antibióticos, habilidade de sintetizar diferentes substâncias úteis para o homem (antibióticos, enzimas, aminoácidos e vitaminas) e habilidade de co-agregação com patógenos, a fim de impedir sua colonização e disseminação pelo tecido intestinal do hospedeiro são utilizadas (Patel et al., 2009)

A Tabela 1 apresenta as etapas necessárias para a adequada caracterização e determinação do potencial probiótico de cepas de micro-organismos.

Tabela 1. Testes de seleção de cepas probióticas.

Etapas	Testes	Objetivos	Resultado Esperado por Probióticos
Pré-clínico (Aspectos gerais)	Identificação das cepas (presença de genes de virulência)	Avaliar características fenotípicas e genotípicas das cepas	Cepas não patogênicas
Testes <i>in vitro</i>	Segurança e estabilidade das cepas (potencial invasivo, atividade e viabilidade em produtos, resistência a baixo pH, suco gástrico, sais biliares, colonização e sobrevivência, resistência a antibióticos)	Triagem e seleção de cepas	Cepas resistentes aos parâmetros gastrintestinais e sensíveis a antibióticos e viáveis
Teste <i>in vivo</i> – modelos animais	Funcionalidade e aspectos fisiológicos (aderência ao epitélio intestinal, atividade antimicrobiana, estimulação e supressão de resposta imune, testes sanguíneos)	Avaliar em animais os efeitos das cepas	Cepas funcionais
Teste <i>in vivo</i> - humano	Funcionalidade e Aspectos fisiológicos (efeitos clínicos em voluntários/pacientes)	Avaliar no homem os efeitos das cepas	Cepas funcionais

Fontes: FAO/WHO 2002; Nithya & Halami, 2013; Salminen et al., 2010; Schillinger et al. 2005; Sorokulova, 2008.

A resistência à ação do ácido clorídrico, por exemplo, é importante, pois uma vez dissociado é capaz de liberar prótons no meio intracelular da bactéria, interferindo no funcionamento da membrana celular, prejudicando processos essenciais à sua sobrevivência. A sensibilidade aos sais biliares no intestino delgado, por sua vez, ocorre, principalmente, pela ação detergente desses em relação à membrana celular da bactéria, constituída majoritariamente de lipídeos e ácidos graxos (Van de Guchte et al., 2002; Costa et al., 2013).

O antibiograma avalia o perfil de sensibilidade/resistência dos probióticos a diferentes antibióticos, selecionando-se aqueles que, eventualmente, poderiam ser administrados ao hospedeiro para inativá-los (Da, Chaves, & Partir, 2009). O teste de antagonismo frente a patógenos, por sua vez, tem como finalidade identificar produtos metabólicos das bactérias probióticas que apresentam atividade antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos, bem como determinar seus possíveis mecanismos de ação (Da, Chaves, & Partir, 2009; Huys et al., 2013).

Outras técnicas utilizadas para a caracterização da segurança de espécies esporuladas com potencial probiótico incluem o teste de mutação reversa bacteriana (Ames), aberração cromossômica *in vitro*, estudo de micronúcleos em ratos, avaliação da toxicidade aguda oral em ratos,

determinação da toxicidade subcrônica oral (90 dias) em ratos, estudo da irritação aguda dos olhos e da pele em camundongos (Endres et al., 2009).

Na Tabela 2 estão descritos os testes utilizados para a caracterização do potencial patogênico e probiótico de cepas esporuladas.

Tabela 2. Testes de avaliação do potencial patogênico e probiótico.

Tipo	Objetivo	Princípio	Exemplos	Referência
Resistência a antibióticos	Avaliar a resistência a antibióticos (intrínseca e transmissível)	Preparo de uma suspensão de bactérias de cultivo recente, inoculação desta na superfície de uma placa de Agar Mueller Hinton, e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. Avaliar diâmetro dos halos de inibição	<i>Bacillus indicus</i> HU36 e <i>Bacillus subtilis</i> PY79, HU36 apresentaram resistência apenas à clindomicina. <i>Bacillus flexus</i> Hk1 foi resistente a penicilina, metecilina e ampicilina.	(Hong et al., 2008)
Ausência de genes de virulência	Evitar qualquer dano à célula intestinal e ter comportamento semelhante a de micro-organismos comensais, não sendo, portanto, patogênicas ao hospedeiro	Identificação de plasmídeo já conhecido causador de virulência, através do emprego de técnica de PCR	<i>Bacillus clausi</i> e <i>Bacillus pumilus</i> exibiram gene produtor da enterotoxina de <i>Bacillus cereus</i> GN105, utilizada como padrão. <i>Bacillus indicus</i> HU36 e <i>Bacillus subtilis</i> PY79 não apresentaram genes de virulência para a produção de enterotoxina, hemólise ou produção de lecitinase.	(Fakhry et al., 2008; Gama, 2008; Huys et al., 2013) (Hong et al., 2008).
Ensaio de mutação reversa bacteriana (Ames)	Detecta mutações nas estirpes de ensaio, restaurando a capacidade funcional das bactérias sintetizarem um ácido essencial	Detecção visual de colônias bacterianas que se formam em meio nutriente de composição definida		
Ensaio do micronúcleo	Identificar substâncias que causam danos citogênicos	Detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular	<i>Bacillus coagulans</i> BC30 da Ganeden não apresentou mutagenicidade ou genotoxicidade.	(Endres et al., 2009)
Teste de aberração cromossômica	Avaliar a toxicidade <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	Identificação de agentes ou substâncias que causam ou induzem aberrações cromossômicas estruturais nas células somáticas de mamíferos em meios de cultura		

				(Nithya & Halami, 2012)
			<i>Bacillus subtilis</i> Ec1 apresentou viabilidade determinada em 85% em pH 3 durante o período de incubação de 3 horas e em 0,3% de ácidos biliares	
Resistência à acidez	Determinar a viabilidade do micro-organismo probiótico ao passar pelo estômago e intestino	Utilização de soluções artificiais gástrica e entérica para avaliar a sobrevivência de cepas probióticas incubadas à temperatura similar àquela verificada no organismo humano	<i>Bacillus coagulans</i> são sensíveis a pH 2-3, mas tolerante a sais biliares na concentração de 0,3%.	(Hong et al., 2005)
Tolerância à bile			No tempo de 1,5 e 3 horas <i>Sporolactobacillus inulinus</i> BCRC 14647 apresentou menor viabilidade quando testado em pH mais baixo; contudo, sua forma esporulada resistiu à bile mais do que sua forma vegetativa	(Huang et al., 2007)
			<i>B. subtilis</i> MA139 apresentou resistência a pH 2 e 0,3% de sais biliares	(Guo, Li, Lu, Piao, & Chen, 2006)
Aderência ao epitélio intestinal	Avaliar a capacidade de adesão às células intestinais e atuação na microbiota intestinal		A forma vegetativa de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus clausii</i> foram encontradas no intestino após a inoculação de seus esporos	Spinosa et al., (2000)

Atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos	Avaliar a inibição de patógenos entéricos	Produção de toxinas e competição por sítios de adesão ou nutriente	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> BCRC 14647 apresentou ação antagonista frente a <i>Salmonella Enteritidis</i> , embora a substância antimicrobiana produzida não tenha sido determinada	(Huang et al., 2007).
			<i>Bacillus licheniformis</i> Me1 e <i>Bacillus subtilis</i> Bn1 inibiram <i>Listeria monocitogenes</i> ScottA, <i>Staphylococcus aureus</i> FRI722, <i>Salmonella boydii</i> , <i>Bacillus cereus</i> F4433, <i>Salmonella typhi</i> FB231 e <i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341.	(Thirabunyanon & Thongwittaya, 2012)
			<i>Bacillus subtilis</i> NC11 apresentou proteção frente ao mecanismo de infecção de <i>Salmonella enteritidis</i> por meio da exclusão competitiva por sítios de adesão ao epitélio intestinal e produção de substâncias antimicrobianas não determinadas	(Pinchuk et al., 2001)
			<i>B. subtilis</i> 3 exerceu atividade antagonística <i>in vitro</i> contra <i>H. Pylori</i> , a qual está relacionada à presença de amicoumacina A	(Abdou, Awany, & Abou Zeid, 2012)
			Esporos de <i>Bacillus cereus</i> Cenbiot inibiram <i>Escherichia coli</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ; por outro lado, o potencial probiótico não foi inibido por antibióticos testados em baixas concentrações	(Gil-Turnes, 1999)
			<i>Bacillus pumilus</i> inibiu <i>Bacillus cereus</i> GT1 e <i>S. aureus</i> S1 em queijo através da atividade de bacteriocinas.	(Guo et al., 2006)
Modelos animais	Avaliar a toxicidade aguda e crônica Avaliar a irritabilidade Caracterizar, funcionalmente, as cepas	Avaliação dos efeitos dos probióticos em um organismo vivo, em um órgão ou tecido isolado	<i>Bacillus coagulans</i> da GanedenBC30 não apresentou nenhuma evidência de mutagenicidade e genotoxicidade. Além disso, nenhuma morbidade, mortalidade ou sintomas clínicos foram identificados após a ingestão aguda ou crônica, determinados através de testes de toxicidade	(Endres et al., 2009)
			Nos testes de toxicidade, somente <i>B. indicus</i> HU36 foi testado e não apresentou nenhuma modificação no	(Hong et al., 2008)

			estado geral de saúde dos animais, não alterou a ingestão de alimentos, nem levou a modificações no comportamento dos mesmos. Além disso, não houve translocação bacteriana de patógenos	(Thirabunyanon & Thongwittaya, 2012)
			Não foi relatado nenhum caso de mortalidade ou doença relacionados à ingestão do probiótico <i>B. licheniformis</i> Me1. Além disso, não foi observado nenhum efeito genotóxico	
Estudo duplo cego, randomizado, placebo-controle - homem	Caracterizar, funcionalmente, as cepas Avaliar benefícios à saúde	Avaliar parâmetros clínicos e biológicos em homens (voluntários/pacientes) para determinar a segurança e eficácia no uso da cepa probiótica	<i>Bacillus coagulans</i> BC30 melhorou os sintomas de síndrome do intestino irritado, como inchaço e dores abdominais	Dolin (2009)
			<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9799 reduziu a frequência de infecções no trato urinário em pacientes idosos com fluxo urinário lento	Meroni <i>et al.</i> (1983)
			<i>Bacillus clausii</i> exibiu bons resultados em estudo piloto no tratamento de crianças diagnosticadas com infecções respiratórias	(Marseglia <i>et al.</i> , 2007)

Apesar de seu potencial para aplicação como probióticos, os esporos de *Bacillus* spp. são de difícil controle no processamento de alimentos, os quais podem germinar e deteriorar o alimento antes que eles possam ser ingeridos e promover benefícios à saúde do consumidor. No entanto, ainda se discute o consumo desses micro-organismos em relação à segurança dos alimentos e à saúde dos consumidores, assim como a eficiência das doses a serem utilizadas (Mongkolthanaruk, 2012), uma vez que não são habitantes normais do trato gastrointestinal (TGI) (Sanders et al., 2003; Spinosa et al., 2000). Contudo, uma vez que espécies do gênero *Bacillus* podem ser encontradas em praticamente todos os ambientes, isso também indicaria que, inevitavelmente, estejam presentes nos alimentos. Portanto, algumas pesquisas indicam que *Bacillus* spp. podem ser componentes naturais da microbiota intestinal humana, conseguindo alcançar o organismo de pessoas saudáveis por meio da ingestão de água e alimentos, além do contato com o próprio ar (Sorokulova, 2008).

O número de pesquisas na área de alimentos em relação ao uso de probióticos esporulados tem crescido, porém ainda tímida. Os esporos probióticos além de serem mais resistentes aos tratamentos de conservação e processamento mais agressivos, também possuem uma vida útil maior em comparação àqueles tradicionalmente estudados/utilizados (Endres et al., 2009; Jao et al., 2011; Jafari et al., 2017; Keller et al., 2010). Dessa forma, o uso de probióticos esporulados pode reduzir os custos de sua produção e distribuição, além de aumentar a confiabilidade do processo em que são empregados (Foligné, Daniel, & Pot, 2013). Portanto, esses micro-organismos possuem potencial para serem empregados em alimentos, principalmente aqueles que apresentam etapas de estresse (físico-químico) durante o processamento. É importante ressaltar que as cepas esporuladas probióticas do gênero *Bacillus* devem possuir o status GRAS (Generally Recognized as Safe), o qual é obtido após realização de testes *in vitro* e *in vivo*, Assim, apenas essas cepas podem ser utilizadas para aplicações industriais e tecnológicas (Hong et al., 2005; Pande, Bagad, Dubey, & Ghosh, 2012; Salminen et al., 1998).

5. Forma de apresentação e aplicações dos probióticos esporulados

Os probióticos esporulados podem ser encontrados e utilizados de diferentes formas. Atualmente, são amplamente produzidos por indústrias farmacêuticas, sendo empregados na área médica na forma de medicamentos biológicos, bem como utilizados pela indústria de rações animais, na forma de suplementos alimentares e mais recentemente na indústria de alimentos (Cutting, 2011; Sanders et al., 2003).

5.1. Probióticos Esporulados como Medicamentos Biológicos

O crescimento da utilização de produtos nutracêuticos tornou os probióticos mais disponíveis no mercado em diversas formas farmacêuticas (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010). Atualmente, observa-se um crescimento do consumo de probióticos veiculados na forma de medicamentos biológicos para consumo humano (Sreeja & Prajapati, 2013). Esses são encontrados em diferentes maneiras, dentre as quais destacam-se cápsulas, sachês, tabletes, grânulos, comprimidos mastigáveis e suspensões líquidas ou liofilizadas (Aureli, Fiore, Scalfaro, Casale, & Franciosa, 2010; Hong et al., 2005). Os diversos benefícios à saúde associados ao seu consumo e a possibilidade de alta rentabilidade aos produtores têm atraído cada vez mais o interesse da indústria farmacêutica para a produção de probióticos (Pande et al., 2012).

Uma grande parte dos probióticos comerciais são liofilizados e veiculados em microcápsulas, as quais são capazes de protegê-lo durante o processo tecnológico, auxiliando no controle da oxidação, proporcionando sua liberação controlada, além de poder mascarar odores, sabores ou cores e proteger as células durante a passagem pelo TGI (Pande et al., 2012).

Na área médica, os tabletes de probióticos são comparativamente mais vantajosos em relação a outras formas farmacêuticas, uma vez que podem ser comercializados em dose unitária. Além disso, os tabletes possuem baixo teor de umidade, propiciando melhor estabilidade dos micro-organismos probióticos durante a vida de prateleira; além disso, protegem-os frente à ação do suco gástrico. Finalmente, é uma das formas mais bem-aceita pelos pacientes (Pande et al., 2012).

Tanto para as cápsulas quanto para os tabletes, é importante escolher bem o material de revestimento do micro-organismo, pois esse interfere na sua proteção efetiva. Assim, polímeros formadores de gel têm sido amplamente utilizados por conferirem maior tolerância ao pH ácido do estômago (Pande et al., 2012).

Probióticos veiculados em pó têm sido comercializados como medicamentos biológicos contendo uma mistura de cepas e/ou espécies probióticas, além de prebióticos para assegurar a viabilidade desses micro-organismos. Três tipos de probióticos são disponibilizados comercialmente, incluindo: culturas desidratadas, pós de fluxo livre e pós para formas de dosagem unitária, como cápsulas, sachês ou comprimidos. Alguns sachês contendo probióticos podem ser reidratados e utilizados na forma de soluções orais para o tratamento de diarreia em crianças (Pande et al., 2012; Sreeja & Prajapati, 2013). Cremes contendo probióticos liofilizados também podem ser utilizados para o tratamento de infecções vaginais (Pande et al., 2012).

Apesar de todos os esforços, ainda é difícil determinar, com absoluta certeza, quais cepas probióticas adicionadas em alimentos ou veiculados como medicamentos biológicos agem de maneira mais eficiente na prevenção ou tratamento de doenças. Essa avaliação ainda é pouco explorada, pois as respostas dependem, sobretudo, da cepa, dosagem, tempo de intervenção e condição estudada (Homayoni Rad et al., 2012).

De qualquer maneira, sabe-se que a eficácia do micro-organismo probiótico ingerido por meio do consumo de medicamentos biológicos difere em relação àquela obtida com o consumo de alimentos probióticos uma vez que, no primeiro caso, há exclusão do efeito potencial sinérgico atribuído à matriz alimentícia (Ranadheera et al., 2010). Por outro lado, os estresses relacionados a manufatura dos medicamentos tais como descongelamento, liofilização, homogeneização, mudança de pH, teores de oxigênio e umidade, bem como a variação de temperatura no preparo de cepas probióticas para sua utilização como medicamento podem afetar sua estabilidade e viabilidade (Pande et al., 2012).

Ao contrário dos medicamentos, a maioria dos alimentos protegem os micro-organismos probióticos durante a passagem pelo TGI; além disso, a matriz alimentícia fornece-lhes nutrientes, favorecendo sua viabilidade. Porém, atualmente, a maioria dos probióticos esporulados apresenta-se na forma de medicamentos biológicos para consumo humano (Tabela 3). Isso pode estar relacionado à facilidade de produção e à adequada estabilidade do produto final, e doses bem estabelecidas (Cutting, 2011).

Bacillus clausii (enterogermina) é utilizado para a prevenção da diarreia infantil e para o fortalecimento da imunidade celular em crianças alérgicas; além disso, poder ser utilizado no tratamento de infecção respiratória e em terapias para combater *Helicobacter pylori* (Cutting, 2011). *Bacillus coagulans* Ganeden BC³⁰, por sua vez, tem sido estudado como adjunto no tratamento de artrite reumatóide em seres humanos (Mandel et al., 2010). Finalmente, o consumo de *Bacillus subtilis* natto está associado à estimulação do sistema imune (Hosoi and Kiuchi, 2004).

Na Tabela 3 estão indicados os principais probióticos esporulados comercializados para consumo humano.

Tabela 3. Probióticos esporulados comerciais para uso humano.

Produto	Fabricante	Características	Espécie/Dosagem
Bactisubtil	Originalmente produzido por Marion Merrell Dow Laboratories (Levallois-Perret, França), mas também pela Hoechst e depois Aventis Pharma. Também citado como sendo produzido por Casella-Med, Colônia, Alemanha.		Cápsula transportando $1 \cdot 10^9$ esporos de <i>Bacillus cereus</i> 5832b IP tensão (ATCC 14893)
Bibactyl	Tendiphar Corporation, Ho Chi Minh City, Vietnã		Sachês (1 g) contendo 10^7 - 10^8 esporos de <i>B. subtilis</i> .
Bidisubtilis	Bidiphar. Binh Dinh Companhia de Equipamentos Farmacêuticos e Médicos, 498 Nguyen Thai Hoc, Qui Nhon, Vietnã		Sachês com $1 \cdot 10^6$ de esporos de <i>B. subtilis</i> .
Biosporin	Biofarm, Dniepropetrovsk, Ucrânia	Originalmente isolado a partir de ração animal	Biosporin é uma mistura de duas estirpes bacterias <i>B. subtilis</i> 2335 (às vezes referida como <i>B. subtilis</i> 3) e <i>B. licheniformis</i> 2336 (proporção é de 3:1).
Biosubtyl I e II	Companhia Biophar, Da Lat, Vietnã	Produto etiquetado como <i>B. subtilis</i> . A estirpe está estreitamente relacionada por análise 16S rRNA para IP 5832 utilizado em Bactisubtil.	Sachê (1 g) com 10^6 - 10^7 de esporos de <i>B. cereus</i> misturado com tapioca.
Biosubtyl DL	IVAC, 18 Le Hong Phong, Da Lat, Vietnã.		Sachê(1g) com 10^7 - 10^8 UFC de <i>B. subtilis</i> e <i>LactoBacillus acidophilus</i> .
Biovicerin	Geyer Medicamentos S. A. Porto Alegre, RS, Brasil http://www.geyermed.com		<i>B. cereus</i> em suspensão GM de 10^6 esporos por ml^{-1}
Bispan	Binex Co. Ltd, Busan, Coréia do Sul www.bi-nex.com		Tablete contendo esporos ($1,7 \cdot 10^7$) de <i>B. polyfermenticus</i> SCDD
Domuvar	BioProgress SpA, Anagni, Itália http://www.giofil.it	Não mais comercializado	$1 \cdot 10^9$ esporos de <i>Bacillus clausii</i> em suspensão, identificado como <i>B. subtilis</i>
Enterogermina	Sanofi Winthrop SpA, Milão, Itália www.automedicazione.it	Pelo menos quatro diferentes cepas de	Vial (5 ml) transportando $1 \cdot 10^6$ esporos de <i>B. clausii</i> em suspensão.

		<i>B. clausii</i> presente e o produto originalmente rotulado como transportando <i>B. subtilis</i>	
Flora-Balance	Flora -Balance , Montana, EUA www.flora-balance.com		Cápsulas rotuladas <i>Bacillus laterosporus</i> BODd mas contendo Brevo <i>Bacillus laterosporus</i> BOD
Lactipan Plus	Instituto Italiano Biochimico SpA, Milão, Itália		Cápsula de esporos de <i>Bacillus subtilis</i> com $2 \cdot 10^9$ esporos de <i>LactoBacillus sporogenes</i> .
Lactospore	Sabinsa Corp, Piscataway, NJ, EUA www.sabinsa.com		<i>B. coagulans</i> $6-15 \cdot 10^9 \cdot g^{-1}$
Medilac-Vita	Hanmi Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing, China http://www.hanmi.co.kr		<i>B. subtilis</i> estirpe RO179 (em $10^8 \cdot g^{-1}$) em combinação com o <i>Enterococcus faecium</i>
Nature's First Food	Nature's First Law, San Diego, CA, USA http://www.rawfood.com		42 espécies listadas como probióticos, incluindo: <i>B. subtilis</i> , <i>B. polymyxad</i> , <i>B. pumilus</i> e <i>B. laterosporusd</i>
Neolactoflorence	Newpharma S.r.l., Milão, Itália	O nome válido é <i>B. clausii</i> para <i>L. sporogenes</i> , e é uma cepa de <i>B. subtilis</i>	Mistura de bactérias lácticas incluindo <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> e <i>L. sporogenes</i> ^d <i>L. sporogenes</i> à $3.3 \cdot 10^5$ UFC. g^{-1}
Pastylbio	Instituto Pasteur de Ho Chi Minh, no Vietnã		Sachês (1 g) com 10^8 esporos de <i>B. subtilis</i> .
Primal Defense	Garden of Life http://www.thehomeostasisprotocol.com/mall/Primal-defense/article3.htm		Cápsulas com 14 componentes bacterianos, incluindo <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> .
Subtyl	Mekophar, Pharmaceutical Factory No. 24, Ho Chi Minh City, Vietnã	Produto rotulado como portador de <i>B. subtilis</i>	Cápsula 106-107 esporos de <i>B. cereus</i> var <i>vietnami</i>
Bio-Kult	Protexin Health Care, Reino Unido http://www.bio-kult.com		<i>B. subtilis</i> é um componente de 14 cepas neste probiótico.

Sustenex	Ganeden Biotech Inc., Ohio, USA www.sustenex.com	Esta é uma cepa patenteada que tem aprovação GRAS nos EUA	<i>B. coagulans</i> GanedenBC30 6086
Natto		Vendido como um lanche com soja secos revestidos com um fino pó branco de <i>B. subtilis</i> var. Natto	
ProDura	Nebraska Cultures		Esporos de <i>Bacillus clausii</i> liofilizados NLT 2. 10 ¹¹ UFC por grama
Mega sporebiotic	Physicians Exclusive 1332 Waukegan Road Glenview, IL www.gomegaspore.com		Mistura de esporos de <i>Bacillus clausii</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus indicus</i> HU36, <i>Bacillus clausii</i> e <i>Bacillus subtilis</i> HU58
Anabio CL	ANABIO R&D JSC, Hanoi, Vietnam http://www.anabio.com.vn		Ampola com 5 ml de líquido de suspensão de 2 mil milhões de esporos de <i>Bacillus clausii</i>
Omega Probiotic	Nordic Naturals		2 bilhões de células viáveis de <i>Bacillus coagulans</i>

Fonte: (Cutting, 2011; Hong et al., 2005)

5.2. Probióticos Esporulados em Ração Animal

O uso de probióticos na alimentação animal tem como finalidade substituir ou ser empregado concomitantemente ao uso de antibióticos para tratamento de infecções bacterianas. O uso de alguns antibióticos foi banido devido à sua aplicação exacerbada, levando à seleção de cepas patogênicas resistentes, as quais podem ser prejudiciais para a saúde do animal e, conseqüentemente, para a segurança dos alimentos de origem animal consumidos pelos seres humanos (Gaggìa, Mattarelli, & Biavati, 2010). Além disso, os resíduos desses antibióticos presentes em produtos animais podem ser alergênicos ou tóxicos para o consumo humano (Zuanon et al., 1998). Portanto, os probióticos podem representar uma boa alternativa para um controle mais adequado da morbidade e mortalidade associadas às infecções entéricas e, conseqüentemente, melhorar o desempenho do animal (crescimento e eficiência alimentar), ao modular o ambiente do TGI (Cartman & Ragione, 2004; Gaggìa et al., 2010).

Os probióticos mais utilizados para a alimentação animal são aqueles pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Saccharomyces* (Gaggìa et al., 2010). *Lactobacillus* apresenta uma longa história de uso seguro, especialmente por serem habitantes do intestino humano e de animais, destacando-se as espécies *L. acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. salivarius*. Por outro lado, *Enterococcus faecium* é o micro-organismo mais prevalente no TGI de animais e algumas cepas são potencialmente probióticas. Contudo, há controvérsias quanto à sua utilização segura como cultura probiótica. Em relação à levedura *Saccharomyces*, destacam-se as espécies com potencial probiótico *S. cerevisiae* (*S. boulardii*) e *S. pastorianus* (*S. carlsbergensis*) (Gaggìa et al., 2010). As espécies mais conhecidas de *Bacillus* utilizadas como probióticos na alimentação animal são *B. cereus var toyoi*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*.

Finalmente, é importante ressaltar que esporos bacterianos têm sido frequentemente utilizados como probióticos em rações animais e estão relacionados à melhora do estado de saúde e desempenho de animais. Além disso, os esporos bacterianos, devido a suas características intrínsecas apresentam elevada resistência à peletização pelo calor e podem ser armazenados, mantendo suas características originais, durante longos períodos. Assim, quando adicionados a rações animais, resultam em um produto comercial de características interessantes (Cartman and Ragione, 2004; Simon, 2005). De acordo com Simon (2005), a recuperação de *Bacillus cereus toyoi* após o processo de peletização realizado a 87°C foi determinada em 95%, sendo que após 8 semanas de armazenamento, esta taxa correspondeu a 92%. Ainda segundo os autores, células vegetativas desidratadas de *E. faecium*, por sua vez,

mostraram-se mais sensíveis frente ao tratamento térmico utilizado e, após 8 semana de armazenamento, sua taxa de inativação foi de aproximadamente 50%.

Os probióticos podem ser administrados de diversas formas a animais. Assim, esses micro-organismos podem ser veiculados como medicamentos digestivos, produtos de higiene oral para animais de estimação, neutralizadores de odor de urina de cachorro, adicionados na água de tanques de peixes e suplementos alimentares para animais de fazenda (porco, aves, cavalos, ruminantes) (Foligné et al., 2013).

Há cada vez mais pesquisas com o uso de probióticos para reduzir a carga de agentes patogênicos e melhorar os sintomas de doenças do TGI em porcos (Homayoni Rad et al., 2012). *Bacillus licheniformis* DSM 5749 e *B. subtilis* DSM 5750, presentes no produto BioPlus2, são comumente associados à redução da morbidade e mortalidade em porcos, promovendo seu ganho de peso e melhorando a qualidade de suas carcaças (Gaggia et al., 2010).

O uso de probióticos em aves está estritamente associado ao conceito de exclusão competitiva (EC). Desde as primeiras aplicações em pintos, vários experimentos com culturas probióticas têm sido realizados com sucesso para controlar e reduzir a colonização por *Salmonella* (Homayoni Rad et al., 2012). A adição de prebiótico fosfoligossacarídeos e *Bacillus subtilis* à dieta de frangos melhorou a taxa de conversão alimentar, bem como o ganho de peso desses animais e reduziu a incidência de diarreia e a taxa de mortalidade, em comparação com a utilização do antibiótico aureomicina (Li et al., 2008; Homayoni Rad et al., 2012).

A aplicação de probióticos pode potencializar a atividade de aquicultura, pois oferece alternativas viáveis para a geração de um produto de alta qualidade em termos de peso, tempo de produção e saúde (Martínez Cruz, Ibáñez, Monroy Hermosillo, & Ramírez Saad, 2012). Na aquicultura, os probióticos têm como principais objetivos colonizar os peixes e realizar o controle biológico de patógenos no TGI, além de promover o crescimento desses animais (Chaucheyras-Durand e Durand, 2010). Esporos de *Bacillus cereus* var *toyoi* foram adicionados a rações para aumentar a taxa de crescimento do peixe *Seriola quinqueradiata* (Martínez Cruz, Ibáñez, Monroy Hermosillo, & Ramírez Saad, 2012). Esse mesmo micro-organismo também foi testado quanto à redução da carga microbiana de *Vibrio spp.* em viveiros de camarão (Martínez Cruz, Ibáñez, Monroy Hermosillo, & Ramírez Saad, 2012). *Bacillus spp.* foi avaliado quanto à habilidade de aumentar a produtividade do peixe *Penaeus monodon* e melhorar a qualidade química da água, verificando-se que reduziu a concentração de amoníaco e nitrito da água (Mello, 2012).

Os probióticos esporulados são introduzidos nas rações animais na forma liofilizada ainda durante a etapa de processamento ou na forma de aditivos alimentares, misturados após o processamento da ração com intenção de melhorar o crescimento dos animais. Produtos comerciais como Lactopure (“Pharmed Medicare”), contendo *B. coagulans* e Biosporin, Subalin e Gynesporin (“Zabolotny Institute of Microbiology and Virology”, Ucrânia) contendo *B. subtilis* e combinações de cepas de *Bacillus* são utilizados para uso animal (Hong et al., 2005).

5.3. Probióticos Esporulados em Alimentos destinado ao consumo humano

Os alimentos são veículos ideais para probióticos para consumo humano. É possível afirmar que os alimentos são melhores carreadores de probióticos do que os suplementos, uma vez que a maioria dos alimentos protegem os probióticos durante a passagem pelo TGI, o que está relacionado às suas propriedades tamponantes e à presença de nutrientes que podem ser utilizados pelos micro-organismos (Ranadheera et al., 2010). Na verdade, a multiplicação e a sobrevivência dos probióticos também são afetadas pelas propriedades físico-químicas das matrizes alimentares. Assim, além de fornecer nutrientes vitais para a manutenção da viabilidade e atividade metabólica dos probióticos, os alimentos podem conter compostos prebióticos, os quais podem influenciar positivamente a viabilidade e a funcionalidade dos micro-organismos benéficos (Homayoni Rad et al., 2012; Makinen et al., 2012; Ranadheera et al., 2010).

A aplicação das cepas probióticas esporuladas em alimentos é algo recente e ainda não são concorrentes com os produtos adicionados de probióticos tradicionais (Jao et al., 2011; Jafari et al., 2017). A preocupação com o estado metabólico desses micro-organismos na deterioração dos alimentos é um fator importante. Assim, os probióticos esporulados não devem germinar na matriz alimentar, pois podem deteriorar o alimento se houver condições favoráveis. Portanto, a escolha da matriz alimentar é dependente da espécie ou da cepa utilizada como probiótico (Ranadheera et al., 2010).

Bacillus coagulans GanedenBC30, patenteado pela empresa Ganeden Biotech, foi utilizado como cepa para a elaboração de pão probiótico pela empresa Heinen's (Cleveland, Ohio, USA), a qual garante que a ingestão diária de uma fatia desse produto fornece uma dose suficiente de probióticos que leva a efeitos benéficos, como melhora da saúde intestinal e modulação do sistema imune (Cleveland et al., 2009). Essa cepa probiótica está presente em diversos tipos de alimentos, incluindo chás, sucos, biscoitos, cereais, café, sorvete, suplemento dietético e alimentar, chocolate, cappuccino, pães, iogurtes, farinhas, condimentos, barras de cereais, todos comercializados fora do Brasil. Sua ampla aplicação em diversos alimentos está relacionada à

elevada resistência de seus esporos a diferentes processamentos, tais quais alta temperatura, congelamento, desidratação, forneamento, entre outros (Keller et al., 2010).

De acordo com um estudo publicado por Jao et al. (2011), foi demonstrada a redução da viabilidade do probiótico *Bacillus coagulans* da Ganeden BC30 adicionado a diferentes produtos de panificação armazenados em temperatura ambiente, os quais exibiram variação de valores de pH e índices de acidez. Ainda de acordo com mesmos autores, quando os produtos desidratados foram mantidos sob refrigeração (4°C), observou-se um maior tempo de viabilidade da cultura microbiana, devido à presença de um ambiente desfavorável para germinação dos esporos.

6. Aspectos tecnológicos da aplicação de probióticos esporulados em alimentos

A suplementação de alimentos processados com micro-organismos probióticos é uma realidade na indústria de alimentos, e vem ao encontro das necessidades do consumidor moderno, o qual procura no alimento não apenas uma fonte de nutrientes para a manutenção das funções vitais do organismo, mas também efeitos adicionais benéficos à saúde (Granato, Branco, Cruz, Faria, & Shah, 2010).

Independente da matriz alimentícia utilizada, limitações têm sido observadas no que diz respeito à adição de bactérias probióticas. Restrições impostas a etapas de tratamento térmico, as quais são rotineiramente utilizadas pelas indústrias alimentícias para assegurar a segurança microbiológica do produto final e, conseqüentemente, prevenir riscos à saúde do consumidor, têm sido descritas (Ranadheera et al., 2010). De fato, no mundo, as principais cepas probióticas utilizadas em produtos alimentícios pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Heller, 2001) as quais apresentam limitada capacidade proteolítica, baixa tolerância a valores baixos de pH e elevados níveis de oxigênio (Komatsu, Carolina, Buriti, Marta, & Saad, 2008), além de não formarem esporos, o que as torna altamente susceptíveis às temperaturas normalmente utilizadas no processamento industrial de alimentos, sendo necessária, algumas vezes, a realização de adaptações na rotina industrial.

A adição de *Bacillus* probióticos abre perspectivas para a ampliação da gama de matrizes alimentícias que podem ser utilizadas como veículos de bactérias probióticas. Além da capacidade de formação de esporos, os *Bacillus* são aeróbios ou anaeróbios facultativos, o que torna mínima a preocupação com o gás oxigênio, o qual é capaz de permear os sistemas de embalagens plásticas (Cruz et al., 2013). Nesse contexto, produtos alimentícios que são submetidos a tratamentos térmicos drásticos (elevados binômios tempo/temperatura) ao longo

do seu processamento, incluindo queijos processados, pães e biscoitos, sucos e bebidas lácteas UHT, patês e conservas cárneos, passam a ser potenciais candidatos a adquirirem o *status* de alimento probiótico.

Entretanto, algumas considerações gerais fazem-se pertinentes, quando se deseja desenvolver um alimento processado suplementado com uma cepa *Bacillus* comprovadamente probiótica. Dentre elas, o nível de inóculo a ser adicionado e a maneira como deve ser realizado no produto, bem como possíveis interações com outras cepas probióticas (Sorokulova, 2013).

Em primeiro lugar, a quantidade de inóculo a ser adicionada no produto alimentício deve ser otimizada através de testes preliminares. Embora elevados inóculos estejam dentro da faixa recomendada para que o(s) micro-organismo exerça(m) efeito(s) benéfico(s) à saúde do consumidor, esses podem, simultaneamente, funcionar como agente deteriorante para o produto ao longo de seu período de armazenamento, prejudicando seus atributos sensoriais como aparência, sabor e textura. Isso implica, de forma resumida, que ao serem testadas diferentes quantidades da cepa de *Bacillus* que se deseja inocular no alimento, deve-se realizar monitoramento periódico da sua viabilidade durante todo o período proposto de vida de prateleira a fim de se averiguar se ocorrerá a germinação dos seus esporos ao longo da estocagem do produto (Cutting, 2011).

É importante salientar que, normalmente, as culturas probióticas esporuladas são comercializadas na forma liofilizada para adição direta no tanque de processamento (direct vat set, DVS). Sendo assim, é de se esperar que, ao entrarem em contato com o alimento, elas se desenvolvam e atinjam níveis quantitativos suficientes para compensar eventuais perdas ao longo das etapas de estresse presentes durante o processamento industrial. Dado que as temperaturas normalmente utilizadas nas etapas de tratamento térmico são suficientes para a ativação e conseqüente germinação dos esporos de *Bacillus*, novamente recomenda-se a execução de experimentos prévios empregando-se diferentes quantidades iniciais de esporos de *Bacillus* e enumerando suas populações imediatamente após terem sido expostos às condições normais de tratamento térmico presentes no processamento do produto alimentício. Assim, será possível determinar a quantidade de esporos de *Bacillus* viável imediatamente após a execução daquela etapa (Cutting, 2011).

De fato, em um produto alimentício, é interessante a manutenção da viabilidade de esporos de *Bacillus* spp. com populações próximas àquelas inoculadas inicialmente, sem que ocorra sua germinação, mantendo viável até a sua chegada no intestino.

Assim, é imprescindível ressaltar a necessidade de um monitoramento rígido das condições de armazenamento do produto alimentício, visto que o abuso dessas condições pode

proporcionar a germinação dos esporos, o que contribui de forma negativa para a qualidade do produto alimentício (Cutting, 2011). Finalmente, é recomendado como para qualquer outro produto alimentício, a realização de testes sensoriais ao longo do período de armazenamento do produto – de preferência no início e ao final de sua vida de prateleira a fim de verificar se a cepa probiótica é capaz de interferir nos atributos sensoriais do produto. Como regra geral, um produto probiótico deve apresentar características sensoriais similares em relação ao seu produto convencional (Cruz et al., 2010).

Recentemente, o desenvolvimento de novos alimentos probióticos tem despertado muito interesse e, assim, a indústria de alimentos tem investido maciçamente no desenvolvimento de novos produtos, incluindo sorvetes, queijos, chocolates, bebidas, cereais e produtos hortícolas (Homayoni Rad et al., 2012). É importante que o produto probiótico seja utilizado no dia-a-dia do consumidor para que a ingestão desses micro-organismos ocorra de maneira contínua e leve aos efeitos benéficos almejados (Ranadheera et al., 2010).

6.1. Produtos lácteos

Tradicionalmente, entre os consumidores de todo mundo, os produtos lácteos constituem a classe de alimentos líder/mais popular para a adição de cepas probióticas devido à sua boa aceitação, por ser um produto nutritivo e que promova bem-estar (Cruz, Faria, & Van Dender, 2007; Heller, 2001), além de razões tecnológicas intrínsecas ao seu processamento, como a existência de uma etapa de fermentação, a qual tornou a etapa de adição da(s) cultura(s) probiótica(s) uma questão de fácil solução para as indústrias produtoras desses alimentos (Granato et al., 2010). De fato, inúmeros benefícios são atribuídos à ingestão de produtos lácteos contendo bactérias probióticas, como melhora do sistema imune, dos níveis do perfil lipídico, efeitos antioxidantes ao corpo, devido à presença de antioxidantes encontrados nas formulações (quando adicionada frutas) e prevenções de hipertensão (Lollo et al., 2012; Lollo et al., 2013; Lollo et al., 2015).

A adição de *Bacillus* probióticos a produtos lácteos, como o iogurte, pode representar uma vantagem interessante, devido à boa tolerância de seus esporos a baixos valores de pH da fermentação, tornando-se uma vantagem, evitando redução de sua viabilidade devido aos ácidos liberados por *Lactobacillus bulgaricus* (cultura *starters*) presente nesse alimento, o qual torna-se difícil a existência de alguns micro-organismos probióticos sensíveis à acidez ao longo da estocagem do produto (Lollo et al., 2013). Ainda assim, aliada a seu metabolismo anaeróbio facultativo pode resultar em minimização de problemas adicionais com o oxigênio que permeia

através do sistema de embalagem plástico comumente utilizado em leites fermentados (Cruz et al., 2007).

Adicionalmente, a capacidade de formação de esporos por *Bacillus* também pode representar novos caminhos para a produção de queijos maturados probióticos, já que, tradicionalmente, são necessários longos períodos durante a etapa de maturação, a qual é caracterizada por um decréscimo de água livre na matriz do queijo, representando um fator de estresse para os micro-organismos probióticos tradicionais (Cruz et al., 2009).

Por outro lado, alimentos congelados, tais quais sorvetes e sobremesas congeladas, são boas opções como veículos para probióticos uma vez que podem ser armazenados sob baixa temperatura, o que favorece a manutenção da viabilidade do probiótico até a hora de seu consumo (Silva et al., 2015). Porém, para que esses alimentos possam ser utilizados como matriz probiótica, deve-se considerar a probabilidade da ocorrência de danos às células vegetativas da cultura probiótica durante as etapas de congelamento e descongelamento, bem como durante a mistura e incorporação de ar ao processamento, na qual são empregadas tensões mecânicas que podem reduzir a viabilidade do micro-organismo no produto (Cruz et al., 2009; Ranadheera et al., 2010). A inoculação de esporos probióticos nesse produto alimentício, por outro lado, facilita o processamento do alimento, visto que os esporos são mais resistentes às etapas que afetam a viabilidade das células vegetativas.

6.2. Produtos cárneos

Produtos cárneos também podem ser considerados uma matriz adequada para a inoculação de esporos probióticos. Além de ser um dos componentes mais importante na dieta humana, a carne possui gordura e proteína que apresenta como substâncias importante para veículos dos probióticos na passagem do TGI. A utilização da carne como matriz probiótica deve ter cepas probióticas adequadamente selecionadas a fim de serem boas competidoras frente à microbiota autóctone da matriz cárnea (Kołożyn-Krajewska & Dolatowski, 2012). Além disso, a adição de culturas probióticas como *Bacillus*, pode representar uma importante estratégia global de reformulação da matriz cárnea perante os consumidores, tornando-a um produto com atributos funcionais. Para tanto, a cultura probiótica deve cumprir seu papel probiótico, sem, contudo, participar do processo fermentativo.

Os esporos são mais tolerantes aos níveis de sódio e nitrito presentes na formulação da carne, baixa atividade de água e ao pH obtido no final do processo fermentativo, fatores que afetam negativamente a viabilidade das bactérias probióticas lácticas (De Vuyst et al., 2008; Palamutoğlu & Kasnak, 2014).

Dessa maneira, o esporo probiótico utilizado deve apresentar baixa capacidade de influenciar os parâmetros de qualidade, os quais poderiam, hipoteticamente, contribuir para a rejeição do produto, tais quais a presença de ranço devido à oxidação lipídica, aumento do nível de proteólise do produto e perda de cor característica (Kołożyn-Krajewska & Dolatowski, 2012).

6.3. Produtos de origem vegetal

O crescente número de pessoas alérgicas e/ou intolerantes ao leite, aliados à tendência crescente de adoção de dietas vegetarianas, têm incentivado o consumo de alimentos de origem vegetal. Dentre aqueles, as frutas e os legumes são consideradas boas matrizes carreadoras de micro-organismos probióticos e podem fornecer-lhes substratos ideais, uma vez que contêm minerais, vitaminas, antioxidantes e fibras (Martins et al., 2010; Ranadheera et al., 2013; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010; Soukoulis et al., 2014).

O desenvolvimento de produtos de origem vegetal (sucos, chás, derivados de soja) contendo bactérias probióticas requer estudos mais aprofundados quanto aos aspectos sensoriais, uma vez que há diversos compostos presentes em frutas que, ao entrarem em contato com o metabolismo da cepa(s) probiótica(s), podem resultar em *off-flavors* observados ao longo do período de armazenamento do produto, o que pode ser minimizado quando se utiliza esporos, pois estes estão inativos (Granato et al., 2010).

6.4. Alimentos com baixa atividade de água

Finalmente, destaca-se o desenvolvimento de matrizes alimentícias emergentes, como chocolates e produtos de panificação (Homayoni Rad et al., 2012), em que as altas temperaturas utilizadas na conchagem e no forneamento, não constituem obstáculos para a utilização de esporos de *Bacillus* probióticos, desde que as recomendações prévias relacionadas ao nível de inóculo a ser adicionado desse microrganismo sejam estritamente seguidas.

Em estudo com linhaça triturada avaliou o quanto depende a viabilidade da cepa *L. rhamnosus* GG foi dependente da atividade de água, tendo sua concentração diminuída no alimento durante o tempo de seu armazenamento. É importante frisar que a redução da atividade de água em alimentos pode favorecer a extensão da vida de prateleira de produtos secos (Vesterlund et al., 2012). Esporos probióticos são bons candidatos à produção dessa classe de alimentos, devido a sua resistência e dormência por longos períodos.

7. Efeitos benéficos à saúde dos probióticos esporulados

Diferentes mecanismos são propostos para a ação dos probióticos no hospedeiro (Figura 1). O primeiro deles está relacionado à interação física do probiótico com o epitélio do TGI do hospedeiro, no qual ocorre a adesão às células da mucosa, seguidos de estímulos para a produção de muco e de células de defesa, além do reforço da barreira intestinal. O segundo mecanismo refere-se à estimulação (modulação e regulação) do sistema imune, por meio da produção de citocinas e imunoglobulinas, entre outros. Finalmente, o terceiro mecanismo está relacionado à interação direta bactéria-bactéria (probiótico-patógeno), ocorrendo competição entre si (EC) por sítios de adesão ao tecido epitelial e competição por nutrientes; além disso, os probióticos são capazes de sintetizar diversos compostos antimicrobianos (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, tensoativos, entre outros) (Salminen et al., 2010).

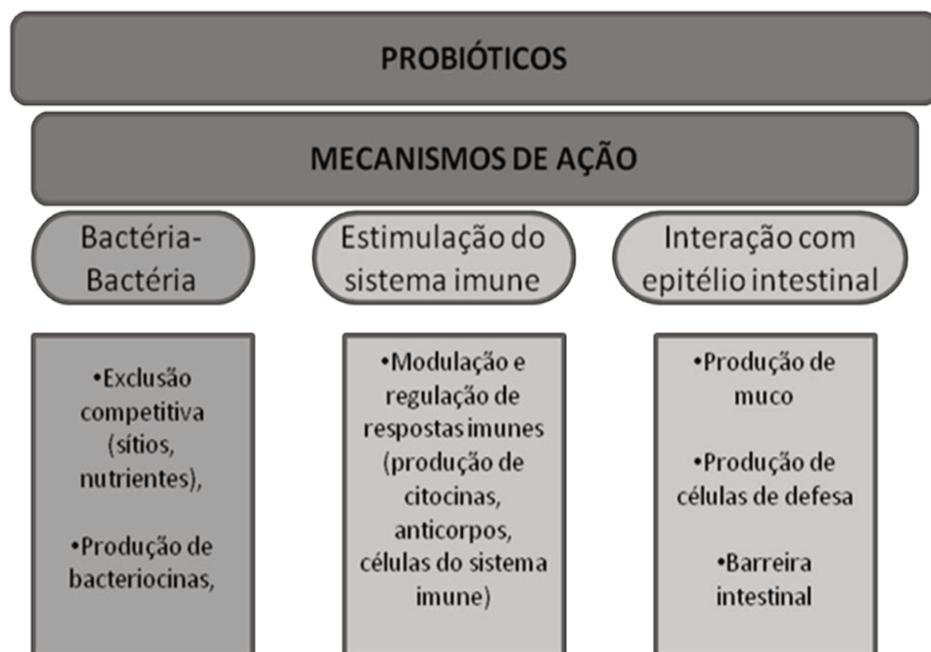


Figura 2. Mecanismo de ação dos probióticos.

Como resultado do consumo regular de alimentos probióticos, há evidências que comprovam que estes auxiliam na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal (Sarkar, 2013), podem ser úteis na prevenção e tratamento de doenças do TGI (Kajander *et al.*, 2008), respiratórias (Wang et al., 2004) e mentais (Yeon *et al.*, 2010), bem como no combate a infecções intestinais (Castillo et al., 2012). Os probióticos são capazes de produzir metabólitos favoráveis ao bem-estar do hospedeiro, tais como enzimas, vitaminas e aminoácidos essenciais

(Inatsu et al., 2006; Salvatti et al., 2003; Murillo & Villamil et al., 2011), auxiliar na digestão da lactose (Guo et al., 2010; He et al., 2008), prevenir a “diarréia do viajante” (Nithya & Halami, 2012), aliviar os sintomas da síndrome do intestino irritável (Nithya & Halami, 2012), reduzir a concentração de amônia e colesterol no sangue (Guo et al., 2010; Huang et al., 2010, Kim et al., 2002), normalizar a coagulação sanguínea (Sumi et al., 2005), auxiliar no restabelecimento da microbiota intestinal após tratamento com antibióticos (Cartman et al., 2007) e produzir substâncias antioxidantes (Meira, 2011). Além disso, os probióticos podem auxiliar no alívio de sintomas de artrite reumatóide (Mandel et al., 2010) e no tratamento de infecções no trato urinário (Borchert et al., 2008; Meroni et al., 1983), além de melhorar crises alérgicas em crianças e adultos (Morisset et al., 2011; Peng & Hsu, 2005; Ishida et al., 2005). Outros importantes efeitos relacionados aos probióticos são a prevenção de hipertensão (Jauhiainen et al., 2005) e diabetes (Tabuchi et al., 2003), atividade anti-carcinogênica (Thirabunyanon, Boonprasom e Niamsup, 2009), melhora dos quadros de ansiedade e depressão (Bravo *et al.*, 2011), modulação do sistema imune (O’Mahony et al., 2005) e prevenção de alergias alimentares e doenças atópicas, como asma, eczema e dermatite atópica (Kirjavainen, Salminen e Isolauri, 2003). Além desses, os probióticos podem ser utilizados no tratamento de diarréia em adultos e crianças (Allen et al., 2004) e para a prevenção de cáries dentárias (Krasse *et al.*, 2005). Recentemente, foram descritas indicações de uso de probióticos para o controle de queda capilar e acne (Foligné, Daniel e Pot, 2013).

Apesar do repertório considerável de conhecimentos adquiridos sobre os efeitos benéficos à saúde advindos do consumo de alimentos contendo cepas probióticas não esporuladas, o mesmo não ocorre em relação à ingestão de cepas probióticas esporuladas. No entanto, de acordo com dados obtidos com a utilização desses micro-organismos como suplemento alimentar animal, acredita-se que estejam envolvidos com a estimulação imunológica e a EC de patógenos (Cartman et al., 2007; Huang et al., 2013; Lippolis et al., 2013). Infelizmente, pouco se conhece sobre os reais mecanismos pelos quais essas bactérias exercem seus efeitos terapêuticos. Estudos têm demonstrando que o uso de probióticos esporulados, em substituição aos antibióticos, leva ao fortalecimento do sistema imune e melhoria do crescimento dos animais (Bader et al., 2012; Cutting, 2011; Shiravamaiah et al., 2011; Vieira, 2010). Em um estudo realizado por Permpoonpattana et al. (2012), sugeriu-se que os probióticos esporulados administrados a camundongos são capazes de suprimir agentes infecciosos como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella Enteritidis* (Permpoonpattana, Hong, Khaneja, & Cutting, 2012). Nos seres humanos, particularmente, *Bacillus spp.* são utilizados como medicamentos biológicos para a profilaxia de distúrbios gastrointestinais e como agentes

terapêuticos para o tratamento de infecções do trato urinário (Nithya et al., 2012). Na Tabela 4 estão relacionados os principais efeitos benéficos atribuídos às cepas probióticas esporuladas conhecidos até o presente momento.

Tabela 4. Efeitos benéficos de cepas probióticas esporuladas.

Microorganismo/Produto	Efeito Benéfico	Referência
<i>Bacillus clausii</i>	Modulação da resposta imune em crianças alérgicas (Redução de sintomas nasais e influência no padrão de citocinas) ^a	Ciprandi <i>et al.</i> (2004)
<i>Bacillus clausii</i>	Redução da duração de infecções respiratórias em crianças ^a	Marseglia <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus clausii</i>	Redução de efeitos colaterais gastrintestinais decorrentes do tratamento medicamentoso de <i>Helicobacter pylori</i> e aumento da tolerância ao tratamento com antibiótico ^a	Nista <i>et al.</i> (2004)
<i>Bacillus coagulans</i> (Lactospore, Sabinsa)	Redução de diarreias agudas e crônicas, diarreia infantil por rotavírus, constipação, e inibição de enzimas envolvidas na síntese de colônias carcinogênicas do cólon ^a	Kamarei (2012)
<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086	Digestão de lactose, frutose e proteína do leite, proporcionando alívio nos sintomas de intolerância a lactose <i>in vitro</i>	Maathuis, Keller e Farmer (2010)
<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086	Melhoria da consistência das fezes e prolongamento da sobrevivência de camundongos infectados com colite induzida por <i>Clostridium difficile</i> ^c	Fitzpatrick <i>et al.</i> (2011)
<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086	Modulação de processos inflamatórios no intestino (efeitos anti-inflamatórios combinados com a indução direta de IL-10, ou seja, em apoio de um sistema imunológico saudável) <i>in vitro</i>	Jensen <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	Prevenção de câncer de colón por meio da supressão do crescimento de células cancerosas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ^c	Ma <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	Redução da mortalidade, da gravidade da colite (perda de peso, diarreia e danos na mucosa), da expressão de moléculas inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral- α e aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 no cólon de camundongo inflamado, supressão da apoptose tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> e proliferação das células epiteliais	Im <i>et al.</i> , (2009)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9799	Redução da frequência de infecções no trato urinário em pacientes idosos com fluxo urinário lento (idade média 75,5 anos) ^a	Meroni <i>et al.</i> (1983)
<i>Bacillus subtilis</i> 2335	<i>Bacillus subtilis</i> 2335 associado à ciclofosfamida aumentou a inibição do crescimento e de metástase de tumores (Combinação de propriedades antibacterianas e antivirais) ^c	Kaur, Chopra e Saini (2002)

<i>Bacillus subtilis</i> NC11	Atividade protetora contra infecção por <i>Salmonella enteritidis</i> por meio de exclusão competitiva no sítio de adesão e produção de substâncias antimicrobianas em células epiteliais intestinais (<i>in vitro</i>)	Thirabunyanon e Thongwittaya (2012)
<i>Bacillus subtilis</i> PB6	Modulação dos mediadores de primeira linha de inflamação (Indução de quantidades substanciais e moderadas de IL-10, TNF α e níveis reduzidos de IL-12 e INF γ) em camundongos com colite induzida, demonstrando potencial anti-inflamatório ^c	Foligné <i>et al.</i> (2012)
Cápsulas contendo <i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086	Aumento nos níveis de marcadores imunológicos, como citocinas (IL-6, IL-8, e INF- γ) e células CD3CD69 ^a	Kimmel <i>et al.</i> (2010)
Cápsulas contendo <i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086	Melhoria da dor e da capacidade de andar, além de bem-estar de pacientes com artrite reumatóide (alívio dos sintomas da doença) ^a	Mandel, Eichas e Holmes (2010)
Cápsulas contendo <i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086	Melhoria nos sintomas de síndrome do intestino irritável, como inchaço e dores abdominais ^a	Dolin (2009); Hun (2009)
Enxaguante bucal contendo <i>Bacillus subtilis</i> E300	Normalização da microbiota oral, ativação das células de fibroblastos gengivais, indução de produção de citocinas e redução das populações de patógenos periodontais em pacientes com periodontite ^a	Tsubura <i>et al.</i> (2009)
Leite contendo <i>Bacillus subtilis</i> natto	Aumento no desempenho de crescimento, melhorando a média de ganho de peso e a eficiência alimentar, além de estimular a secreção de IgG sérico e níveis de citocinas Th1, incluindo IFN- γ (ativação do sistema imunológico e aumento da imunidade) ^f	Sun, Wang e Zhang (2010)
Malte contendo <i>Bacillus subtilis</i> natto RG4365	Efeito sinérgico de <i>Bacillus subtilis</i> natto e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> elevou a quantidade de ácido linoléico e linolênico, conteúdo de minerais (ferro e zinco) e intensificou a atividade antimicrobiana contra <i>Vibrio cholerae in vitro</i>	Vidyalaxme <i>et al.</i> (2012)
Suplemento contendo <i>Bacillus pumilus</i> SE5	Modulação da microbiota intestinal ^d	Sun <i>et al.</i> (2011)
Suplemento contendo <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	Melhoria do equilíbrio da microbiota intestinal ^g	Hung <i>et al.</i> (2012)
Suplemento contendo <i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD	Modulação de funções fisiológicas, incluindo perfil lipídico e antioxidante em ratos hipercolesterolêmicos ^b	Paik, Park e Park (2005)

Suplemento contendo <i>Bacillus subtilis</i>	Melhoria do desempenho reprodutivo em termos de maior índice gonadossomático, fecundidade, sobrevivência e características morfométricas ^d	Ghosh, Sinha e Sahu (2007)
Suplemento contendo <i>Bacillus subtilis</i>	Melhoria do desempenho de crescimento e regulação do metabolismo lipídico em gordura subcutânea de suínos, por meio da manipulação da proporção entre Bacteroidetes e Firmicutes no intestino ^h	Cui <i>et al.</i> (2013)
Suplemento contendo <i>Bacillus subtilis</i> DB9011	Melhoria dos sintomas causados por infecção por <i>Escherichia coli</i> como disfunção erétil, edema na pálpebra e região ileocecal ^h	Tsukahara <i>et al.</i> (2013)

^a Observado em humanos; ^b Observado em ratos; ^c Observado em camundongos; ^d Observado em peixes; ^e Observado em coelhos; ^f Observado em bezerros; ^g Observado em frangos; ^h Observado em suínos.

De fato, uma compreensão mais aprofundada sobre os mecanismos envolvidos na modulação da microbiota e do sistema imunológico por meio de probióticos depende de esforços contínuos para estabelecimento de biomarcadores adequados de saúde e a realização de ensaios clínicos para a devida comprovação das alegações de saúde, uma vez que os efeitos benéficos são cepa-dependentes, exigindo a utilização de cepas ideais para fins específicos. Dessa maneira, haverá maior confiabilidade e uma base mais sólida para os resultados obtidos, apoiando o potencial uso de probióticos e prebióticos na prática clínica (Martinez et al., 2015).

8. Conclusão

Probióticos esporulados possuem um grande potencial de aplicação na indústria alimentícia, visto que apresentam elevada resistência a processos tecnológicos e mecanismos fisiológicos do organismo, os quais seriam letais para as BAL. Porém, sua utilização ainda é restrita uma vez que mais estudos precisam ser realizados para avaliar sua segurança considerando que há diversos micro-organismos esporulados patogênicos ou deteriorantes de alimentos. Além disso, é necessário investigar a real influência de diferentes matrizes alimentícias na sobrevivência e funcionalidade desses micro-organismos. Ademais, é preciso avaliar se o emprego de diferentes combinações de cepas probióticas apresenta ou não atividade sinérgica. Também é imprescindível acompanhar a viabilidade dos esporos probióticos inoculados em alimentos pois esses podem germinar durante o processamento ou no período de armazenamento desses produtos afetando suas atividades benéficas ao hospedeiro. Finalmente, é necessário avaliar o comportamento de probióticos esporulados no TGI e em outros sítios anatômicos, determinando-se os mecanismos de ação envolvidos e correlacionando-os com os principais efeitos benéficos à saúde decorrentes de seu consumo.

9. Referências bibliográficas

- Abdou, M. A., Awany, N. M., & Abou Zeid, A. A. (2012). Inhibition of enterotoxigenic strains *Bacillus cereus* GT1 and *Staphylococcus aureus* S1 isolated from double white cream cheese. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 7(3), 221–228. <http://doi.org/10.1007/s00003-012-0772-1>
- Abriouel, H., Franz, C. M. a P., Ben Omar, N., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–32. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2008). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA (2016). Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>
- Allen, S.J., Okoko, B., Martinez, E., Gregorio, G. & Dans, L.F., (2004). Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Ver.*
- Aureli, P., Fiore, A., Scalfaro, C., Casale, M., & Franciosa, G. (2010). National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 265–73. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.016>
- Bader, J.; Albin, A.; Stahl, U. (2012). Spore-forming bacteria and their utilization as probiotics. *Beneficial Microbes*, 3, 67-75.
- Ballus, C. A., Klajn, V. M., Cunha, M. F., de Oliveira, M. L., & Fiorentini, Â. M. (2010). Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: Revisão. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 28(1), 85–96.
- Baril, E.; Coroller, L.; Couvert, O.; Leguerinel, I.; Postollec, F.; Boulais, C. & Mafart, P. (2012). Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology*, 30,1, 29-36.
- Bergeys (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*.9 ed. Editora Baltimore : Williams & Wilkins,
- Borchert, D., Sheridan, L., Papatsoris, A., Faruquz, Z., Barua, J. M., Junaid, I. & Buchholz, N. (2008). Prevention and treatment of urinary tract infection with probiotics: Review and research perspective. *Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India*, 24(2), 139–144.
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J. & Cryan, J.F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *PNAS* 20, 16050–16055.
- Byrne, B., Dunne, G., & Bolton, D. J. (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiology*, 23(8), 803–808. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2006.02.002>
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M. & Nguyen-Thé, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*, 43(7), 1885–1894. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.024>
- Cartman M, Ragione L. & Woodward M.J. (2007) Bacterial spore formers as probiotics for poultry. *Food Sci Technol Bull*, 4, 21–30.

- Castillo, N.A., LeBlanc, A.M., Galdeano, C.M. & Perdigón, G. (2012). Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis Immune mechanisms involved. *Food Research International* 45, 831–841.
- Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2015). Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. *International Dairy Journal*, 41, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.021>
- Cavazzoni, V., Adami, a, & Castrovilli, C. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *British Poultry Science*, 39(4), 526–9. <http://doi.org/10.1080/00071669888719>
- Chaucheyras-Durand, F. & H. Durand. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microb.* 1, 3–9.
- Chr-Hansen. Probióticos. Acesso em: 02 de maio de 2017. Disponível em: <<http://www.chr-hansen.com.br/produtos/laticinios/probioticos.html>>.
- Ciprandi, G., Tosca, M.A., Milanese, M., Caligo, G. & Ricca, V. (2004). Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *Bacillus clausii* administration: a pilot study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 15, 148-151.
- Coelho, J. G. (2013). Potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus*. Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Cruz, a. G., Castro, W. F., Faria, J. a F., Bolini, H. M. a, Celeghini, R. M. S., Raices, R. S. L. & Mársico, E. T. (2013). Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. *Food Research International*, 51(2), 723–728. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.028>
- Cui, C., Shen, C.J., Jia, G. & Wang, K.N. (2013). Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. *Genet. Mol. Res.* 12, 1766–76.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214–20. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Da Cruz, A. G., Faria, J. D. a F., & Van Dender, A. G. F. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40(8), 951–956. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.05.003>
- Da Cruz, A. G., Fonseca Faria, J. D. A., Isay Saad, S. M., André Bolini, H. M., Sant’Ana, A. S., & Cristianini, M. (2010). High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 483–493. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.006>
- Da, K., Chaves, S., & Partir, I. A. (2009). Karina da silva chaves avaliação de características probióticas e de segurança de.

- Davidson, R.H., Duncan, S.E., Hackney, C.R., Eigel, W.N. & Boling, J.W. (2000). Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J. Dairy Sci.*, Savoy, 83(4), 666-673.
- Dolin, B.J.(2009). Effects of a proprietary *Bacillus coagulans* preparation on symptoms of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 31, 655-659.
- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use, 70(4), 2161–2171. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161>
- Durkee, D.L. (2010). Coming out of the dairy case: New developments in shelf stable probiotic foods. <http://www.foodmaster.com>
- Endres, J. R., Clewell, a, Jade, K. a, Farber, T., Hauswirth, J., & Schauss, a G. (2009). Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(6), 1231–8. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.018>
- Fakhry, S., Sorrentini, I., Ricca, E., De Felice, M., & Baccigalupi, L. (2008). Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 2178–86. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03934.x>
- Felicio, T. L., Esmerino, E. a., Vidal, V. a S., Cappato, L. P., Garcia, R. K. a, Cavalcanti, R. N. & Cruz, a G. (2016). Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, 196, 628–637. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.102>
- Fitzpatrick, L.R., Small, J.S., Greene, W.H., Karpa, K.D. & Keller, D. (2011). *Bacillus coagulans* GBI-30 (BC30) improves indices of *Clostridium difficile*-Induced colitis in mice. *Gut Pathog.* 3, 16.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.-FAO/WHO (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 34. Disponible em: ftp://ftp.fao.org/esn/food/probioreport_en.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization -FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report a Joint FAO/WHO Working Group. London, Ontario, Canada. FAO/WHO, April 30 and May 1, 1-11.
- Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), 284–292. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>
- Foligné, B., Peys, E., Vandekerckhove, J., Van Hemel, J., Dewulf, J., Breton, J., & Pot, B. (2012). Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6

- substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. *Clinical Nutrition* (Edinburgh, Scotland), 31(6), 987–94. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.05.016>
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl , S15–28. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
- Gama, B. A. (2008). Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. Dissertação (Mestrado) em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Gardiner, G. E., O’Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. a, Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., & Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2605–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110587&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gepner, Y, Hoffman, J.R., Shemesh, E., Stout, J.R., Church,D.D., Varanoske, A.N., Zelicha, H., Shelef, I., Chen, Y., Frankel, H., Ostfeld, I. (2016). The Combined Effect of *Bacillus Coagulans* GBI-30, 6086 and HMB Supplementation on Muscle Integrity and Cytokine Response during Intense Military Training. *Journal of Applied Physiology*. DOI: 10.1152/jappphysiol.01116.2016
- Ghosh, S., Sinha, A. & Sahu, C. (2007). Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research* 38, 518-526.
- Gil-Turnes, C., Santos, A.F., Cruz, F. W. & Monteiro, A.V., (1999) . Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot 11–14. *Revista de Microbiologia* (1999) 30:11-14
- Gomes da Cruz, A., Alonso Buriti, F. C., Batista de Souza, C. H., Fonseca Faria, J. A., & Isay Saad, S. M. (2009). Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 344–354. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.001>
- Graham, G. S., Odlaug, T. E., & Caputo, R. A. (1981). Heat Resistance and Population Stability of Lyophilized *Bacillus subtilis* Spores Heat Resistance and Population Stability of Lyophilized *Bacillus subtilis* Spores.
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. D. A. F., & Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455–470. <http://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
- Green, D. H., Wakeley, P. R., Page, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., Simon, M., & Cutting, S. M. (1999). Characterization of Two *Bacillus* Probiotics Characterization of Two *Bacillus* Probiotics, 65(9), 8–12.
- Guo, X., Li, D., Lu, W., Piao, X., & Chen, X. (2006). Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis*

- MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(2), 139–46. <http://doi.org/10.1007/s10482-006-9067-9>
- Guo, X.H.; Kim, J.M.; Nam, H.M. & Parl, S.Y. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16, 4, 321–326.
- He, T., Priebe, M.G., Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H.J.M., Raangs, G.C., Antoine, J.M., Welling, G.W & Vonk, R.J. (2008). Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 595–604.
- Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods : product characteristics and, 73(2), 374–379.
- Hendricks, G., & Guo, M. (2006). Significance of Milk Fat in Infant Formulae, 2, 467–479.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(August 2014), 9. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hosoi, T. & Kiuchi, K. (2004). Production and probiotic effects of Natto. In: Ricca, E., Henriques, A.O., Cutting, S.M. (Eds.), *Horizon Bioscience*, 143e154.
- Homayoni Rad, A., Mehrabany, E. V., Alipoor, B., Mehrabany, L. V., & Javadi, M. (2012). Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28(7-8), 733–6. <http://doi.org/10.1016/j.nut.2012.01.012>
- Hong, H. a, Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 813–35. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001>
- Hong, H. a, Huang, J.-M., Khaneja, R., Hiep, L. V, Urdaci, M. C., & Cutting, S. M. (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 510–20. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>
- Huang, H.-Y., Huang, S.-Y., Chen, P.-Y., King, V. A.-E., Lin, Y.-P., & Tsen, J.-H. (2007). Basic characteristics of *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647 for potential probiotic properties. *Current Microbiology*, 54(5), 396–404. <http://doi.org/10.1007/s00284-006-0496-5>
- Huang, Q., Xu, X., Mao, Y., Huang, Y., Rajput, I.R. & Li, W., (2013). Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages. *Anim. Sci. J.* 84, 247–52.
- Huang, Y., Wang, J., Cheng, Y. & Zheng, Y.(2010). The hypocholesterolaemic effects of *Lactobacillus acidophilus* American Type Culture Collection 4356 in rats are mediated by

- the down-regulation of Niemann-Pick C1-Like 1. *British Journal of Nutrition* 104, 807–812.
- Hun, L. (2009). *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgraduate Medicine* 121, 119-124.
- Hung, A.T., Lin, S., Yang, T., Chou, C., Liu, H., Lu, J., Wang, B., Chen, S. & Lien, T. (2012). Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. *Animal Production Science* 52, 874–879.
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., & Daube, G. (2013). Microbial characterization of probiotics--advisory report of the Working Group "8651 Probiotics" of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(8), 1479–504. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201300065>
- Hyronimus, B. et al. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 61, 193-197, 2000.
- Im, E., Choi, Y.J., Pothoulakis, C. & Rhee, S.H. (2009). *Bacillus polyfermenticus* ameliorates colonic inflammation by promoting cytoprotective effects in colitic Mice. *Journal of Nutrition* 139, 1848–1854.
- Inatsu, Y.; Nakamura, N.; Yuriko, Y.; Fushimi, T.; Watanasiritum, L. & Kawamoto, S. (2006). Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 237–42.
- Ishida, Y.; Nakamura, F.; Kanzato, H.; Sawada, D.; Hirata, H.; Nishimura, A. & Kajimoto, O.; Fujiwara, S. (2005). Clinical effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Dairy Science*, 88, 527–533.
- Jafari M, Mortazavian AM, Hosseini H, Safaei F, Mousavi Khaneghah A, Sant'Ana AS (2017) Probiotic *Bacillus*: Fate during sausage processing and storage and influence of different culturing conditions on recovery of their spores. *Food Res Int* 95:46–51. doi: 10.1016/j.foodres.2017.03.001
- Jäger R, Shields K a., Lowery RP, De Souza EO, Partl JM, Hollmer C, Purpura M, Wilson JM (2016) Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *PeerJ* 4:e2276. doi: 10.7717/peerj.2276
- Janstová, B. & Lukasová, J. (2001). Heat resistance of *Bacillus* spp . spores isolated from cow's milk and farm environment *Acta Veterinária Brno*, 70, 179-184.
- Jao, C.-L., Huang, S.-L., Wu, S.-C., & Kuo-Chiang, H. (2011). The study on SFLAB GanedenBC30 viability on baking products during storage. *Procedia Food Science*, 1(Icef 11), 1601–1609. <http://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.237>
- Jauhiainen, T., Collin, M., Narva, M., Cheng, Z.J., Poussa, T., Vapaatalo, H. & Korpela, R., (2005). Effect of long-term intake of milk peptides and minerals on blood pressure and arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Milchwissenschaft* 60.

- Jayanthi N, Sudha M R (2015) *Bacillus clausii* - The Probiotic of Choice in the Treatment of Diarrhoea. *J Yoga Phys Ther* 05:1–4. doi: 10.4172/2157-7595.1000211
- Jensen, G.S., Benson, K.F., Carter, S.G. & Endres, J.R. (2010). GenedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC Immunology* 11.
- Kajander, K., Myllyluoma, E., Rajilic –Stojanovic, M., Kyronpalo, S., Rasmussen, M., Jarvenpaa, S., Zoetendal, E.G., Vos, W.M.D., Vapaatalo, H. & Korpela, R. (2008). Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27, 48–57.
- Kamarei, M.M.R. (2012). *Bacillus coagulans*: Probiotic of choice. *Prebiotics/Probiotics*, 19-21.
- Kaur, I.P., Chopra, K. & Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 1-9.
- Keller, D., Farmer, S., McCartney, A. & Gibson, G. (2010). *Bacillus coagulans* as a probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. ISSN 1476-2137
- Kim, K.P.; Rhee, C.H. & Park, H.D. (2002). Degradation of cholesterol by *Bacillus subtilis* SFF34 isolated from Korean traditional fermented flatfish. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 468–72.
- Kimmel, M., Keller, D., Farmer, S. & Warrino, D.E. (2010). A controlled clinical trial to evaluate the effect of GenedenBC30 on immunological markers. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 32, 129-132.
- Kirjavainen, P.V., Salminen, S.J. & Isolauri, E., (2003). Probiotic Bacteria in the Management of Atopic Disease: Underscoring the Importance of Viability. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 36, 223–227.
- Kołożyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 47, 1761–1772. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.017>
- Komatsu, T. R., Carolina, F., Buriti, A., Marta, S., & Saad, I. (2008). Inovação , persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos, 44.
- Krasse, P, Carlsson, B., Dahl, C., Paulsson, A., Nilsson, A. & Sinkiewicz, G. (2005). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish Dental Journal* 30, 55–60.
- Lefevre M, Racedo SM, Denayrolles M, Ripert G, Desfoug??res T, Lobach AR, Simon R, P??lerin F, J??sten P, Urdaci MC (2017) Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 83:54–65. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.11.010

- Li, X., Qiang, L. & Xu, C. (2008). Effects of Supplementation of Fructooligosaccharide and / or *Bacillus Subtilis* to Diets on Performance and on Intestinal Microflora in Broilers Abstract Zusammenfassung Introduction It is now well known that there is a need to design feeding strategies th 51, 64–70.
- Lippolis, R., Siciliano, R. A., Mazzeo, M. F., Abbrescia, A., Gnoni, A., Sardanelli, A. M., & Papa, S. (2013). Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains. *Proteome Science*, 11(1), 28. <http://doi.org/10.1186/1477-5956-11-28>
- Lollo, P. C. B., Cruz, a G., Morato, P. N., Moura, C. S., Carvalho-Silva, L. B., Oliveira, C. a F. & Amaya-Farfan, J. (2012). Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3549–58. <http://doi.org/10.3168/jds.2011-5124>
- Lollo, P. C. B., De Moura, C. S., Morato, P. N., Cruz, A. G., Castro, W. D. F., Betim, C. B. & Amaya-Farfan, J. (2013). Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage. *Food Research International*, 54(1), 118–124. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.003>
- Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Moura, C. S., Almada, C. N., Felicio, T. L., Esmerino, E. a. & Cruz, A. G. (2015). Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Research International*, 76, 611–617. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.015>
- Ma, E.L., Choi, Y.J., Choi, J., Pothoulakis, C., Rhee, S.H. & Im, E. (2010). The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *Int. J. Cancer* 127, 780–90.
- Maathuis, A.J.H., Keller, D. & Farmer, S. (2010). Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. *Beneficial Microbes* 1, 31-36.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2004). *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 608.
- Mahdhi, A. (2012). Probiotic properties of *Brevibacillus brevis* and its influence on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval rearing. *African Journal of Microbiology Research*, 6(35), 6487–6495. <http://doi.org/10.5897/AJMR12.1201>
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhlid, R., & Ananta, E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology*, 162(4), 356–65. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.006>
- Mandel, D.R., Eichas, K. & Holmes, J.(2010). *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapyfor relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial. *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 1.
- Marcos, P., & Gomes, J. P. (2013). Gênero *Bacillus* spp.

- Martinez, R. C. R., Bedani, R., & Saad, S. M. I. (2015). Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition*, 1–23. <http://doi.org/10.1017/S0007114515003864>
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O. a., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13. <http://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764–770. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>
- Marseglia, G. L., Tosca, M., Cirillo, I., Licari, A., Leone, M., Marseglia, A. & Ciprandi, G. (2007). Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(1), 13–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1936284&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Maruo, T., Sakamoto, M., Toda, T. & Benno, Y. (2006). Monitoring the cell number of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC in human feces by real-time PCR with strainspecific primers designed using the RAPD technique. *International Journal of Food Microbiology* 110, 69–76.
- Meira, S.M.M. (2011). Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha. Dissertação de Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Mello, H. De. (2012). *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito probiótico.
- Meroni, P.L., Palmieri, R., Barcellini, W., de Bartolo, G. & Zanussi, C.(1983). Effect of long-term treatment with *Bacillus subtilis* on the frequency of urinary tract infections in older patients. *Chemioterapia II*, 2,142-144.
- Miller, L. E., & Ouwehand, A. C. (2013). Probiotic supplementation decreases intestinal transit time: Meta-analysis of randomized controlled trials. *World Journal of Gastroenterology*, 19(29), 4718–4725. <http://doi.org/10.3748/wjg.v19.i29.4718>
- Mongkolthanaruk, W. (2012). Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1597–604. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221520>
- Montville, T.J. & Sapers, G.M. (1981) Thermal resistance of spores from pH, elevating strains of *Bacillus licheniformis*. *Journal of food science* 1981;46:1710-1712.

- Morisset, M.; Aubert-Jacquín, C.; Soulaines, P.; Moneret-Vautrin, D.A. & Dupont, C.(2011). A non-hydrolyzed, fermented milk formula reduces digestive and respiratory events in infants at high risk of allergy. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65, 175–183.
- Murillo, I., & Villamil, L. (2011). *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 01(01), 1–5. <http://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-007>
- Nista, E.C., Candelli, M., Cremonini, F., Cazzato, I. A., Zocco, M. A., Franceschi, F., Cammarota, G., Gasbarrini, G. & Gasbarrini, A.(2004). *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 1181–8.
- Nithya, V., & Halami, P. M. (2012). Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Annals of Microbiology*, 63(1), 129–137. <http://doi.org/10.1007/s13213-012-0453-4>
- Nithya, V., Muthukumar, S. P., & Halami, P. M. (2012). Safety assessment of *Bacillus licheniformis* Me1 isolated from milk for probiotic application. *International Journal of Toxicology*, 31(3), 228–37. <http://doi.org/10.1177/1091581812443388>
- O'Mahony, L., Mccarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F. & Quigley, E.M. (2005). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Irritable Bowel Syndrome: Symptom Responses and Relationship to Cytokine Profiles. *Gastroenterology* 128, 541–551.
- Okamoto, K., Fujiya, M., Nata, T., Ueno, N., Inaba, Y., Ishikawa, C. & Kohgo, Y. (2012). Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *International Journal of Colorectal Disease*, 27(8), 1039–46. <http://doi.org/10.1007/s00384-012-1416-8>
- Paik, H., Park, J. & Park, E. (2005). Effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD on Lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 1270—1274.
- Palamutoğlu R, Kasnak C (2014) *Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi Fermente Et Ürünleri Üretiminde Probiyotik Kullanımı*. 2:208–213.
- Pan, J.-G., Kim, E.-J., & Yun, C.-H. (2012). *Bacillus* spore display. *Trends in Biotechnology*, 30(12), 610–2. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.09.005>
- Pande, R., Bagad, M., Dubey, V., & Ghosh, A. R. (2012). Prospectus of probiotics in modern age diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1963–S1974. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60526-7](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60526-7)
- Peng, G.C. & Hsu, C.H. (2005). The efficacy and safety of heat-killed *Lactobacillus paracasei* for treatment of perennial allergic rhinitis induced by house-dust mite. *Pediatric Allergy and Immunology*, 16, 433–438.

- Permpoonpattana, P., Hong, H. a., Khaneja, R., & Cutting, S. M. (2012). Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. *Beneficial Microbes*, 3(2), 127–135. <http://doi.org/10.3920/BM2012.0002>
- Pinchuk, I. V, Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Mégraud, F., & Urdaci, M. C. (2001). In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. *In Vitro Anti- Helicobacter pylori Activity of the Probiotic Strain Bacillus subtilis 3 Is Due to Secretion of Antibiotics*. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3156>
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
- Ranadheera, C. S., Evans, C. a., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2013). Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. *Small Ruminant Research*, 112(1-3), 174–180. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.020>
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>
- Roy, D., Laval, U., & City, Q. (2011). 4.49 Probiotics, 591–602. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00317-2>
- Saarela, M., Alakomi, H. L., Mättö, J., Ahonen, a. M., Puhakka, a., & Tynkkynen, S. (2011). Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 106–110. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.002>
- Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M. C., Vesterlund, S., & El-nezami, H. (2010). Interaction of probiotics and pathogens — benefits to human health ? *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 157–167. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.016>
- Salminen, S., von Wright, a, Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M. & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics -- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9849787>
- Sanders, M. E., Morelli, L., & Tompkins, T. A. (2003). Sporeformers as Human Probiotics : *Bacillus* , and *Brevibacillus*, 2, 101–110.
- Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11), 1284–1289. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.016>
- Sarkar, S. (2013). Probiotics as functional foods: gut colonization and safety concerns. *Nutrition & Food Science* 43, 496-504.

- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H. & Hatakka, K. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 293–300. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.009>
- Schillinger, U., Guigas, C. & Holzapfel, W.H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* 15, 1289–1296.
- Setlow, P. (2013). Summer meeting 201--when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 115(6), 1251–68. <http://doi.org/10.1111/jam.12343>
- Shiravamaiah, S.; Pumford, N.R.; Morgan, M.J.; Wolfenden, R.E.; Wolfenden, A.D.; Torrez-Rodriguez, A.; Hargis, B.M. & Tellez, G. (2011). Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. *Poultry Science*, 90, 1574-1580.
- Silva PDL Da, Bezerra MDF, Santos KMO Dos, Correia RTP (2015) Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Sci Technol* 62:452–457. doi: 10.1016/j.lwt.2014.02.055
- Socol, C. R., Porto, L., Vandenberghe, D. S., Spier, M. R., Bianchi, A., Medeiros, P., & Yamagishi, C. T. (2013). The Potential of Probiotics : A Review, 48(4), 413–434.
- Sorokulova, I. (2008). Preclinical testing in the development of probiotics: a regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 Suppl 2(Suppl 2), S92–5; discussion S144–51. <http://doi.org/10.1086/523334>
- Sorokulova I (2013) Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics. *J Probiotics Heal* 1:1–5. doi: 10.4172/2329-8901.1000e106
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H.-H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible film as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231–242. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.023>
- Spinosa, M. R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., & Oggioni, M. R. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research in Microbiology*, 151(5), 361–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919516>
- Sreeja V, Prajapati JB (2013) Probiotic Formulations: Application and Status as Pharmaceuticals-A Review. *Probiotics Antimicrob Proteins* 5:81–91. doi: 10.1007/s12602-013-9126-2
- Sumi, H., Yatagai, C., Wada, H., Yoshida, E. & Maruyama, M. (1995). Effect of *Bacillus natto*-fermented product (BIOZYME) on blood alcohol, aldehyde concentrations after whisky drinking in human volunteers, and acute toxicity of acetaldehyde in mice. *Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison* 30, 69e79.

- Sun, P., Wang, J.Q. & Zhang, H.T.(2010). Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. *Journal of Dairy Science* 93, 5851–5855.
- Sun, Y-Z., Yang, H-L., Ma, R-L., Song, K. & Lin, W-Y. (2011). Molecular analysis of autochthonous microbiota along the digestive tract of juvenile grouper *Epinephelus coioides* following probiotic *Bacillus pumilus* administration. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1093–1103.
- Tabuchi, M., Ozaki, M., Tamura, A, Yamada, N., Ishida, T., Hosoda, M. & Hosono, A. (2003). Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 67, 1421-1424.
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P. & Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters* 31, 571–576.
- Thirabunyanon, M., & Thongwittaya, N. (2012). Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Enteritidis infection. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 74–81. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.008>
- Tsubura, S., Mizunuma, H., Ishikawa, S., Oyake, I., Okabayashi, M., Katoh, K., Shibata, M., Iizuka, T., Toda, T. & Iizuka, T. (2009). The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 1353–6.
- Tsukahara, T., Tsuruta, T., Nakanishi, N., Hikita, C.& Mochizuki, M. (2013). The preventive effect of *Bacillus subtilis* strain DB9011 against experimental infection with enterotoxemic *Escherichia coli* in weaning piglets 316–321.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187–216. <http://doi.org/10.1023/A:1020631532202>
- Vesterlund, S., Salminen, K., Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *Int J Food Microbiol.* 2012 Jul 2;157(2):319-21. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.016
- VidyaLaxme, B., Rovetto, A., Grau, R. & Agrawal, R. (2012). Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against *V. cholerae* and other beneficial properties. *Journal of Food Science and Technology*
- Vieira, F.N. (2010). Seleção e utilização de bactérias probióticas na cunicultura marinha. Tese de Doutorado no Centro de Ciência Agrária da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Vuyst, L.D., Falony G., Leroy, F.(2008). Probiotics in fermented sausages. *Meat Sci.*, 80(1), 75-8. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.05.038.

- Wang, M.F., Lin, H.C., Wang, Y.Y., Hsu, C.H. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric Allergy Immunology*, v. 15, p. 152–158, 2004.
- Yang, J.J., Niu, C.C., Guo, X.H. (2015). Mixed culture models for predicting intestinal microbial interactions between *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in the presence of probiotic *Bacillus subtilis*. *Benef Microbes.*; 6(6), 871-7. doi: 10.3920/BM2015.0033
- Yeon, S., You, Y.S., Kwon, H., Yang, E.H., Ryu, J., Kang, B.H., Kang, J., 2010. Fermented milk of *Lactobacillus helveticus* IDCC3801 reduces beta-amyloid and attenuates memory deficit. *Journal of functional foods* 2, 143 –152.

Capítulo 2

**Resistência de cepas probióticas dos gêneros *Bacillus*,
Bifidobacterium e *Lactobacillus* em diferentes matrizes
alimentícias submetidas às condições simuladas do trato
gastrointestinal**

Resistência de cepas probióticas dos gêneros *Bacillus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em diferentes matrizes alimentícias submetidas às condições simuladas do trato gastrintestinal

Mariana B. Soares^a, Rafael C.R. Martinez^a, Anderson S. Sant'Ana^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, Brasil.

*Autor correspondente: Prof. A. S. Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brasil. Contato: +55(19) 3521-2174.

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista “Journal of Functional Foods”

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a resistência de esporos probióticos do gênero *Bacillus* adicionados a diferentes matrizes alimentícias, determinada no início e ao final da vida de prateleira de cada produto exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI) e comparar tais resultados com a viabilidade de cepas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* submetidas sob as mesmas condições. As cepas probióticas utilizadas (*Lactobacillus paracasei* PXN 37, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* Bb-12, *Bifidobacterium breve* PXN 25, *Bacillus subtilis* PXN 21, *Bacillus coagulans* GBI30 6086 e *Bacillus coagulans* MTCC 5856) foram inoculadas separadamente em amostras de suco de laranja (após pasteurização), requeijão cremoso (após fusão da massa) e pão (na mistura da massa) e avaliadas em um sistema *in vitro* estático simulando as fases gástrica (pH 2), entérica I (pH 5) e entérica II (pH 7) do TGI, resultando em seis horas de digestão. A enumeração das populações das cepas probióticas [esporos (*Bacillus* spp.) e células vegetativas (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.)] foi realizada nos tempos T_{0h} , T_{2h} , T_{4h} e T_{6h} do processo digestão simulada, no início e ao final da vida de prateleira dos produtos, utilizando-se meios de cultivo seletivos. Ao final da vida de prateleira, após as etapas de digestão simulada, as cepas de *Bacillus* apresentaram maior viabilidade (acima de 80%) em comparação às cepas probióticas tradicionais ácido-láticas (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) adicionadas às amostras de requeijão cremoso e suco de laranja. O mesmo aconteceu quando as cepas estudadas foram expostas às enzimas digestivas, não sendo capazes de alcançar a quantidade elevadas como às dos esporos de *Bacillus* (<6 log UFC/g do produto). Em relação às amostras de pão, os esporos de *Bacillus* apresentaram reduções de até 2 ciclos logarítmicos após processamento da matriz e contato com os fluidos simulados do TGI, embora tenham se mantido estáveis durante o período de armazenamento do produto. Portanto, alimentos que possuem características físico-químicas intrínsecas desfavoráveis ou cujas etapas de processamento sejam subletais ou letais às células vegetativas probióticas tradicionalmente utilizadas como probióticos (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) podem ser veículos promissores para esporos de *Bacillus* com potencial probiótico, os quais ainda apresentam maior resistência às condições adversas do TGI.

Palavras-chaves: esporos probióticos; matriz alimentar; *Lactobacillus*; *Bifidobacterium*; *Bacillus*; trato gastrointestinal.

1. Introdução

O mercado de alimentos funcionais tem como destaque os alimentos que contêm micro-organismos probióticos, os quais podem promover benefícios à saúde (ANVISA, 2016; Fuller, 1989; Klingberg & Budde, 2006; Santos et al., 2014). Para obtenção destes benefícios, é necessário consumi-los continuamente (regularmente) e garantir que a matriz alimentícia contenha uma quantidade mínima viável de micro-organismos probióticos no momento de sua ingestão. Para tanto, os micro-organismos probióticos devem sobreviver não somente durante a vida de prateleira do produto alimentício, como também à passagem pelo trato gastrintestinal (TGI) (Jensen, Grimmer, Naterstad, & Axelsson, 2012; Klu & Chen, 2015; Ranadheera et al., 2010; Valerio et al., 2006). Estudos mostraram que a matriz alimentar pode permitir simultaneamente a multiplicação de probióticos no alimento, proteção durante a vida de prateleira do produto, e ainda durante a passagem pelo TGI (Batista et al., 2015; Bedani, Vieira, Rossi, & Saad, 2014; Buriti, Castro, & Saad, 2010; Guo et al., 2009; Homayoni Rad, Mehrabany, Alipoor, Mehrabany, & Javadi, 2012; Klu & Chen, 2015; Martinez et al., 2011; Pereira et al., 2016; Schillinger, Guigas, & Holzapfel, 2005).

A determinação da viabilidade de micro-organismos probióticos nos alimentos e no TGI é uma característica fundamental para escolha de cepas a serem utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos (Wang et al., 2009; Ranadheera, Baines, & Adams, 2010; Martinez et al., 2011). Na literatura científica e na legislação de diversos países, estabeleceu-se uma concentração de 10^6 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de micro-organismo probiótico por grama (g) ou mililitro (mL) do produto ou da porção do produto para obtenção dos efeitos benéficos desejados (Silva, Bezerra, Santos, & Correia, 2015). A legislação brasileira não estabelece uma concentração padrão por grama do produto atualmente. Ela aprova alimentos que tenham concentrações suficientes do(s) micro-organismo(s) probiótico(s) viáveis para promover benefícios à saúde, porém esses devem ter laudos de análises e testes epidemiológicos que confirmam a concentração usada para determinado efeito. Essa população deve ser eficiente e estar viável após o processamento e estocagem do produto alimentício; além disso é necessário que o(s) micro-organismo(s) seja(m) resistente(s) aos fluidos do TGI, mantendo populações elevadas para que possam exercer seu(s) efeito(s) probiótico(s) (ANVISA, 2016).

É interessante ressaltar que alimentos com pH elevado e/ou com alta capacidade tamponante, podem reduzir a acidez estomacal humana e, portanto, auxiliar na sobrevivência

de micro-organismos probióticos ao longo do TGI (Huang & Adams, 2004; Klu & Chen, 2015). Além disso, os alimentos líquidos são digeridos mais rapidamente que os alimentos sólidos e, conseqüentemente, o tempo de contato do micro-organismo probiótico com fatores estressantes, por exemplo, o ácido estomacal, será reduzido (Huang & Adams, 2004; Klu & Chen, 2015). Assim, o desenvolvimento de alimentos probióticos, principalmente aqueles que apresentam pH ácido, baixa atividade de água ou que são submetidos a processos térmicos cujas temperaturas atingem valores maiores que 60°C, constitui um grande desafio. Isto está relacionado ao fato das bactérias ácido-láticas (BAL) não sobreviverem por muito tempo frente a tais condições adversas (Cutting, 2011; Drunkler, 2009), daí a necessidade da realização de adaptações do processo, incluindo a adição dessas culturas pós-tratamento térmico - o que pode levar à recontaminação do alimento - ou o emprego de métodos como a microencapsulação para proteção dos micro-organismos (Favaro-Trindade, 2008).

A fim de superar tais limitações, estudos têm sido realizados para o desenvolvimento e aplicação de cepas probióticas esporuladas, como as do gênero *Bacillus*, as quais são mais resistentes a condições estressantes, como altas temperaturas e baixos valores de pH (Cutting, 2011). Essas cepas são utilizadas atualmente na forma farmacêutica e estão associadas ao tratamento de distúrbios gastrointestinais e como agentes terapêuticos para o tratamento de infecções do trato urinário (Nithya et al., 2012). A utilização destas cepas, portanto, permite superar diversos desafios tecnológicos e amplia a possibilidade de aplicação de micro-organismos probióticos a uma maior gama de alimentos, incluindo bebidas ácidas, produtos lácteos termoprocessados e produtos de panificação, os quais são submetidos a tratamentos térmicos drásticos e possuem menores valores de atividade de água. No entanto, para sua aplicação nos alimentos, é fundamental a condução prévia de estudos para determinação da sobrevivência destes micro-organismos frente aos fluidos simulados (*in vitro*) do TGI (Costa & Silva, 2013; van de Guchte et al., 2002). Embora testes *in vitro* apresentem algumas limitações para a avaliação da funcionalidade e viabilidade de um micro-organismo probiótico no organismo humano, eles são bastante úteis para a seleção de cepas que, quando inseridas em uma matriz alimentar, se comportam de forma mais satisfatória (Buriti et al., 2010; Schillinger et al., 2005). Assim, é notória a importância do conhecimento da constituição físico-química da matriz alimentícia e de seu impacto na sobrevivência de micro-organismos probióticos. Apesar do exposto anteriormente, pouco se conhece sobre o comportamento característico de cepas probióticas e/ou potencialmente probióticas esporuladas aplicadas na fabricação de alimentos probióticos expostos às condições simuladas do TGI.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a resistência de esporos probióticos do gênero *Bacillus* adicionados a diferentes matrizes alimentícias (suco de laranja, requeijão cremoso e pão caseiro) no início e fim da vida de prateleira dos produtos e submetidas às condições simuladas do TGI, bem como comparar tais resultados com a viabilidade de cepas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* determinadas nas mesmas condições.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos e preparo dos inóculos

Cepas probióticas liofilizadas (DVS) na concentração de 10^7 - 10^8 UFC ou esporos/g ou ml do produto para consumo foram utilizadas no presente estudo, incluindo: *Lactobacillus paracasei* PXN 37 (Protexin, Lopen Head, Reino Unido), *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca), *Bifidobacterium breve* PXN 25 (Protexin, Lopen Head, Reino Unido), *Bacillus subtilis* PXN 21 (Protexin, Lopen Head, Reino Unido), *Bacillus coagulans* GBI-306086 (Ganeden Biotech, Mayfield Heights, Estados Unidos) e *Bacillus coagulans* MTCC 5856 (Sabinsa Corporation, New Jersey, Estados Unidos). A grande maioria das bactérias tradicionais com potencial probiótico são ácido lácticas (BAL), porém o gênero *Bifidobacterium* pertence ao filo Actinobactérias, mas é ainda considerado por muitos cientistas como um membro do grupo BAL, uma vez que possui algumas características típicas deste grupo, tais como a produção de ácido láctico (Stolaki, De Vos & Kleerebezem, 2012). Embora *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* não pertençam ao mesmo grupo taxonômico, neste artigo, o gênero *Bifidobacterium* será incluído quando o grupo BAL for mencionado no texto. Essas foram inoculadas nas matrizes após a fusão da massa (requeijão cremoso), após resfriamento (suco de laranja) e na mistura da massa, antes da etapa de forneamento (pão caseiro).

2.2. Preparo das matrizes alimentícias

Amostras de requeijão cremoso, suco de laranja e pão foram avaliadas no presente estudo uma vez que representam distintos fatores de estresse aos quais os probióticos podem ser submetidos, incluindo característica física (líquido, viscoso, sólido), química (diferentes valores de pH e de atividade de água) e processamento (emprego de elevadas temperaturas).

2.2.1. Requeijão Cremoso

O requeijão cremoso foi produzido conforme Gaino et al.(2013) com modificações. O mesmo foi processado utilizando-se leite pasteurizado semi-desnatado tipo A (Xandô, São Paulo, SP, Brasil) e 37% de creme de leite pasteurizado com 35% de teor de gordura (v/v) (Atilate, Itatiba, SP, Brasil), ambos adquiridos no comércio local (Campinas, SP, Brasil), além de 0,28% ácido láctico (v/v) com 85% de pureza (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), 1,5% de cloreto de sódio (m/m) (NaCl) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), 1,5% de sal fundente (m/m) JOHA S9 (ICL Food Specialties, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), sorbato de potássio (1g/1kg de produto final) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) e 20% de água destilada estéril (v/v). O leite foi aquecido à temperatura de 70°C e em seguida, o ácido láctico foi adicionado, mantendo-se agitação lenta, manual e contínua até sua completa homogeneização. Posteriormente, esta mistura foi mantida em repouso por 30 minutos para precipitação da massa (coagulação ácida a quente). Em seguida, foi realizada a etapa de dessoragem com auxílio de peneiras de tecido e lavagem com água destilada esterilizada gelada até que a massa atingisse pH igual a 5,2. Finalmente, a massa foi prensada manualmente e mantida sob refrigeração de 6°C até o dia seguinte. A massa obtida foi então pesada e o sal fundente e o NaCl, cujas massas foram calculadas levando-se em consideração esse peso, foram adicionados à massa fresca triturada. A mistura foi realizada manualmente e submetida à etapa de aquecimento (90°C) até completa fusão em bico de bunsen. Posteriormente, foram adicionados creme de leite e água, com manutenção da temperatura durante 5 minutos. O conservante sorbato de potássio foi adicionado após a fusão do requeijão cremoso, quando o produto foi resfriado e a temperatura de 70°C foi atingida. As cepas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram ativadas em leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil), previamente esterilizado em autoclave (Fabbe Primar Industrial Ltda, Modelo 146, São Paulo, Brasil) (121°C/15 min) e posteriormente reconstituído a 12%(m/v) e incubados a 37°C/2 h. Os esporos probióticos foram inoculados diretamente no produto. Os micro-organismos probióticos foram inoculados, individualmente, na massa fundida, na concentração de 10^7 - 10^8 UFC ou esporos/grama do requeijão cremoso, após atingir a temperatura de 50°C, durante a etapa de resfriamento (Drunkler, 2009). Finalmente, realizou-se o envase do requeijão cremoso a quente em temperatura (50°C) utilizando-se potes plásticos de poliestireno com capacidade para 100 mL (Copobrás, São Ludgero, Santa Catarina), previamente sanitizados com solução de hipoclorito de sódio 200 ppm. A temperatura de envase utilizada foi mais branda para que não houvesse estresse ou morte dos micro-organismos probióticos (50°C), porém essa condição pode

propiciar a contaminação de micro-organismos deteriorantes. O valor médio do pH do produto final correspondeu a 5,97 e este foi estocado à temperatura de 6°C por 45 dias.

2.2.2. Suco de laranja

O suco de laranja foi preparado a partir de suco de laranja concentrado (70°Brix) pasteurizado, proveniente de uma empresa localizada no Estado de São Paulo. Para o preparo, o suco foi diluído com água destilada estéril para obtenção de 11°Brix. Após a diluição do suco concentrado, realizou-se a etapa de pasteurização a 105°C durante 10 minutos em autoclave (Fabbe Primar Industrial Ltda, Modelo 146, São Paulo, Brazil), tendo sido o alimento, a seguir, resfriado em banho de gelo até atingir 50°C. As cepas probióticas foram adicionadas, individualmente na concentração de 10^7 - 10^8 UFC ou esporos/mL às amostras de suco de laranja após resfriamento e homogenizadas. Posteriormente, alíquotas do suco de laranja (200 mL) foram acondicionadas em frascos de vidro de 250 mL previamente esterilizados e mantidos à temperatura de 6°C por 7 dias (simulação da estocagem do suco de laranja pasteurizado refrigerado). O valor médio do pH do produto recém-obtido correspondeu a 4,15.

2.2.3. Pão Caseiro

Para o preparo do pão, foram utilizados como ingredientes: 55% de farinha de trigo branca, 3,8% de fermento biológico seco, 3,3% de açúcar cristal, 0,5% de glúten, 1,1% de sal iodado, 2,2% de óleo de soja, 0,15% de propionato de cálcio e 34,1% de água estéril. Os ingredientes secos foram misturados primeiramente, exceto o açúcar e o fermento biológico, os quais foram homogeneizados em água e mantidos à 37°C/1h (formação da “esponja”, responsável pela textura, sabor e aroma característicos do produto final). Posteriormente, foram adicionados o óleo de soja e a “esponja” aos ingredientes secos e esses foram misturados manualmente até a obtenção de uma massa homogênea e solta. A massa do pão, por sua vez, foi inoculada somente com cepas do gênero *Bacillus*, antes da etapa de forneamento do produto, para obtenção de um inóculo mais homogêneo. As cepas foram adicionadas separadamente na mistura da massa para atingir a concentração de 10^7 - 10^8 UFC/grama do produto final. Após a produção da massa, fez-se a moldagem dos pães e os mesmos foram colocados em estufa a 40°C/1h para fermentação e, em seguida, levados ao forno (Tron, Catanduva, Brazil) para serem assados (180°C/20 minutos). Os pães foram acondicionados em sacos plásticos vedados e armazenados à

temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 7 dias. O pH médio dos pães recém-produzidos foi de 5,71.

2.3. Avaliação da viabilidade das cepas probióticas em diferentes matrizes alimentícias ao longo da vida de prateleira

As amostras de requeijão cremoso, suco de laranja e pão probióticos foram estocadas sob condições recomendadas para produtos comerciais similares, conforme descrito nos itens 2.2.1., 2.2.2. e 2.2.3. As amostras de diferentes alimentos probióticos foram analisadas no tempo inicial (T_0) e no tempo final (T_f) da vida de prateleira (45, 7 e 7 dias para requeijão cremoso, suco de laranja e pão caseiro, respectivamente).

2.4. Determinação da viabilidade dos micro-organismos probióticos em diferentes matrizes alimentícias expostos aos fluidos simulados do TGI

Durante a estocagem, a viabilidade dos micro-organismos probióticos presentes nas diferentes matrizes alimentícias expostos às condições simuladas do TGI foi determinada segundo Liserre et al. (2007) e Buriti et al. (2010). Assim, amostras (10g ou 10mL) dos alimentos foram submetidas à ação de solução das enzimas pepsina (3g.L^{-1}) e lipase ($0,9\text{g.L}^{-1}$), corrigindo-se o pH para valor correspondente a 2 com auxílio de solução de ácido clorídrico (HCl) 1M estéril, para simulação da fase gástrica. Na sequência, foram adicionados solução de sais biliares (10g.L^{-1}) e pancreatina (1g.L^{-1}), corrigindo-se o pH para valor correspondente a 5, com a utilização de solução alcalina (150mL de NaOH 1M, $14\text{g PO}_4\text{H}_2\text{Na.1H}_2\text{O/ 1L}$) para simulação da fase entérica I. Finalmente, às amostras foram adicionados solução de sais biliares (10g.L^{-1}) e pancreatina (1g.L^{-1}) novamente, porém, desta vez, ajustando-se o pH para 7, simulando-se a fase entérica II. As três fases foram conduzidas à temperatura de 37°C, sob agitação (150 rpm) em shaker (New Brunswick, Edison, Modelo G-24, N.J., Estados Unidos), com duração de 2 horas cada. Para enumeração de células vegetativas e esporos (*Bacillus* spp.) dos micro-organismos probióticos, alíquotas (1mL) de cada matriz alimentícia submetida ao processo simulado de digestão do TGI foram coletadas nos tempos 0, 2h, 4h e 6h e empregadas para a realização de diluições decimais seriadas diluídas em diluentes específicos para cada cepa, a partir das quais foram retiradas frações de 100 μL . Essas frações foram semeadas em,

meios de cultivo seletivos e específicos, conforme descrito no item 2.5. A viabilidade das cepas probióticas foi expressa em porcentagem, de acordo com a equação abaixo (Guo et al., 2009):

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{N \log \text{ final (Tempo 6h)}}{N \log \text{ inicial (Tempo 0)}} \times 100 \quad (1)$$

As cepas que apresentaram as maiores porcentagens de sobrevivência frente às condições simuladas do TGI foram, conseqüentemente, caracterizadas como as mais resistentes. Os testes foram realizados como duplicatas genuínas.

2.5. Enumeração dos micro-organismos probióticos

A enumeração dos micro-organismos probióticos foi realizada conforme metodologia recomendada para cada cepa, de acordo com instruções fornecidas pelas empresas fabricantes das culturas, com adaptações (Tabela 1). Para as amostras com esporos probióticos foi realizado choque térmico (80°C/10 min) utilizando-se banho-maria (Quimis modelo Q334M-28, Diadema, São Paulo, Brasil) e resfriadas imediatamente em banho de gelo. A seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas empregando-se os seguintes diluentes recomendados pelos fabricantes: solução salina 0,9% para *B. coagulans* MTCC 5856, *L. acidophilus* La-5, *L. paracasei* PXN 37, *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 e *B. breve* PXN 25; água peptonada 1% (m/v) para *B. coagulans* GBI-30 e água peptonada 1% (m/v) adicionada de solução fisiológica de NaCl (0,8%, m/v) para *B. subtilis* PXN 21. A partir das diluições preparadas, alíquotas do material foram semeadas em meios de cultivo seletivos. Os resultados das contagens obtidas foram expressos como número de esporos/g ou mL do produto final.

2.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o programa Assistat 7.7 Beta (UFPB, Campina Grande, Brasil) para análise de variância (ANOVA) e teste de médias (Teste t de Student e Tukey). O Teste de Tukey foi empregado para verificar se houve diferença estatística entre as populações das diferentes cepas probióticas no começo e ao final da vida de prateleira de cada matriz alimentícia. O teste t foi utilizado para determinar se houve diferença estatística nas populações de uma mesma cepa probiótica adicionada a diferentes matrizes no começo e ao término da vida de prateleira. O Teste de Tukey também foi empregado para

comparação das porcentagens de sobrevivência (%) obtidas para as diferentes cepas probióticas no final do processo de digestão e aquelas determinadas em cada fase simulada do TGI (pH 2, 5 e 7) nos diferentes alimentos estudados. Para todos os testes, o nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

Tabela 1. Cepas probióticas, meios de cultivo e condições de incubação empregada.

Cepa	Choque térmico	Meio de cultura	Condições de Incubação	Fornecedor
<i>L. acidophilus</i> La-5 (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca)	-	Ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS)	37°C/72h em aerobiose	Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha)
<i>L. paracasei</i> PXN 37 (Protexin, Lopen Head, UK)	-	Ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS)	30°C/72h em aerobiose	Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha)
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12 (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca)	-	Ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) adicionado de cisteína a 10% (m/v), dicloxacilina a 0,1% (m/v), glicose a 20% (m/v) e cloreto de lítio 11% (m/v)	37°C/72h em anaerobiose	Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha; Synth, Diadema, SP, Brasil; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos; Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil
<i>B. breve</i> PXN 25 (Protexin, Lopen Head, UK)	-	Ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) adicionado de cisteína a 10% (m/v), dicloxacilina a 0,1% (m/v), glicose a 20% (m/v) e cloreto de lítio 11% (m/v)	30°C/72h em anaerobiose	Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha; Synth, Diadema, SP, Brasil; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos; Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil
<i>B. subtilis</i> PXN 21 (Protexin, Lopen Head, UK)	80°C/ 10 min	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP Ágar)	37°C/24h e 20°C/24h em aerobiose	Acumedia, Lansing, USA)
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086 (Ganeden Biotech, Mayfield Heights, EUA)	80°C/ 10 min	Glucose Yeast Extract Agar (BC)	40°C/ 48h em aerobiose	Formulado*
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856 (Lactospore, New Jersey, EUA)	80°C/ 10 min	Glucose Yeast Extract Agar (GYEA)	37°C/72h em aerobiose	Formulado*

- não se aplica. * descrito em apêndice.

3. Resultados e Discussão

Todas as matrizes selecionadas e testadas no presente estudo – suco de laranja, requeijão cremoso e pão - apresentam grande consumo no território brasileiro (ABIP, 2015; ABIQ, 2013; CitrusBr, 2011; Van Dender et al., 2014) permitindo, portanto, a ingestão contínua (prolongada) de produtos alimentícios probióticos bastante apreciados, resultando em possíveis efeitos benéficos à saúde.

3.1. Viabilidade das cepas probióticas ao longo da vida de prateleira

Ao adicionar probióticos em alimentos é necessário um controle rigoroso da sua viabilidade na matriz e durante sua vida de prateleira, tornando-o dessa maneira um produto funcional capaz de conferir benefícios à saúde. O estudo da sobrevivência de probióticos em alimentos é de extrema importância, visto que para se obter um produto probiótico adequado, este deve ser estável quanto às suas características físico-químicas e atributos organolépticos; além disso, a cepa probiótica deve manter-se viável durante sua vida de prateleira (Homayoni Rad et al., 2012; Jankovic, Sybesma, Phothirath, Ananta, & Mercenier, 2010).

Na Tabela 2 estão expressos os valores (log UFC ou esporos/g ou mL) referentes às reduções das populações de células vegetativas (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) ou esporos (*Bacillus* spp.) determinadas entre as contagens no início e ao final da vida de prateleira dos diferentes produtos alimentícios testados.

De acordo com os resultados, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as populações de esporos dos *Bacillus* probióticos avaliados nas três matrizes alimentícias testadas, ao longo do período de armazenamento (Tabela 2). Comportamento distinto foi obtido pelas populações de BAL nos alimentos testados, em que se observou algumas variações nas suas contagens.

Tabela 2. Número de redução (γ) expressa como valores de média \pm desvio padrão (log UFC ou esporo/g ou mL), das populações inicial (N0) e final (Nf) de células vegetativas (*Lactobacillus e Bifidobacterium*) e esporos (*Bacillus*), na vida de prateleira de diferentes matrizes alimentícias.

Cepa	Requeijão cremoso			Suco de laranja			Pão		
	N ₀	N _f	γ	N ₀	N _f	γ	N ₀	N _f	γ
<i>L. acidophilus</i> La-5	7,67 \pm 0,25	5,61 \pm 0,84	-2,07 ^{Aa} \pm 0,59	7,37 \pm 0,23	3,46 \pm 0,04	-3,91 ^{Ac} \pm 0,19			na*
<i>L. paracasei</i> PXN 37	8,26 \pm 0,14	8,06 \pm 0,08	-0,20 ^{Aab} \pm 0,06	8,76 \pm 0,03	7,92 \pm 0,08	-0,84 ^{Aa} \pm 0,05			na*
<i>B. animalis</i> Bb-12	8,40 \pm 0,12	6,18 \pm 0,33	-2,22 ^{Aab} \pm 0,21	7,32 \pm 0,05	7,66 \pm 0,01	0,34 ^{Bb} \pm 0,04			na*
<i>B. breve</i> PXN 25	7,33 \pm 0,5	7,15 \pm 0,97	-0,18 ^{Bab} \pm 0,47	1,54 \pm 0,06	6,55 \pm 0,17	5,01 ^{Ac} \pm 0,11			na*
<i>B.coagulans</i> MTCC 5856*;	8,32 \pm 0,27	8,59 \pm 0,07	0,27 ^{Ab} \pm 0,20	8,24 \pm 0,16	8,08 \pm 0,18	-0,12 ^{Ac} \pm 0,01	7,39 \pm 0,28	7,25 \pm 0,20	-0,14 ^{Aa} \pm 0,08
<i>B.coagulans</i> GBI-30 6086*	8,46 \pm 0,16	8,62 \pm 0,04	0,16 ^{Ab} \pm 0,12	8,24 \pm 0,16	7,94 \pm 0,03	-0,30 ^{Ac} \pm 0,13	6,00 \pm 0,33	6,67 \pm 0,23	0,67 ^{Aa} \pm 0,09
<i>B.subtilis</i> PXN 21*	7,86 \pm 0,38	7,08 \pm 0,35	-0,78 ^{Aab} \pm 0,03	7,23 \pm 0,19	7,60 \pm 0,13	0,37 ^{Ac} \pm 0,07	5,06 \pm 0,97	4,45 \pm 0,81	-0,61 ^{Aa} \pm 0,16

*na: não se aplica. ^{A,B} Letras maiúsculas em expoente diferentes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre matrizes para o mesma cepa probiótica baseado no Teste t. ^{a, b, c} Letras minúsculas sobrescritos diferentes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diferentes cepas probióticas na mesma matriz alimentícia baseado no Teste de Tukey.

3.1.1. Viabilidade na vida de prateleira do requeijão cremoso

De acordo com os nossos resultados, as cepas *L. acidophilus* La-05 e *B. animalis* Bb-12 exibiram maiores reduções populacionais, $2,07 \pm 0,59$ e $2,22 \pm 0,21$ log UFC/g respectivamente, em comparação aos esporos de *Bacillus*, com reduções abaixo de 1 ciclo log esporos durante a vida de prateleira do requeijão cremoso. Essas cepas apresentaram contagens de $5,61 \pm 0,84$ e $6,18 \pm 0,33$ log UFC/g, respectivamente, ao final do período de estocagem do produto alimentício (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados em um estudo no qual a viabilidade das mesmas cepas probióticas foi determinada em amostras de queijo prato a 12°C por 60 dias (Chaves & Gigante, 2016). Populações de *L. acidophilus* La-5 associadas ao *Bifidobacterium* Bb12, ou não, no queijo prato reduziram de 1,65 a 2,06 log UFC após 60 dias de estocagem do produto. A população de *Bifidobacterium* Bb12 sozinho também apresentou reduções durante o armazenamento (1,72 log UFC). Porém, apesar das perdas durante a vida de prateleira do queijo prato, a concentração de células viáveis ainda permaneceram acima de 10^8 UFC/porção do queijo (Chaves & Gigante, 2016), o que contrasta com os resultados obtidos no presente estudo, no qual os micro-organismos probióticos apresentaram populações inferiores a 7 log UFC/g. Outros autores avaliaram diferentes produtos lácteos e observaram que ao adicionar *L. acidophilus* La-05 probiótico a uma sobremesa láctea após processamento térmico e estocá-la a 5°C por 28 dias, houve redução de suas populações de células viáveis, indicando que essa redução estava associado a redução do pH da matriz. Dessa maneira, mesmo tendo elevado teor de sólidos presentes na matriz, essa não protegeu a cepa probiótica durante a vida de prateleira (Fernandes et al., 2013). O contrário foi encontrado em estudo com combinação de cepas probióticas ácido lácticas (BAL) inoculadas em iogurtes, queijo curado e em forma de cápsulas, onde as populações das BAL se mantiveram elevadas durante a vida de prateleira, demonstrando que a forma de veiculação dos micro-organismos probióticos apresentou efeito protetor (Saxelin et al., 2010).

A dosagem recomendada de probióticos para que exerça efeito(s) probiótico(s) é bastante discutível (heterogênea) levando-se em consideração as legislações adotadas por diferentes países do mundo. Portanto, é importante padronizar as metodologias de inoculação microbiana para melhor comparação dos resultados (Foligné et al., 2013; Sanders et al., 2013).

Comparando as BAL e os esporos de *Bacillus*, somente as reduções da população cepa *L. acidophilus* La-5 ($2,07 \pm 0,59$ log UFC/g) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) daquelas obtidas para os esporos de *B. coagulans* MTCC 5856 ($0,27 \pm 0,20$ esporos/g) e 6086 ($0,16 \pm 0,12$

esporos/g), demonstrando sua baixa resistência frente aos esporos no queijo avaliado (Tabela 2). Por outro lado, as cepas *L. paracasei* PXN 37 e *B. breve* PXN 25 apresentaram reduções em suas contagens ($0,20 \pm 0,06$ e $0,18 \pm 0,47$ log UFC/g, respectivamente) semelhantes às aquelas determinadas para as populações de esporos de *Bacillus* probióticos, mantendo-se estáveis durante todo o período de armazenamento do requeijão cremoso, com contagens acima de 7 ciclos log UFC/g. Dentre as cepas de *Bacillus* estudadas, a população de esporos de *B.subtilis* PXN 21 foi a que apresentou maior redução no requeijão cremoso, determinada em $0,78 \pm 0,03$ log esporos/g após 45 dias de armazenamento, mas não distinta (estatisticamente) em comparação às aquelas observadas para as outras cepas probióticas esporuladas ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Os produtos lácteos são os alimentos com maior destaque dentro do mercado de alimentos probióticos, devido a boa familiarização com os consumidores. Neste contexto, o requeijão cremoso, sendo uma matriz probiótica láctea, é muito promissor para a adição desses micro-organismos. Porém, o processamento térmico aplicado ao requeijão cremoso impede que a maioria das células vegetativas sejam adicionadas diretamente ao produto, tornando-o um excelente veículo para esporos probióticos, devido a sua maior resistência térmica. Atualmente, existem poucos estudos sobre cepas probióticas inoculadas em requeijão cremoso (Drunkler, 2009; Gaino, Voltarelli, Rensis, & Vianna, 2012; Teixeira, 2012), e conseqüentemente, nenhum produto comercial, tornando-o um alimento com elevado potencial no mercado de alimentos funcionais, do ponto de vista econômico.

3.1.2. Viabilidade na vida de prateleira do suco de laranja

O uso de sucos de frutas como matriz probiótica não láctea vem sendo bastante explorado, dada a expressiva incidência de problemas de hipercolesterolemia e alergias a componentes do leite (Luckow e Delahunty, 2004; Sheehan, Ross e Fitzgerald, 2007; Pereira, Maciel e Rodrigues, 2011; Peres, Peres, Hernández-Mendoza, & Malcata, 2012). A presença de nutrientes como compostos antioxidantes, vitaminas, fibras e minerais nesse grupo de alimentos tornam-os atraentes do ponto de vista econômico, além de funcionarem como substrato ideal para a multiplicação de probióticos (Shori, 2015).

Ao longo da vida de prateleira das amostras de suco de laranja (7 dias), a cepa *L. acidophilus* La-5 apresentou a maior redução notável do número de células viáveis ($3,91 \pm 0,19$

log UFC/mL) em relação aos outros micro-organismos avaliados, atingindo população de $3,46 \pm 0,04$ no final da estocagem. Comportamento distinto ($p < 0,05$) foi encontrado em relação à cepa da população de *B.breve* PXN 25, cuja população aumentou ($5.01^{Ac} \pm 0.11$ log UFC/mL) durante aquele mesmo intervalo de tempo ao final da vida de prateleira do alimento (Tabela 2). Tal resultado pode ter um viés na sua contagem no início da vida de prateleira, visto que ele não atingiu a concentração adequada de inóculo (acima de 6 ciclos log). Em um estudo com diferentes cepas de *Lactobacillus* probióticas inoculadas em sucos de frutas (laranja, abacaxi e cramberry) por 12 semanas, revelou que existem diferenças extensas entre as cepas probióticas quanto à sua resistência ao ácido. Porém nenhuma cepa estudada conseguiu manter populações acima de 10^6 UFC/ml de suco após o processo de pasteurização de $76^\circ\text{C}/30$ seg ou $90^\circ\text{C}/1$ min (Sheehan, Ross & Fitzgerald, 2007). Comportamento semelhante àquele verificado no presente estudo para a cepa *L. acidophilus* La-05 incorporada às amostras de suco de laranja, indicando que possivelmente as características das matrizes alimentícias nas quais foram inoculados impactaram negativamente sua sobrevivência e multiplicação durante o período de armazenamento.

No presente estudo, ao final da vida de prateleira, as contagens de células viáveis determinadas para *L. paracasei* PXN 37 e *B.animalis* ssp *lactis* Bb-12 mantiveram contagem elevadas ($7,92$ log UFC/mL e $7,66$ log UFC/mL respectivamente), assim como aquelas observadas para os esporos de *Bacillus* probióticos avaliados (Tabela 2), e suas reduções na bebida cítrica diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si. Finalmente, no suco de laranja, a população de esporos de *Bacillus* determinados ao longo de sua vida de prateleira mantiveram-se relativamente constantes (acima de 7 logs esporos/mL), com reduções abaixo de 0,5 log esporos/mL nas amostras de suco para todas as cepas esporuladas estudadas (Tabela 2). Portanto, os dados mostraram novamente a maior resistência dos esporos probióticos em relação a algumas células vegetativas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estudados, quando inoculados no suco de laranja, que se caracteriza como matriz com pH baixo e alta acidez, características deletérias para a maioria das BAL probióticas.

3.1.3. Viabilidade na vida de prateleira do pão caseiro

Nas amostras de pão, as populações de esporos dos *Bacillus* avaliados apresentaram reduções menores que 1 ciclo log. O número de esporos de *B. subtilis* PXN 21 determinados no fim da vida de prateleira do produto ($4,45$ log esporos/g) foi menor do que aquele observado

inicialmente (5,06 log esporos/g), indicando uma menor resistência e/ou possível germinação após a vida de prateleira do produto. Por outro lado, as contagens de esporos obtidas para as cepas de *B. coagulans* mantiveram-se praticamente estáveis no mesmo intervalo de tempo (7 log esporos/g). A avaliação da sobrevivência de micro-organismos probióticos adicionados às amostras de pão foi realizada somente testando-se os esporos de *Bacillus*, uma vez que células vegetativas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não sobreviveriam ao processamento térmico do alimento, mesmo encapsuladas como demonstrado por Altamirano-Fortoul, Moreno-Terrazas, Quezada-Gallo, & Rosell, 2012; Zhang, Huang, Ananingsih, Zhou, & Chen, 2014).

A utilização de alimentos pertencentes à classe de cereais, principalmente os pães, como veículos para culturas probióticas possui potencial significativo. Farinhas obtidas a partir de grãos de cereais podem possuir substâncias prebióticas, as quais podem proteger o micro-organismo durante sua passagem pelo TGI e aumentar a sua colonização no hospedeiro (Martins et al., 2013). Além disso é um alimento mundialmente consumido, o que faz dele uma matriz interessante para alcançar grande parcela da população. Contudo, os processos de manufatura dos produtos de panificação empregam condições letais ou sub-letais para cepas probióticas, em especial às células vegetativas. Estudos averiguando a sobrevivência e doses efetivas de probióticos esporulados para obter benefícios à saúde devem ser mais exploradas.

3.2. Viabilidade de micro-organismos probióticos submetidos aos fluidos simulados do TGI

As porcentagens de viabilidade das cepas probióticas (esporos ou células vegetativas) adicionadas às diferentes matrizes alimentícias expostas aos fluidos simulados do TGI foram determinadas no início e ao final da vida de prateleira de cada produto e estão apresentadas na Tabela 3. Os valores das reduções das populações das cepas probióticas estudadas em função do pH e matrizes de requeijão cremoso, suco de laranja e pão estão expressos na Tabela 4. A viabilidade das cepas probióticas estudadas em função do tempo e pH de digestão nas matrizes de requeijão cremoso, suco de laranja e pão estão expressos nas Figuras 4, 5 e 6.

Tabela 3. Viabilidade (%) de cepas probióticas adicionadas a diferentes matrizes alimentícias submetidas, no início e ao final da vida de prateleira de três produtos alimentícios, às condições simuladas do TGI

Cepas	Requeijão cremoso		Suco de laranja		Pão	
	T ₀	T _f	T ₀	T _f	T ₀	T _f
<i>L. paracasei</i> PXN 37	84,61 ^{ab} ±0,64	57,66 ^a ±1,85	68,36 ^a ±1,28	49,55 ^b ±1,99	na**	na**
<i>L. acidophilus</i> La-5	62,09 ^d ±1,46	65,04 ^a ±0,98	50,14 ^{ab} ±1,84	202,68 ^a ±1,78	na**	na**
<i>B. animalis</i> ssp <i>lactis</i> Bb-12	83,29 ^{abc} ±0,70	95,24 ^a ±0,15	< 1ciclo log	< 1ciclo log	na**	na**
<i>B. breve</i> PXN 25	65,14 ^{cd} ±1,28	68,96 ^a ±1,11	< 1ciclo log	< 1ciclo log	na**	na**
<i>B.coagulans</i> MTCC 5856*	92,51 ^{ab} ±0,31	88,19 ^a ±0,48	97,14 ^a ±0,12	97,48 ^b ±0,10	93,26 ^a ±0,24	91,87 ^a ±0,28
<i>B.coagulans</i> GBI-30 6086*	102,43 ^a ±0,08	83,71 ^a ±0,57	95,35 ^a ±0,18	89,07 ^b ±0,43	96,20 ^a ±0,12	91,93 ^a ±0,26
<i>B.subtilis</i> PXN 21*	79,97 ^{bcd} ±0,77	91,21 ^a ±0,30	84,59 ^a ±0,58	84,97 ^b ±0,56	83,47 ^a ±0,42	91,94 ^a ±0,18

**na: não se aplica. ^{a, b, c} Letras minúsculas sobrescritos diferentes denotam diferenças significativas (p<0,05) entre diferentes cepas probióticas na mesma matriz alimentícia, pós contato com as soluções simuladas do trato gastrintestinal baseado no Teste de Tukey.

Tabela 4. Redução (γ) expressa como valores de média \pm desvio padrão (log UFC ou esporo/g ou mL), das populações de células vegetativas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e de esporos (*Bacillus*) entre o início (T_0) e final (T_f) da vida de prateleira de três produtos alimentícios em cada pH representando diferentes as fases de digestão no TGI simulado.

Cepas	Requeijão cremoso				Suco de laranja				Pão			
	N ₀	pH 2	pH 5	pH 7	N ₀	pH 2	pH 5	pH 7	N ₀	pH 2	pH 5	pH 7
<i>B. animalis</i> Bb-12	8,40	-1,29 \pm 1,58	-1,92 \pm 0,79	-1,11 \pm 0,42	7,32	0,56 \pm 0,18	5,57 \pm 0,95	0 \pm 0,00			na*	
<i>B. breve</i> PXN 25	7,33	0,71 \pm 0,71	0,86 \pm 0,37	0,16 \pm 0,18	1,54	5,58 \pm 3,29	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00			na*	
<i>L. acidophilus</i> La-05	7,68	-2,47 \pm 0,31	-2,22 \pm 1,05	-1,11 \pm 0,63	7,38	-3,10 \pm 0,18	1,92 \pm 4,33	3,32 \pm 2,31			na*	
<i>L. paracasei</i> PXN 37	8,26	-2,41 \pm 0,79	-1,68 \pm 0,77	-1,94 \pm 0,77	8,06	-0,08 \pm 0,44	-1,40 \pm 0,23	-1,59 \pm 0,43			na*	
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086	6,93	-0,72 \pm 0,07	0,11 \pm 0,09	-1,27 \pm 1,18	7,92	-0,16 \pm 0,59	-0,14 \pm 0,62	-0,61 \pm 1,36	6,00	0,32 \pm 0,10	-0,33 \pm 1,38	-0,27 \pm 1,12
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	8,28	-0,29 \pm 0,13	0,22 \pm 0,28	-0,62 \pm 0,19	8,21	-0,09 \pm 0,16	0,01 \pm 0,09	-0,07 \pm 0,02	7,03	-0,85 \pm 0,95	-0,62 \pm 0,89	-0,20 \pm 0,81
<i>B. subtilis</i> PXN 21	7,73	0,44 \pm 1,17	0,25 \pm 0,09	0,26 \pm 0,12	7,50	1,20 \pm 0,20	0,60 \pm 0,06	0,04 \pm 0,69	5,06	-0,55 \pm 1,31	0,03 \pm 0,13	-0,25 \pm 1,02

N₀= população no primeiro dia de shelf life do alimento estudado. pH 2= fase gástrica; pH 5 = fase entérica I; pH 7= fase entérica II

*na: não se aplica

3.2.1. Viabilidade das cepas probióticas adicionadas em requeijão cremoso expostas à digestão simulada

De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que entre as cepas probióticas avaliadas, *L. paracasei* PXN 37, *B. animalis* Bb-12 e *B. coagulans* GBI-30 6086 apresentaram as maiores porcentagens de sobrevivência nas amostras de requeijão cremoso após contato com as enzimas digestivas, determinadas no primeiro dia de armazenamento do produto, embora a maior delas tenha sido verificada para o micro-organismo esporulado (102,43%), onde observou seu crescimento ou germinação no intestino. Ainda no primeiro dia de armazenamento das amostras de requeijão cremoso probiótico submetidas às condições simuladas do TGI, observou-se que as BAL mostraram-se mais sensíveis do que os esporos de *Bacillus*, exibindo reduções populacionais na faixa de 1,27 a 2,91 log UFC/g até o final da digestão, atingindo contagens de células viáveis entre 4,77 e 6,99 log UFC/g. O mesmo foi encontrado em um estudo com requeijão, onde as cepas probióticas BAL avaliadas apresentaram perda de sua viabilidade ao entrarem em contato com condições gástricas (pH 2.5 e 3.0 e solução de pepsina -1000 unidades/mL a 37°C) e solução biliar de 0,3% (p/v) e se mostraram cepas-dependentes (Madureira et al., 2005). Por outro lado, a redução máxima das populações dos esporos foi determinada para *B. subtilis* PXN 21 (1,55 log UFC/mL), o qual ainda exibiu contagens razoavelmente altas no final da digestão simulada de $6,18 \pm 0,18$ UFC/g.

Os resultados obtidos quanto à sobrevivência das diferentes cepas probióticas nas amostras de requeijão cremoso em cada fase da digestão *in vitro*, durante o início e final (45 dias) da vida de prateleira do produto estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Viabilidade de diferentes cepas (log UFC/g) ou esporos probióticos (log esporos/g) inoculados em amostras de requeijão cremoso submetidos, no início (T₀) e ao final (T₄₅) de sua vida de prateleira, à digestão simulada (diferentes valores de pH) do trato gastrintestinal.

Cepa	pH 2	pH 5	pH 7
	(UFC/g)	(UFC/g)	(UFC/g)
T ₀			
<i>B. animalis</i> Bb-12	7,63 ^a ±0,24	7,84 ^a ±0,12	6,99 ^{ab} ±0,14
<i>B. breve</i> PXN 25	5,48 ^a ±0,71	4,87 ^b ±0,19	4,78 ^a ±0,37
<i>L. acidophilus</i> La-05	6,76 ^a ±0,20	5,93 ^{ab} ±0,83	4,77 ^c ±0,27
<i>L. paracasei</i> PXN 37	7,24 ^a ±0,79	7,28 ^{ab} ±0,74	6,99 ^a ±0,82
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086	6,97 ^a ±0,16	7,27 ^{ab} ±0,65	7,10 ^a ±0,11
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	7,55 ^a ±0,09	7,44 ^{ab} ±0,16	7,65 ^a ±0,24
<i>B. subtilis</i> PXN 21	6,27 ^a ±0,06	5,94 ^{ab} ±0,04	6,18 ^{abc} ±0,18
T ₄₅			
<i>B. animalis</i> Bb-12	6,35 ^a ±1,35	5,93 ^{ab} ±0,67	5,88 ^{ab} ±0,44
<i>B. breve</i> PXN 25	6,20 ^a ±1,07	5,74 ^b ±0,08	4,93 ^{bc} ±0,26
<i>L. acidophilus</i> La-05	4,29 ^a ±0,02	3,71 ^c ±0,09	3,65 ^c ±0,18
<i>L. paracasei</i> PXN 37	4,83 ^a ±0,23	5,60 ^{bc} ±0,20	5,05 ^{bc} ±0,28
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086	6,25 ^a ±0,10	7,39 ^a ±0,58	5,82 ^a ±0,73
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	7,46 ^a ±0,48	7,86 ^{ab} ±0,23	7,17 ^{ab} ±0,03
<i>B. subtilis</i> PXN 21	5,97 ^a ±0,68	6,45 ^{ab} ±0,24	6,25 ^{ab} ±0,20

^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas diferentes denotam diferenças significativas (p<0,05) entre diferentes cepas probióticas nos mesmos valores de pH baseado no Teste de Tukey.

Todas as cepas testadas apresentaram perfil de sobrevivência semelhante ($p > 0,05$) ao entrar em contato com meio mais ácido (pH 2), no início (com média de 6,84 log UFC ou esporos/g) e no final (com média de 5,98 log UFC ou esporos/g) avaliados na vida de prateleira do requeijão cremoso (Figura 4). A matriz láctea pode ter sido um fator importante para a proteção do micros-organismos ao entrarem em contato com a solução gástrica *in vitro*, uma vez que todas as cepas apresentaram populações semelhantes nessa etapa. Porém, as cepas *L. acidophilus* La-5, *L. paracasei* PXN 37 e *B. animalis* Bb-12 exibiram as maiores reduções (2,47, 2,41 e 1,28 log UFC/g, respectivamente) ao final da vida de prateleira do produto exposto ao suco gástrico. Em um estudo utilizando as cepas probióticas de *B. animalis* Bb-12, *B. animalis* Bo e *L. breve* LMG 6906, adicionados a amostras de queijo, apresentaram elevadas taxas de sobrevivência de, após exposição aos sucos gástrico e entérico simulados (Madureira et al., 2005), não corroborando com o encontrado neste trabalho para bactérias ácido-láticas. Por outro lado, as populações de esporos de *Bacillus* se mantiveram praticamente inalteradas, com contagens acima de 6 log esporos/g, mostrando sua maior resistência a fase gástrica em relação às BALs, mesmo após a estocagem do produto.

As cepas que apresentaram as maiores reduções populacionais durante a fase entérica I (pH 5) após 45 dias de estocagem foram *L. acidophilus* La-5 (2.22 ± 1.05), *B. animalis* Bb-12 (1.92 ± 0.79) e *L. paracasei* PXN 37 (1.68 ± 0.77) (Tabela 4), tendo a primeira como a mais sensível a variação de pH e vida de prateleira do requeijão cremoso ($p < 0,05$). Em estudo utilizando sorvete produzido com leite de cabra inoculado com *B. animalis* Bb-12, também foi apontada elevada redução de suas populações (até 4log UFC/mL) após contato do micro-organismo com bile e pancreatina, simulando a fase intestinal do processo digestivo (Silva et al., 2015).

As populações das cepas do gênero *Bifidobacterium* submetidas a pH 5 por 2h no início da vida de prateleira das amostras de requeijão cremoso apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$), mas as populações de *B. animalis* Bb-12 não diferiram das populações de esporos dos *Bacillus* probióticos (Figura 4A). Porém, após 45 dias de armazenamento do produto alimentício, as populações de *B. breve* PXN 25 (5,74 log UFC/g), *L. acidophilus* La-05 (3,71 log UFC/g) e *L. paracasei* PXN 37 (5,60 log UFC/g) mostraram-se distintas às contagens encontradas para os esporos de *B. coagulans* MTCC 5856, que exibiu populações mais elevadas (7,39 log esporos/g), indicando sua maior adaptação ao pH 5 (Tabela 5).

Na última etapa de digestão, os micro-organismos probióticos apresentaram redução de até 1,94 ciclos log na sua população ao final da vida de prateleira do requeijão cremoso. *B. animalis* Bb-12 (1.11±0.42), *L. acidophilus* La-5 (1.11±0.63), *L. paracasei* PXN 37 (1.94±0.77) e *B. coagulans* GBI-30 6086 (1.27±1.18) apresentaram os maiores índices (Tabela 4). Em pH 7 e na presença de bile e pancreatina, *L. acidophilus* La-5, foi o micro-organismo mais sensível de todos, exibindo as menores populações no início (4,77 log UFC/g) e ao final (3,65 log UFC/g) da vida de prateleira do produto ($p < 0,05$) (Figura 4B). Por outro lado, nessas mesmas condições, foram observadas contagens entre 6,18-7,10 e 5,82-6,44 log esporos/g de *Bacillus* no começo e ao final da vida de prateleira, respectivamente. Portanto, os esporos de *Bacillus* probióticos veiculados nas amostras de requeijão cremoso e mantidos durante seis horas em contato com fluidos simulados do TGI exibiram as maiores contagens (7,17 log UFC/g para *B. coagulans* MTCC 5856; 5,82 log UFC/g para *B. coagulans* GBI-30 6086 e 6,25 log UFC/g para *B. subtilis* PXN 21), em comparação àquelas observadas para as cepas dos gêneros *Lactobacillus* (3,65 log UFC/g para *L. acidophilus* La-05 e 5,05 log UFC/g para *L. paracasei* PXN 37) e *Bifidobacterium* (4,93 log UFC/g para *B. brevis* PXN 25 e 5,88 log UFC/g para *B. animalis* Bb-12) (Tabela 5).

Embora as porcentagens de sobrevivência às condições *in vitro* do TGI pelos esporos de *Bacillus* probióticos tenham apresentado redução no final da vida de prateleira do produto, os valores obtidos mostraram-se superiores a 80%, com contagens de 5,82±0,73 (*B. coagulans* GBI 30 6086), 6,40±0,20 (*B. subtilis* PXN 21) e 7,17±0,03 (*B. coagulans* MTCC 5856) esporos/g (Tabela 3). Por outro lado, somente a cepa *B. animalis* Bb-12 dentre as BAL, exibiu contagens elevadas após o contato dos micro-organismos com os sucos digestivos (95,24%) após 45 dias, atingindo contagem de 5,89±0,44 log UFC/g (Tabela 5), mostrando melhor desempenho dessa cepas na matriz láctea.

Dentre as outras BAL avaliadas, no término da vida de prateleira das amostras de requeijão cremoso, após 6h de digestão simulada, a viabilidade de *L. paracasei* PXN 37 diminuiu 26,95%, o que correspondeu a uma redução de 3,71 log UFC da sua população inicial, indicando que o micro-organismo é sensível ao contato com os fluidos do TGI. As cepas *L. acidophilus* La-5 e *B. breve* PXN 25 apresentaram porcentagens de sobrevivência inferiores a 70%, determinadas no início e ao final da vida de prateleira do alimento (45 dias sob refrigeração), após exposição aos fluidos simulados do TGI (Tabela 3). Assim, nessas condições, as populações dessas mesmas cepas foram determinadas em 3,65 e 4,93 log UFC/g, respectivamente, no 45° dia de armazenamento do alimento. A diminuição da concentração do micro-organismo probiótico no

requeijão cremoso está associada a redução de sua viabilidade diante das condições simuladas do TGI e na vida de prateleira, critérios primordiais para caracterizar um alimento probiótico.

3.2.2. Viabilidade das cepas probióticas adicionadas em suco de laranja expostas à digestão simulada

Nas amostras de suco de laranja avaliadas, dentre as BAL estudadas, as cepas do gênero *Bifidobacterium* não foram capazes de sobreviver após o contato com as enzimas digestivas simuladas do TGI, nos dois intervalos de tempos testados (início e final da vida de prateleira- T_0 e T_f) (Tabela 3). Assim, *Bifidobacterium* spp. apresentaram maior sensibilidade à acidez, sendo suas populações inferiores ao limite de detecção do método empregado (1 log UFC/mL) devido ao estresse causado pelo pH da matriz em que foram inoculados e pelo ambiente gastrintestinal simulado. Na realidade, sabe-se que as espécies do gênero *Bifidobacterium* são notoriamente mais sensíveis a alimentos com pH ácidos (4,5-5,0) e alcalinos (8,0-8,5) (Macedo, Luchese, Guerra, & Guimar, 2008), por ter menor capacidade de pós-acidificação, a qual é capacidade constante de produção de ácidos, característica principalmente observada em cepas do gênero *Lactobacillus*.

Entre as BAL avaliadas, *L. paracasei* PXN 37, juntamente com os esporos de *Bacillus* probióticos (MTCC 5856; GBI-30 6086 e PXN 21) exibiram as maiores porcentagens de sobrevivência (68,36%; 97,14%, 95,35% e 84,59%, respectivamente) no primeiro dia de estocagem após contato com as enzimas simuladas do TGI, atingindo contagens de $5,51 \pm 0,87$; $7,97 \pm 0,15$ e $7,55 \pm 0,05$, $6,35 \pm 0,39$ log UFC/mL respectivamente (Tabela 2). Porém, após os 7 dias de armazenamento do produto alimentício, observou-se população reduzida de *L. paracasei* PXN 37, o qual exibiu sobrevivência de 49,55% ($3,92 \pm 1,17$ log UFC/mL) (Tabela 3). De outro modo, *L. acidophilus* LA-5 foi capaz de se multiplicar durante a vida de prateleira do produto, resistindo às condições hostis simuladas do TGI e aumentando sua população inicial em aproximadamente 2 vezes no final da estocagem do suco (202,68), recuperando sua população ($3,69 \pm 2,0$ para $7,02 \pm 0,36$) (Figura 4B). Isto pode estar relacionado à uma possível adaptação da célula vegetativa ao meio durante o processo simulado de digestão, aumentando sua tolerância às mudanças de pH devido a sua alta capacidade de pós-acidificação (Macedo et al., 2008) ou ao fato de algumas cepas expressarem proteínas de resposta ao estresse (Ferreira, 2011), conseguindo multiplicar-se nas condições simuladas do TGI. Outra possível explicação para tal aumento da população de *L. acidophilus* La-05 é sua boa adaptação a matriz probiótica

(suco de laranja), a qual é caracterizada como ácida. Por sua vez, os esporos das cepas de *Bacillus* apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 80% (7,89 log UFC/g para *B. coagulans* MTCC 5856; 6,94 log UFC/g para *B. coagulans* GBI-30 6086 e 6,38 log UFC/g para *B. subtilis* PXN 21) (Tabela 3), indicando maior viabilidade em comparação àquelas determinadas para BAL nas amostras de suco de laranja após contato com fluidos simulados do TGI.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos a partir das análises de sobrevivência de cepas probióticas veiculadas nas amostras de suco de laranja, em cada fase da digestão *in vitro*, no início e ao final (7 dias) de sua vida de prateleira.

No primeiro dia de estocagem do suco de laranja, foi observada baixa população de *B. breve* PXN 25 ($1,59 \pm 0,06$ log UFC/mL), a qual se manteve após contato com HCl e pepsina (pH 2) ($1,79 \pm 0,02$ log UFC/mL), o que pode ser explicado por viés da contagem da cepa probiótica, visto que no tempo inicial está abaixo de 6 ciclos log UFC/mL. Ao final da digestão gástrica, os esporos de *B. subtilis* PXN 21 (6,35 log esporos/mL) e *L. acidophilus* La-5 (6,35 log esporos/mL) exibiram populações mais elevadas em comparação àquelas determinadas para *B. breve* PXN 25 (1,79 log UFC/mL) ($p < 0,05$), porém, menores em relação àquelas observadas para *B. animalis ssp lactis* Bb-12 (7,16 log UFC/mL), *L. paracasei* PXN 37 (8,13 log UFC/mL) e esporos de *B. coagulans* (8,02-8,11 log esporos/mL) ($p > 0,05$) (Figura 5B). Após 7 dias de refrigeração das amostras de suco de laranja e exposição dos micro-organismos probióticos à etapa mais ácida do ensaio, *L. acidophilus* La-05 apresentou redução populacional mais expressiva ($3,10 \pm 0,18$ log UFC/mL) em comparação às demais cepas avaliadas ($p < 0,05$) (Tabela 3). Por outro lado, houve crescimento da população de *B. brevis* PXN 25 ($5,58 \pm 3,29$) em pH 2 no final da vida útil do suco de laranja, a qual não foi detectada nas próximas etapas da digestão simulada. A espécie *Bifidobacterium* possuem menor capacidade pós-acidificação do que as espécies de *Lactobacillus*, não se adaptando tão bem como essas em matrizes mais ácidas ou submetidas a uma variação de pH recorrente (Macedo et al., 2008).

Tabela 6. Viabilidade de diferentes cepas (log UFC/mL) ou esporos probióticos (log esporos/mL) inoculados em amostras de suco de laranja submetidos, no início (T₀) e ao final (T₇) de sua vida de prateleira, à digestão simulada (diferentes valores de pH) do trato gastrintestinal.

Cepa	pH 2	pH 5	pH 7
	(UFC/g)	(UFC/g)	(UFC/g)
T ₀			
<i>B. animalis</i> Bb-12	7,16 ^b ±0,10	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00
<i>B. breve</i> PXN 25	1,79 ^d ±0,02	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00
<i>L. acidophilus</i> La-05	6,34 ^c ±0,10	4,34 ^{ab} ±1,98	3,70 ^{ab} ±2,00
<i>L. paracasei</i> PXN 37	8,13 ^a ±0,06	5,47 ^a ±0,96	5,51 ^{ab} ±0,87
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086	8,02 ^a ±0,14	7,60 ^a ±0,05	7,55 ^{ab} ±0,05
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	8,11 ^a ±0,16	7,98 ^a ±0,07	7,97 ^{ab} ±0,15
<i>B. subtilis</i> PXN 21	6,35 ^c ±0,05	6,78 ^a ±0,09	6,35 ^{ab} ±0,39
T ₇			
<i>B. animalis</i> Bb-12	7,73 ^a ±0,02	5,57 ^{ab} ±0,67	0,00 ^c ±0,00
<i>B. breve</i> PXN 25	7,36 ^a ±0,68	0,00 ^c ±0,00	0,00 ^c ±0,00
<i>L. acidophilus</i> La-05	3,24 ^b ±0,03	6,26 ^{ab} ±1,08	7,02 ^{ab} ±0,37
<i>L. paracasei</i> PXN 37	8,04 ^a ±0,37	4,07 ^b ±1,12	3,92 ^b ±1,17
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086	7,86 ^a ±0,28	7,46 ^a ±0,38	6,94 ^a ±0,92
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	8,13 ^a ±0,07	8,05 ^{ab} ±0,06	7,89 ^{ab} ±0,12
<i>B. subtilis</i> PXN 21	7,55 ^a ±0,09	7,38 ^{ab} ±0,08	6,38 ^{ab} ±0,09

^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritos diferentes denotam diferenças significativas (p<0,05) entre diferentes cepas probióticas nos mesmos valores de pH baseado no Teste de Tukey.

Nas condições entéricas simuladas (pH 5 ou pH 7 contendo bile e pancreatina) no início da vida de prateleira da bebida avaliada, as cepas probióticas pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* apresentaram maior sensibilidade em comparação às demais, testadas sob as mesmas condições, não sendo possível detectá-las após 6 horas de digestão simulada (Figura 5A). No entanto, é interessante ressaltar que após 7 dias de armazenamento sob refrigeração e exposição a pH 5, as amostras de suco de laranja contendo *B. animalis* ssp *lactis* Bb-12 exibiram contagens mais elevadas que aquelas determinadas no início da vida de prateleira; no entanto, nova redução foi observada quando o pH 7 foi testado (Tabela 6). A rápida adaptação de *B. animalis* Bb-12 ao pH 5, pode indicar multiplicação do micro-organismo probiótico na primeira porção do intestino. Porém, a oscilação do valor do pH do meio durante o processo digestivo, muito provavelmente estressou a célula vegetativa, levando a sua morte.

Ao final da vida de prateleira das amostras de suco de laranja, ao ser exposto a enzimas entéricas (pH 5 e 7), foi observado que as contagens da população de *L. acidophilus* La-05 aumentaram em relação ao começo da vida de prateleira da bebida, principalmente no pH 7 (3,32 ciclos log) (Tabela 4), podendo indicar sua melhor adaptação ao micro ambiente com pH próximo ao ótimo requerido para a multiplicação de BAL (pH 6,2).

Conforme observado no presente estudo, os esporos de *Bacillus* apresentaram maiores populações quando comparadas às BAL após o contato com as enzimas digestivas nos diferentes valores de pH testados, tanto no início, quanto ao final da vida de prateleira das amostras de suco de laranja (Tabela 6). O processo de digestão e o armazenamento portanto não afetou a viabilidade dos esporos probióticos, os quais atingiram as contagens de $7,89 \pm 0,12$, $6,94 \pm 0,92$ e $6,38 \pm 0,09$ log esporos/mL para *B. coagulans* MTCC 5856, *B. coagulans* GBI-30 6086 e *B. subtilis* PXN 21. Por outro lado, dentre as cepas de BAL, *L. paracasei* PXN 37, no início e ao final da vida de prateleira, apresentou maior resistência determinada na fase gástrica, com redução de apenas $0,08 \pm 0,44$ log UFC/mL; contudo, sua viabilidade foi reduzida quando exposta às condições entéricas testadas ($1,40 \pm 0,23$ no pH 5) e ($1,59 \pm 0,43$ no pH 7) (Tabela 3). Ainda, as contagens obtidas para *L. paracasei* PXN 37, determinadas no 7º dia de armazenamento das amostras de suco de laranja submetidas a pH 5 ($4,07 \pm 1,11$ log UFC/mL) e 7 ($3,92 \pm 1,17$ log UFC/mL) foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) àquelas determinadas para os esporos de *B. coagulans* MTCC 5856 (8,05 e 7,92 log esporos/mL, respectivamente).

Portanto, as BAL probióticas adicionadas às amostras de suco de laranja não conseguiram manter sua concentração inicial (7-8 log UFC/mL) após contato com os fluidos simulados do

TGI (Tabela 6). Comportamento oposto foi verificado em relação aos esporos de *Bacillus*, os quais mostraram-se resistentes frente ao pH da matriz (3,5-4,0) e à variação do pH dos fluidos das fases gástrica (2) e entéricas I (5) e II (7), exibindo elevados percentuais de sobrevivência (Tabela 3).

3.3.3. Viabilidade das cepas probióticas adicionadas em pão caseiro expostas à digestão simulada

Devido à presença da etapa de forneamento do pão (180°C/20 min) houve redução ($p < 0,05$) nas populações dos esporos probióticos estudados (Tabela 2), cujas populações iniciais mostraram-se iguais ou inferiores a 7 log esporos/g. É possível que um aumento do inóculo inicial adicionado à massa do pão pudesse “compensar” essa redução na sobrevivência dos micro-organismos probióticos, superando o “obstáculo” representado pelo processamento térmico austero ao qual o produto alimentício é submetido.

Após serem submetidos aos fluidos do TGI no final da vida de prateleira, as populações de esporos de *B. subtilis* PXN 21 apresentaram menores contagens (4,45 log UFC/g), quando comparadas às outras cepas probióticas (7,25 e 6,67 log UFC/g para os esporos de *B. coagulans* MTCC 5856 e GBI-30 6086 respectivamente) (Figura 6B). A média de sobrevivência dos esporos de *Bacillus* spp. após a digestão no (t_f) da vida útil do pão foi de 91,91%, mas deve-se considerar que a contagem inicial esteve abaixo de 7 log UFC/g. Portanto, mesmo havendo declínio de aproximadamente de 1 a 2 ciclos log da população de esporos probióticos inoculados no pão, devido às altas temperaturas do processamento de panificação, as populações se mantiveram estáveis após contato com os fatores estressantes do TGI.

Em um estudo conduzido por Soukoulis et al. (2014), utilizaram-se pães com filmes comestíveis contendo proteínas do soro e alginato de sódio, aos quais foi adicionado o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG. Aqueles autores observaram resultados satisfatórios quanto à viabilidade do micro-organismo probiótico antes e após digestão simulada do alimento, com populações determinadas, respectivamente, nas faixas de 7,57-8,98 e 6,55-6,91 log UFC/porção. No entanto, o método empregado por aqueles pesquisadores para a produção de pães probióticos pode não ser economicamente viável, dada sua complexidade e elevado custo para utilização pela indústria de panificação. Na realidade, a utilização de cepas probióticas (células vegetativas) em pães é um desafio para a indústria de alimentos, já que os

micro-organismos não sobreviveriam aos processos térmicos aos quais o produto alimentício é submetido. Dessa maneira, são necessários mais estudos com cepas probióticas mais resistentes aos processos deléteriões às células vegetativas probióticas, utilizando-se por exemplo, esporos de *Bacillus*, o que ampliaria o leque de opções de alimentos probióticos no mercado.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos para a enumeração dos esporos das cepas de *Bacillus* com potencial probiótico inoculados nas amostras de pão durante a vida de prateleira (inicial e final), submetidas às condições gástricas simuladas.

Tabela 7. Viabilidade de diferentes esporos probióticos (log esporos/g) inoculados em amostras de pão submetidas, no início (T₀) e ao final (T₇) de sua vida de prateleira, à digestão simulada (diferentes valores de pH) do trato gastrointestinal.

Cepa	pH 2	pH 5	pH 7
	(UFC/g)	(UFC/g)	(UFC/g)
	T ₀		
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086	5,96 ^a ±0,70	6,06 ^a ±0,67	6,12 ^a ±0,49
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	6,50 ^a ±0,46	6,46 ^a ±0,37	6,64 ^a ±0,61
<i>B. subtilis</i> PXN 21	5,22 ^a ±1,18	4,93 ^a ±1,03	4,22 ^a ±1,22
	T ₇		
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086	6,16 ^a ±0,54	5,90 ^a ±0,69	5,97 ^a ±0,59
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856	5,79 ^a ±0,56	5,93 ^a ±0,26	6,46 ^{ab} ±0,25
<i>B. subtilis</i> PXN 21	4,48 ^a ±0,06	4,27 ^a ±0,43	4,01 ^b ±0,54

^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritos diferentes denotam diferenças significativas (p<0,05) entre diferentes cepas probióticas nos mesmos valores de pH baseado no Teste de Tukey.

De acordo com nossos resultados, no início da vida de prateleira do pão, as populações de esporos de *Bacillus* probióticos se mantiveram estáveis durante todas as fases da digestão (pH 2, 5 e 7), com redução da sua população abaixo de 1 ciclo log, indicando o pão como matriz promissora como alimento funcional com a utilização de esporos probióticos. Porém, os esporos de *B. subtilis* PXN 21 mostraram-se mais sensíveis ($4,22 \pm 1,22$ log esporos/g) ($p < 0,05$) quando comparados aos verificados para *B. coagulans* MTCC 5856 ($6,46 \pm 0,25$ log esporos/g) no final da fase entérica II (pH 7) (Tabela 7).

O uso de probióticos em pães representa um grande desafio para a indústria alimentícia, visto que as altas temperaturas são letais para esses micro-organismos. Dessa maneira, a aplicação de esporos probióticos possibilita que esse alimento, amplamente consumido no mundo todo, possa ser adicionado de probióticos esporulados e, por conseguinte, exiba propriedades funcionais, promovendo benefícios à saúde do consumidor. Embora membros do gênero *Bacillus* não sejam considerados habitantes naturais do TGI, por não possuírem capacidade de adesão ao epitélio intestinal, seu consumo regular pode levar a um maior tempo de residência no organismo humano (Donskey et al., 2001; Endres et al., 2009). Por outro lado, várias espécies de *B. subtilis* foram encontradas no TGI humano, apoiando a hipótese que esses micro-organismos são comensais neste sítio anatômico (Hong et al., 2009). Isso demonstra o potencial do uso de esporos de *Bacillus* com características probióticas para adição a alimentos, a fim de promover a saúde do consumidor.

4. Conclusão

A sobrevivência das cepas probióticas tradicionais, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, frente aos fluidos do TGI mostrou-se reduzida ao final do período de armazenamento dos produtos alimentícios estudados. O mesmo não foi observado em relação a *Bacillus* spp. probióticos em todas as matrizes alimentícias estudadas, os quais exibiram percentual de sobrevivência acima de 80% mesmo no final da vida de prateleira, além de apresentarem maiores contagens de células viáveis (esporos) ($> 6 \log$ UFC/g ou mL) baseado na literatura disponível.

O presente estudo evidenciou, portanto, resultados animadores quanto à elevada sobrevivência das populações de esporos de *Bacillus* adicionados às diferentes matrizes alimentícias e expostas, no início e ao final de sua vida de prateleira, às condições simuladas do TGI.

Os esporos com potencial probiótico demonstraram boa estabilidade nos alimentos avaliados. Fatores como tempo (duração da vida de prateleira) e condição de armazenamento (refrigerado ou não), além da composição físico-química e processamento dos diferentes alimentos não afetaram negativamente a viabilidade dos esporos de *Bacillus* probióticos. Além disso, a sobrevivência das cepas de *Bacillus* testadas mantiveram-se elevadas, indicando sua maior resistência, mesmo após contato com fluidos simulados do TGI em todas matrizes avaliadas, em comparação com menores percentuais observados para as cepas de BAL.

Portanto, o uso de esporos de *Bacillus* são promissores para utilização como probióticos em alimentos, em substituição às células vegetativas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, as quais são mais sensíveis à algumas etapas de processamento de alguns alimentos, podendo ampliar a possibilidade de aplicações de micro-organismos probióticos pela indústria de alimentos em diversas matrizes.

Agradecimentos

Financiamento: Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) mediante a concessão da bolsa de estudos à M. B. Soares (Processo nº 2013/21544-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) aos projetos

desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos da FEA/UNICAMP.

5. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (2016). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>

Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria- ABIP Disponível em: <<http://www.abip.org.br>>. Acesso em: 24.Abr.2017.

Associação Brasileira das Indústrias de Queijo- ABIQ. Evolução do Mercado Brasileiro de queijos, 2013.

Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, a., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 166–174. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.015>

Batista, A. L. D., Silva, R., Cappato, L. P., Almada, C. N., Garcia, R. K. a, Silva, M. C., ... Cruz, A. G. (2015). Quality parameters of probiotic yogurt added to glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical-chemical and metabolic activity analyses. *Food Research International*, 77, 627–635. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.017>

Bedani, R., Vieira, A. D. S., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2014). Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 436–443. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.015>

Buriti, F. C. A., Castro, I. A., & Saad, S. M. I. (2010). International Journal of Food Microbiology Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions, 137, 121–129. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.030>

Céspedes, M., Cárdenas, P., Staffolani, M., Ciappini, M. C., & Vinderola, G. (2013). Performance in nondairy drinks of Probiotic L. Casei strains usually employed in dairy products. *Journal of Food Science*, 78(5), 756–762. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.12092>

Chaves, K. S., & Gigante, M. L. (2016). Prato cheese as suitable carrier for *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium* Bb12. *International Dairy Journal*, 52, 10–18. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.009>

CitrusBr (2011). associação Nacional de Exportadores de Sucos Cítricos. Beverages Global Market. São Paulo, SP. Disponível em: www.citruabr.com

Costa, J., & Silva, D. A. (2013). Estabilidade físico-química e avaliação da digestibilidade in vitro de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste.

Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214–20. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>

- Donkor, O. N., Henriksson, a., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16(10), 1181–1189. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.008>
- Donskey, C. J., Hoyen, C. K., Das, S. M., Farmer, S., Dery, M., & Bonomo, R. a. (2001). Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), 84–88. <http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00948.x>
- Drunkler, D.A. (2009). Tese do Programa de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. Produção de requeijão cremoso simbiótico. Curitiba, PR.
- Endres, J. R., Clewell, a, Jade, K. a, Farber, T., Hauswirth, J., & Schauss, a G. (2009). Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(6), 1231–8. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.018>
- Favaro-Trindade, C. E. A. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(2), 103–112.
- Fernandes, M. S., Cruz, A. G., Dias Arroyo, D. M., Faria, J. D. A. F., Cristianini, M., & Sant’Ana, A. S. (2013). On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and product’s functionality. *Food Control*, 34(2), 331–335. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.040>
- Ferreira, A.B. (2011). Tese do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. Respostas fisiológicas e moleculares de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H₂b20 aos estresses ácido e por sais biliares. Viçosa, 2011.
- Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), 284–292. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66,365–378.
- Gaino, V. D. O., Voltarelli, V. P., Rensis, C. M. V. B. De, & Vianna, P. C. (2012). Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de *Lactobacillus casei*, da composição físico-química e aceitação sensorial. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(Supl2), 3133–3142. <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33Supl2p3133>
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M., & Zhang, H. P. (2009). In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1640–1646. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.025>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(August 2014), 9. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Homayoni Rad, A., Mehrabany, E. V., Alipoor, B., Mehrabany, L. V., & Javadi, M. (2012). Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28(7-8), 733–6. <http://doi.org/10.1016/j.nut.2012.01.012>

- Hong, H. a, Khaneja, R., Tam, N. M. K., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., ... Cutting, S. M. (2009). *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in Microbiology*, *160*(2), 134–43. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.11.002>
- Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(3), 253–260. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, a. (2010). Application of probiotics in food products--challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(2), 175–81. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.009>
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(1-2), 216–22. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020>
- Klingberg, T., & Budde, B. (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *International Journal of Food Microbiology*, *109*(1-2), 157–159. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.014>
- Klu, Y. A. K., & Chen, J. (2015). Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(2), 983–988. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>
- Liserre, A.M.; Ré, M.I.; & Franco, B.D.G.M. (2007). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate–chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, *21*, 1–16.
- Luckow, T. and Delahunty, C. 2004. Which juice is ‘healthier’? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference* *15*: 751– 759.
- Macedo, N., Luchese, R. H., Guerra, F., & Guimar, C. (2008). Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp . e *Lactobacillus* spp . em leite. *Food Science and Technology*, *28*(4), 935–942. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400027>
- Madureira, a. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, a. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, *15*(6-9), 921–927. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.025>
- Martinez, R. C. R., Aynaou, A. E., Albrecht, S., Schols, H. a., De Martinis, E. C. P., Zoetendal, E. G., ... Smidt, H. (2011). In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. *International Journal of Food Microbiology*, *149*(2), 152–158. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.010>
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, *51*(2), 764–770. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>
- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, *44*(5), 1276–1283. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>

- Pereira, E. P. R., Faria, J. A. F., Cavalcanti, R. N., Garcia, R. K. A, Silva, R., Esmerino, E. A., Cruz, A. G. (2016). Oxidative stress in probiotic Petit Suisse: Is the jabuticaba skin extract a potential option? *Food Research International*, *81*, 149–156. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.034>
- Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., & Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science and Technology*, *26*(1), 31–42. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.006>
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, *43*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
- Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M. M., Sartor, R. B., ... Mayer, E. a. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, *62*(5), 787–96. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302504>
- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., ... Hatakka, K. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(2), 293–300. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.009>
- Schillinger, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, *15*(12), 1289–1297. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.008>
- Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *8*(2), 279–284. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.007>
- Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *4*(4), 423–431. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010>
- Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, *13*, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.11.001>
- Silva, P. D. L. Da, Bezerra, M. D. F., Santos, K. M. O. Dos, & Correia, R. T. P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(1), 452–457. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.055>
- Socol, C. R., Porto, L., Vandenberghe, D. S., Spier, M. R., Bianchi, A., Medeiros, P., & Yamaguishi, C. T. (2013). The Potential of Probiotics : A Review, *48*(4), 413–434.
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H.-H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible film as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, *39*, 231–242. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.023>
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Morelli, L., Visconti, A., & Lavermicocca, P. (2006). In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(4), 3042–3045. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.4.3042-3045.2006>

Van Dender, A. G. F. Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado. São Paulo, SP: Setembro Editora. 2014.

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187–216. <http://doi.org/10.1023/A:1020631532202>

Wang, J.; Guo, Z.; Zhang, Q.; Yan, L.; Chen, W.; Liu, X.M.; Zhang, H.P.(2009). Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soy milk and bovine milk during storage. *Journal of Dairy Science*, 92, 2468–2476.

Zhang, L., Huang, S., Ananingsih, V. K., Zhou, W., & Chen, X. D. (2014). A study on *Bifidobacterium lactis* Bb12 viability in bread during baking. *Journal of Food Engineering*, 122(1), 33–37. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.029>

Capítulo 3

**Comportamento de diferentes cepas de *Bacillus* probiótico
ao longo do processamento e armazenamento de requeijão
cremoso**

**Comportamento de diferentes cepas de *Bacillus* probiótico ao longo do
processamento e armazenamento de requeijão cremoso**

Mariana Batista Soares^a; Carine Nunes Almada^a; Caroline Nunes Almada^a; Hugo L. A.
Silva^b, Adriano Gomes da Cruz^{bc}; Rafael C. R. Martinez^a; Anderson de Souza
Sant'Ana^{a*}.

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, Brasil.

^bDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

^cInstituto Federal Fluminense, Campos dos Goitacazes, RJ, Brasil.

.

*Autor correspondente: Prof. A. S. Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brasil. Contato: +55(19) 3521-2174.

**Artigo formatado conforme as normas da revista “International Journal of Food
Microbiology”**

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento de diferentes esporos de cepas probióticas de *Bacillus* adicionadas individualmente a requeijão cremoso durante o processamento e estocagem do produto alimentício. Os esporos das cepas probióticas de *Bacillus* (*B. coagulans* MTCC 5856, *B. coagulans* GBI-30 6086, *B. subtilis* PXN 21, *B. subtilis* PB6 e *B. flexus* HK1) foram adicionadas individualmente às formulações de requeijão cremoso em diferentes etapas - pasteurização, coagulação e fusão da massa - e sua sobrevivência determinada em cada uma delas. Além disso, a sobrevivência das cepas probióticas de *Bacillus* foi avaliada ao longo da vida de prateleira do produto (45 dias a 6°C). A composição centesimal, proteólise e perfil de ácidos graxos foram determinados nas amostras de requeijão durante a vida de prateleira. Os esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 apresentou maior sobrevivência durante todas as etapas do processamento do requeijão cremoso e suas populações mantiveram-se estáveis e não apresentaram alterações químicas durante o período de 45 dias de armazenamento. A adição dos esporos probióticos na etapa de fusão mostrou-se melhor momento de adição da cultura microbiana, podendo facilitar o processo tecnológico e evitar a recontaminação do produto final.

Palavras chaves: esporos probióticos, *Bacillus*, requeijão cremoso, sobrevivência microbiológica, condições adversas, manufatura.

1. Introdução

Os queijos são considerados uma boa matriz alimentícia para adição de micro-organismos probióticos devido às suas características intrínsecas (pH relativamente elevado (4,8-5,6), elevado teor de gordura, baixo teor de oxigênio), as quais protegem-os durante o trânsito pelo trato gastrointestinal (TGI) (Boylston et al., 2004; Hayes et al., 2006; Van Dender, 2008). O requeijão cremoso está inserido dentro do grupo de queijos fundidos ou processados, mas possui características semelhantes à queijos frescos devido a sua umidade e, eventualmente, teor de gordura. Essas características favorecem a sobrevivência e multiplicação de micro-organismos probióticos em comparação a queijos curados, uma vez que o produto apresenta tempo de armazenamento reduzido, possuem o pH próximo da neutralidade, uma matriz de alimentos semi-sólido com uma concentração lipídica relativamente alta, menor quantidade de sal, maior teor de umidade e elevada atividade de água.

O requeijão é obtido a partir da fusão de uma massa de coalhada fresca dessorada e lavada com adição de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*. A denominação requeijão está reservada ao produto cuja base láctea não contém gordura e/ou proteína de origem não láctea (Munck e Campos, 1984; Portaria No 359/1997 do MAPA). Na realidade, é um produto tipicamente brasileiro e de alto consumo no país (Sebrae, 2008, Teixeira, 2012; Van Dender, 2008). Assim, de acordo com uma pesquisa realizada pelo Sebrae (2008), aproximadamente 68% dos brasileiros consomem regularmente queijos, dos quais 39% relatam o consumo habitual de requeijão, indicando a relevância do produto alimentício para esses consumidores (Teixeira, 2012).

Devido às características elencadas acima, o requeijão apresenta elevado potencial como produto funcional (Teixeira, 2012). Apesar de veiculados em diversos alimentos, particularmente no caso do requeijão cremoso, há limitações tecnológicas importantes para a incorporação de probióticos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, uma vez que essas bactérias apresentam baixa resistência térmica e, portanto, não resistiriam à etapa de fusão da massa (90°C/5 minutos) empregada para a obtenção do produto alimentício. Por outro lado, a adição desses micro-organismos após esta etapa poderia permitir a recontaminação do alimento (Queiroz et al., 2013; Sunny-Roberts & Knorr, 2009).

Nesse contexto, a incorporação de culturas probióticas esporuladas parece ser a melhor alternativa para produtos alimentícios que apresentam etapa(s) de tratamento(s) térmico(s) durante o processamento, a(s) qual(is) garantem sua estabilidade durante a vida de prateleira.

O uso de esporos com potencial probiótico constitui, portanto, uma alternativa promissora para superar as limitações do emprego de micro-organismos probióticos tradicionais (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.), principalmente em alimentos cujos processamentos apresentam etapas subletais e letais; além disso, podem resistir às condições adversas encontradas no TGI (Cutting, 2011; Huynh a Hong et al., 2005; Nithya & Halami, 2012).

Dentre os micro-organismos esporulados, *Bacillus* spp. são os mais frequentemente empregados como probióticos (Cutting, 2011). Na realidade, os probióticos esporulados têm sido utilizados nos últimos anos como suplemento para alimentação animal, humana e em tratamentos médicos para distúrbios intestinais e problemas urinários (Nithya & Halami, 2012). Nesse contexto, destacam-se as seguintes espécies: *Bacillus subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* e *B. licheniformis* (Cutting, 2011).

Embora a aplicação de probióticos esporulados seja muito atrativa, há necessidade de uma avaliação aprofundada para determinar, por exemplo, o efeito de diferentes etapas do processamento na sua sobrevivência, de maneira que os esporos estejam viáveis no produto final e ao longo da vida de prateleira para que exerçam seus efeitos benéficos à saúde (Sorokulova, 2008).

Até o presente momento, não foram publicados estudos na literatura científica que determinam a sobrevivência de esporos probióticos em queijos processados. Além disso, há escassos trabalhos que avaliaram o emprego de requeijão cremoso como veículo para esses micro-organismos probióticos, sendo, portanto, a versão probiótica não disponível para comercialização. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e comportamento de cinco cepas de *Bacillus* probióticos, adicionadas em diferentes etapas do processo de fabricação de requeijão cremoso, durante o processamento e durante o período de estocagem do produto (45 dias a 6°C), assim como caracterizá-lo quimicamente.

2. Material e Métodos

2.1. Processamento do requeijão cremoso

2.1.1. Matérias-primas

O requeijão foi processado utilizando-se leite pasteurizado semi-desnatado tipo A (Xandô, São Paulo, SP), creme de leite pasteurizado com teor de 35% gordura (Atilate, Itatiba, SP), ácido láctico 85% de pureza (1:10 v/v) (Dinâmica, São Paulo, SP), cloreto de sódio

(Dinâmica, São Paulo, SP), sal fundente JOHA S9 (ICL FoodSpecialties, São Bernardo do Campo, SP) e sorbato de potássio (Dinâmica, São Paulo, SP).

2.1.2. Elaboração da matriz probiótica

O leite foi aquecido até a temperatura de 70°C e, em seguida, foi adicionado de 0,28% (v/v) de ácido láctico. A suspensão foi agitada manualmente até obtenção de uma mistura homogênea; a em seguida, esta mistura foi mantida em repouso por 30 min para que ocorresse a coagulação da massa (coagulação ácida a quente). Posteriormente, o gel formado foi fracionado e a massa dessorada com o auxílio de peneiras de tecido e lavagem com água destilada estéril gelada até que a massa atingisse o valor de pH correspondente a 5,2. Finalmente, a massa foi prensada manualmente e mantida sob refrigeração até o dia seguinte (*overnight*).

Após a completa dessoragem, foram adicionados os demais ingredientes: creme de leite, água, cloreto de sódio e sal fundente na proporção de 37%, 20%, 1,5% e 1,5%, respectivamente em relação à massa (g/g) básica obtida. Em seguida, a mistura foi submetida à etapa de aquecimento (90°C/5 minutos) sob agitação manual em bico de bunsen até completa fusão. O produto foi então resfriado até 70°C, temperatura na qual foi adicionado o conservante sorbato de potássio na proporção de 1g/kg de requeijão. Finalmente, o requeijão foi envasado a quente utilizando-se potes plásticos de poliestireno descartáveis com capacidade para 100 mL, previamente sanitizados com solução de hipoclorito de sódio 200 ppm. O produto final foi estocado à temperatura de 6°C por 45 dias.

2.2. Cepas probióticas

Esporos de cepas probióticas liofilizadas (DVS) de *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 (Ganeden Biotech, Mayfield Heights, Estados Unidos); *Bacillus coagulans* MTCC 5856 (Sabinsa Corporation, New Jersey, Estados Unidos); *Bacillus subtilis* PXN 21 (Protexin, Lopen Head, Reino Unido); *Bacillus subtilis* PB6 (Kemin, Indaiatuba, Brasil) e *Bacillus flexus* HK1 (Mysore, Índia), foram adicionadas diretamente matriz alimentar na concentração de 10^6 - 10^7 esporos/grama do produto final.

2.3. Inoculação das cepas probióticas de *Bacillus* em diferentes etapas do processamento do requeijão

Os esporos probióticos, descritos no item 2.2., foram inoculados, individualmente, na concentração de 10^6 - 10^7 esporos/g ou mL em diferentes etapas do processo de produção de requeijão cremoso (Figura 1). A confirmação dos inóculos preparados, por sua vez, foi realizada de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes (item 2.4).

As etapas escolhidas para a avaliação da sobrevivência dos esporos incluíram pasteurização do leite, coagulação da massa e fusão da massa. Tais etapas foram selecionadas para determinação do momento mais adequado para a adição dos esporos probióticos, acompanhando sua sobrevivência a diferentes níveis de estresse presentes durante o processamento do requeijão cremoso. Dessa maneira, na etapa de pasteurização, os esporos foram adicionados diretamente ao leite e submetidos à temperatura de 65°C durante 30min. Alternativamente, na segunda etapa, os esporos foram inoculados após o momento em que o leite atingiu 70°C e adicionou-se a solução de ácido láctico 85% (1:10v/v) para coagulação do leite (30 min de repouso) para obtenção da massa fresca. A última etapa avaliada no processo de produção de requeijão cremoso foi a de fusão, na qual os os esporos probióticos foram adicionados após os ingredientes terem sido misturados à massa fresca e aquecidos até 90°C. Em seguida, o material foi homogeneizado e mantido sob aquecimento (90°C) por 5 minutos para obtenção do produto final.

2.3.1. Amostragem de requeijão cremoso adicionado de *Bacillus* probióticos em diferentes etapas do processamento do alimento

Durante as diferentes etapas de processamento do requeijão (pasteurização, coagulação e fusão) foram retiradas alíquotas (1 ml) do alimento em intervalos de tempo pré-determinados, as quais foram empregadas para a enumeração das populações dos esporos probióticos. Assim, durante a etapa de pasteurização do leite foram obtidas alíquotas do alimento em $T_{0\text{min}}$, $T_{10\text{min}}$, $T_{20\text{min}}$, $T_{30\text{min}}$. Por sua vez, durante a etapa de coagulação da massa foram coletadas alíquotas do alimento em $T_{0\text{min}}$, $T_{30\text{min}}$, além de T_m (massa coagulada) e T_{ov} [massa e prensada no dia do processamento e após o repouso (*overnight-24h*) durante a coagulação]. Finalmente, na etapa de fusão da massa foram retiradas alíquotas do alimento em $T_{0\text{min}}$, $T_{2,5\text{min}}$, $T_{5\text{min}}$, $T_{20\text{min}}$.

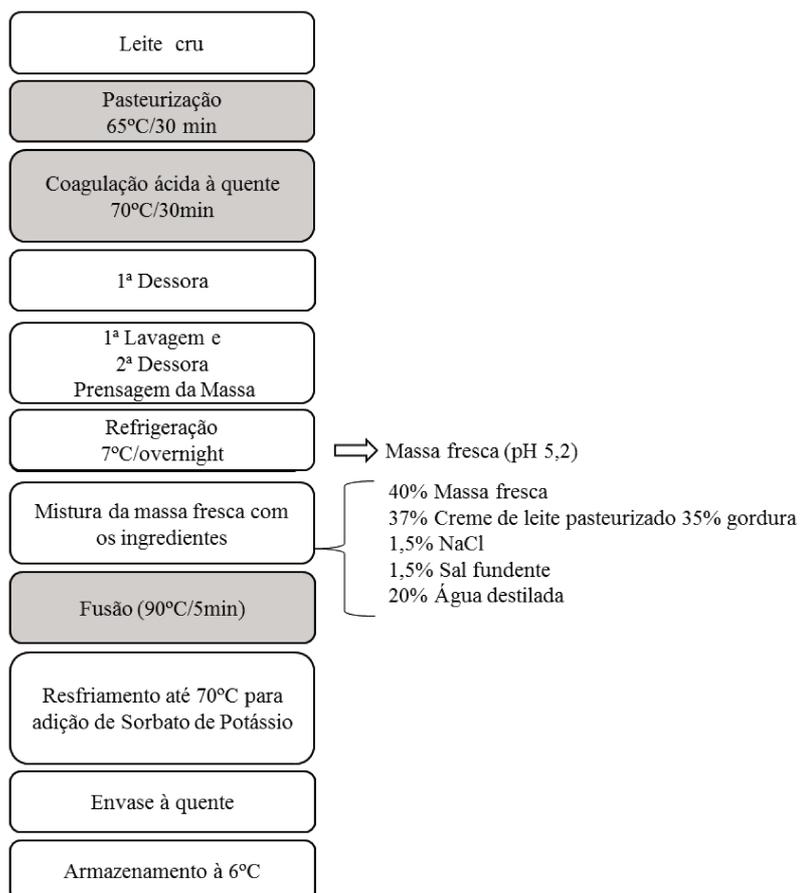


Figura 1. Esquema do processamento do requeijão cremoso realizado em escala de bancada. Etapas em realce (pasteurização, coagulação e fusão) foram as escolhidas para avaliar a sobrevivência dos esporos dos diferentes *Bacillus* probióticos.

2.4. Avaliação do comportamento de esporos de *Bacillus* probióticos durante a vida de prateleira do requeijão cremoso

Para a determinação da população de *Bacillus* probióticos durante a vida de prateleira do produto, foram produzidas quatro tratamentos de requeijão cremoso. Esses tratamentos diferiram em relação à etapa de inoculação dos esporos probióticos e incluíram um grupo controle. Os requeijões foram denominados da seguinte maneira: RC – requeijão controle, sem adição de espora probiótico; RP – requeijão com espora probiótico adicionado ao leite, na etapa de pasteurização (65°C/30min); RF – requeijão com espora probiótico inoculado na etapa de fusão da massa (90°C/5min.), RPF – requeijão inoculado com espora probiótico após a etapa de fusão da massa (resfriamento à temperatura de 50°C).

Para esta etapa, os esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 foram selecionados por apresentarem melhor capacidade de sobrevivência (menor número de reduções decimais das populações de esporos, expressas como log UFC/g), quando submetidos às diferentes operações unitárias presentes no processamento de requeijão e por apresentarem status GRAS. Assim, como poderá ser observado nos resultados adiante, foram utilizados para avaliar a sobrevivência durante a vida de prateleira do produto final. Assim, *B. coagulans* GBI-30 6086 foi inoculada na concentração de 10^8 esporos/g em diferentes tratamentos de requeijão cremoso (RP, RF e RPF).

Os requeijões foram produzidos conforme indicado na Figura 1 e estocados durante 45 dias sob refrigeração (6°C). Alíquotas de 10g de cada tratamento foram analisadas semanalmente durante um período de 45 dias para enumeração das populações de esporos dos micro-organismos probióticos e determinação de sua sobrevivência durante a vida de prateleira do produto.

2.5. Enumeração dos esporos de *Bacillus* probióticos

Para a enumeração dos esporos probióticos, as amostras do alimento, obtidas em diferentes intervalos de tempo durante o processamento do requeijão cremoso e sua vida de prateleira, foram submetidas à etapa de choque térmico (80°C/10 min) utilizando-se banho-maria (Quimis modelo Q334M-28, Diadema, São Paulo, Brasil) e resfriadas imediatamente em banho de gelo. A seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas empregando-se os seguintes diluentes recomendados pelos fabricantes: solução salina 0,9% para *B. coagulans* MTCC 5856; água peptonada 1% (m/v) para *B. coagulans* GBI-30 6086 e HF1; água peptonada 2% (m/v) para *B. subtilis* PB6 e água peptonada 1% (m/v) adicionada de solução fisiológica de NaCl (0,8%, m/v) para *B. subtilis* PXN 21. A partir das diluições preparadas, alíquotas do material foram semeadas em meios de cultivo seletivos, de acordo com as recomendações dos fornecedores das cepas, os quais encontram-se reunidos na Tabela 1. Os resultados das contagens obtidas foram expressos como número de esporos/g do alimento.

Tabela 1. Cepas esporuladas probióticas, meios de cultivo e condições de incubação empregada.

Cepa	Choque térmico	Meio de cultura	Condições de Incubação	Fornecedor
<i>B. flexus</i> HK1 (Mysore, Índia)	80°C/ 10 min	Ágar Triptona, Extrato de Levedura e NaCl (LB)	37°C/24h em aerobiose.	Formulado*
<i>B. subtilis</i> PB6 (Kemin, Indaiatuba, Brazil)	80°C/ 10 min	Tryptone Soy Yeast Extract Agar (TSAYE)	30°C/16h em aerobiose.	Formulado*
<i>B. subtilis</i> PXN 21 (Protexin, Lopen Head, UK)	80°C/ 10 min	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP Ágar)	37°C/24h e 20°C/24h em aerobiose	Acumedia, Lansing, USA)
<i>B. coagulans</i> GBI-30 6086 (Ganeden Biotech, Mayfield Heights, EUA)	80°C/ 10 min	Glucose Yeast Extract Agar (BC)	40°C/ 48h em aerobiose	Formulado*
<i>B. coagulans</i> MTCC 5856 (Lactospore, New Jersey, EUA)	80°C/ 10 min	Glucose Yeast Extract Agar (GYEA)	37°C/72h em aerobiose	Formulado*

*Indicado em apêndice .

2.6. Análise química

2.6.1. Composição Centesimal

A composição centesimal (g/100 gramas de umidade, lipídeos e proteínas) das diferentes formulações de requeijão cremoso, no tempo inicial de vida de prateleira, realizada em triplicata, foi determinada usando métodos tradicionais para produtos lácteos (Brasil, 2006).

O teor de umidade do alimento foi determinado por meio da secagem direta de 5 gramas do alimento, empregando-se estufa aquecida à temperatura de 100-105°C durante 24h (AOAC, 1997). A quantificação de nitrogênio total ou proteína bruta foi realizada por meio do Método de Kjeldahl clássico utilizando-se 200 mg do requeijão cremoso e aplicação do fator de correção correspondente a 6,38 (AOAC, 1997). A quantificação de lipídeos foi realizada de acordo com o método de Gerber (Brasil, 2006), o qual emprega a hidrólise ácida com ácido sulfúrico para extração da gordura do alimento e é rotineiramente utilizado para a avaliação de leites e produtos lácteos. (Gomes da Cruz et al., 2009).

2.6.2. Proteólise

O nível de proteólise das amostras foi determinado no início e ao final da vida de prateleira do alimento por meio do método descrito por Gomes et al. (2011). Assim, uma porção de 5 g do requeijão cremoso foi misturada a 10 mL de 0,75% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA - Synth, Diadema, Brasil). Em seguida, a suspensão foi filtrada com emprego de papel de filtro qualitativo (Whatman, Inglaterra) e o filtrado obtido (150 uL) foi misturado a 3 ml de reagente OPA, contendo dodecilsulfato de sódio, tetraborato de sódio, decahidrato, ditiotreitol, o-ftalaldeído e etanol e deixado à temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$) durante 2 minutos. Finalmente, o nível de absorvância da solução foi medida com o emprego de um espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-70) e o comprimento de onda utilizado foi de 340 nm. A atividade proteolítica dos micro-organismos presentes em cada uma das formulações do requeijão cremoso foi expressa como a absorvância obtida a partir de grupos amino livres, utilizando-se a solução de TCA como branco. A análise foi realizada em triplicata.

2.6.3. Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos (AG) das amostras de requeijão cremoso foi determinado de acordo com Felício et al., 2016 com algumas modificações. Os lipídeos foram extraídos das amostras do alimento de acordo com a metodologia proposta por Silva et al. (2011). Assim, os ácidos graxos foram convertidos nos seus respectivos ésteres metílicos, os quais foram quantificados com o emprego de cromatografia em fase gasosa utilizando-se um cromatógrafo modelo 5975C da Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (FID), injeção de divisão (1: 100), uma coluna capilar de sílica fundida (Supelco SP-tm-2560, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e um gradiente de temperatura programada. A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 65°C durante 4 min; em seguida, foi elevada para 185°C (incremento de $16^\circ\text{C}/\text{min}$), mantendo-se esta temperatura durante 12 min; após este intervalo a temperatura foi novamente elevada, desta vez para 235°C (incremento de $20^\circ\text{C}/\text{min}$), a qual foi mantida por 14 minutos, totalizando 40 min de análise. A vazão do gás (White Martins, São Paulo, Brasil) foi de $1,4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o gás de limpeza (H_2), $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o gás auxiliar (N_2), e 30 e $300\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente, para o H_2 e gás de síntese utilizado para a chama. A separação foi 1/80, o volume de injeção de 2 mL, e a identificação e quantificação das amostras foram obtidas por meio da comparação dos tempos de retenção dos picos em relação aos seus respectivos padrões – Sigma 05.632 e Sigma 189-19. Os dados foram coletados utilizando-se o software MSD ChemStation e os AG classificados

em cadeia curta (AGCC de C2 a C4), cadeia média AG (AGCM de C6 a C12) e cadeia longa (AGCL de C14 a C24).

2.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram tratados utilizando-se o programa Assistat 7.7 Beta (UFPB, Campina Grande, PB, Brasil) e empregando-se os testes de Análise de Variância (ANOVA) e de médias (Teste T e Tukey). Para comparar as contagens de esporos da mesma cepa, no início (t_0) e final (t_f) de cada etapa do processamento do requeijão cremoso, bem como dos esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 no mesmo tratamento de requeijão cremoso, no início (t_0) e final (t_f) da vida de prateleira do alimento, foi aplicado o Teste t. Para comparar o número de reduções decimais entre os diferentes micro-organismos probióticos estudados, em cada etapa e cada tempo do processamento, assim como as populações de esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 nos diferentes tratamentos de requeijão cremoso, ao longo do período de estocagem do produto, foi aplicado o Tukey. Para a análise de proteólise foi utilizado o teste ANOVA com uma única fonte de variação (one-way), considerando-se a amostra em relação ao tempo de estocagem, seguido de teste de Turkey. Para análise de perfil de ácidos graxos e composição centesimal (umidade, lipídeos e proteínas) utilizou o teste ANOVA one-way, considerando-se amostra efeito-fixos; seguido de Tukey. O nível de significância adotado para ambos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

A adequada seleção da cepa probiótica e da matriz alimentícia à qual será adicionada, bem como a decisão sobre a melhor maneira de fazê-lo (quando e como) são parâmetros importantes para assegurar a viabilidade do micro-organismo ao longo do processamento e armazenamento do produto, os quais constituem desafios para as indústrias de alimentos (Drunkler, Sene e Oliveira, 2005; Drunkler, 2009). Assim, no presente estudo foi avaliada o comportamento de diferentes esporos probióticos de *Bacillus* no processamento e na estocagem do requeijão cremoso.

3.1. Comportamento de esporos de *Bacillus* probióticos adicionados a diferentes etapas de processamento do requeijão cremoso

Os resultados referentes à sobrevivência de *Bacillus* spp. potencialmente probióticos adicionados a diferentes etapas do processamento do requeijão cremoso estão representados na Tabela 2 e nas Figuras 2, 3 e 4.

Tabela 2. Número de redução (γ), expressa como valores de média \pm desvio padrão (log esporos/g), das populações das diferentes espécies de *Bacillus* determinadas entre o início (N_0) e ao final (N_f) de cada operação unitária durante processamento do requeijão cremoso.

Cepa	Etapas do processamento do Requeijão cremoso					
	Pasteurização		Coagulação		Fusão	
	No	γ	No	γ	No	γ
<i>B. subtilis</i>						
PB6	6,79 \pm 0,07	-0,07 ^a \pm 0,05	6,45 \pm 0,06	0,61 ^a \pm 0,08	6,70 \pm 0,10	-1,24 ^a \pm 0,07
<i>B. subtilis</i>						
PXN 21	5,92 \pm 0,22	-0,47 ^a \pm 0,53	5,41 \pm 0,76	-0,91 ^a \pm 1,26	5,31 \pm 0,27	-0,09 ^a \pm 0,58
<i>B.coagulans</i>						
GBI-30 6086	7,28 \pm 0,16	0,07 ^a \pm 0,02	6,61 \pm 0,17	-0,15 ^a \pm 0,44	7,41 \pm 0,27	-0,61 ^a \pm 0,16
<i>B. coagulans</i>						
MTCC 5856	7,01 \pm 0,42	-1,23 ^a \pm 1,14	6,36 \pm 0,06	-0,93 ^a \pm 0,11	6,59 \pm 0,17	0,03 ^a \pm 0,16
<i>B. flexus</i>						
HK1	5,96 \pm 0,11	0,01 ^a \pm 0,02	6,36 \pm 0,41	-0,44 ^a \pm 0,51	6,51 \pm 0,64	-0,46 ^a \pm 0,61

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes cepas probióticas, considerando-se uma mesma operação unitária durante o processamento do requeijão cremoso (Teste de Tukey).

De acordo com a Tabela 2, na qual estão agrupados os dados referentes às reduções do número de esporos das diferentes espécies de *Bacillus* probióticos determinadas em cada operação unitária do processamento de requeijão cremoso, pode-se observar que, durante a etapa de pasteurização, *B. coagulans* MTCC 5856 apresentou a maior redução (1,23 \pm 1,14 log esporos/g) da população de esporos; contudo, não foi observada diferença significativa em relação às outras cepas estudadas. Durante a etapa de coagulação, por sua vez, *B. subtilis* PXN

21 e *B. coagulans* MTCC 5856 apresentaram as maiores reduções de suas populações ($0,91 \pm 1,26$ e $0,93 \pm 0,11$ log esporos/g, respectivamente) ao final do período de descanso *overnight* da massa mantida sob refrigeração, em comparação àquelas determinadas no início dessa fase ($p > 0,05$). Finalmente, durante a etapa de fusão, observou que *B. subtilis* PB6 apresentou a maior redução populacional ($1,24 \pm 0,07$ log esporos/g) em comparação às outras cepas estudadas, embora não tenha apresentado diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

De uma maneira geral, a elevação ou redução de até 0,5 ciclos logarítmicos em populações microbianas não é considerada relevante do ponto de vista microbiológico. Portanto, a variação na população dos esporos probióticos nas etapas do processamento do requeijão cremoso não foi significativa e são inferiores àquelas observadas para microorganismos probióticos tradicionalmente utilizados (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) em produtos lácteos (Granato et al., 2010; Shori, 2015), indicando sua maior tolerância a condições deletérias para as células vegetativas.

3.1.1. Pasteurização

No presente estudo, a etapa de pasteurização foi empregada para redução da carga microbiana deteriorante e patogênica possivelmente presente na matéria-prima empregada (leite) para obtenção do produto final (requeijão cremoso). A pasteurização é um tratamento térmico clássico e amplamente aceito como método eficaz para redução ou destruição de patógenos ou deteriorantes de alimentos. Essa tecnologia causa menor dano às características organolépticas do produto, aumentando a vida útil do produto e sua segurança do ponto de vista microbiológico (Jogen, 2002). Os esporos bacterianos, contudo, são muito resistentes ao calor e podem sobreviver à etapa de pasteurização (Ataíde et al., 2008; Silva & Gibbs, 2014; Wilbey, 2014).

Na Figura 2, estão apresentadas as populações de esporos das cepas probióticas testadas, adicionadas ao leite para obtenção de requeijão cremoso funcional, as quais foram determinadas na etapa de pasteurização.

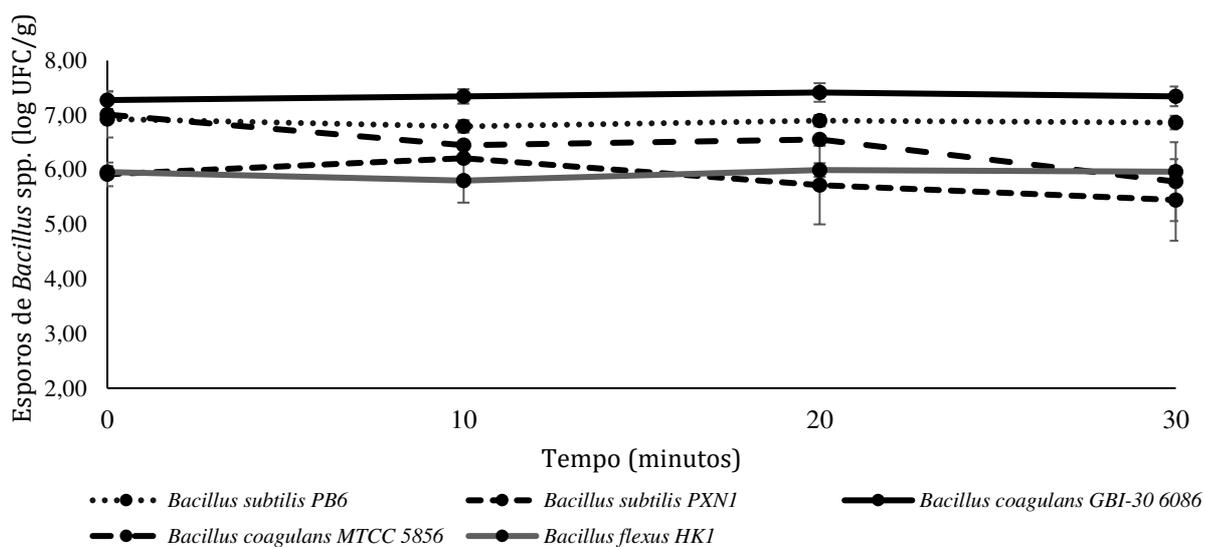


Figura 2. Enumeração (log esporos/g) de *Bacillus* probióticos inoculados na etapa de pasteurização (65°C/30 min) do leite utilizado para a fabricação de requeijão cremoso, determinada em diversos intervalos de tempo (0, 10, 20 e 30 min). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de esporos de uma mesma cepa probiótica determinadas no início (0) e ao final (30 min) da etapa de pasteurização do leite (Teste t). Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de esporos obtidas para diferentes cepas probióticas testadas, em um mesmo intervalo de tempo, durante a etapa de pasteurização do leite (Teste de Tukey).

As populações dos esporos de *Bacillus* probióticos estudados mantiveram-se elevadas (aproximadamente 6 ciclos log) ao final da etapa de pasteurização do leite, sendo similares àquelas determinadas no início do processo ($p > 0,05$), exceto para *B. coagulans* MTCC 5856, que mesmo chegando ao final dessa etapa com concentrações similares às das outras cepas, apresentou redução de sua população em 1,23 ciclos log (Figura 2). Essa manutenção do número de micro-organismos observada durante a etapa de tratamento térmico está relacionada à resistência intrínseca dos esporos ao calor (Janstová & Lukasová, 2001). Os esporos possuem estruturas especializadas que dificultam o rompimento da membrana celular sob condições de estresse, tais quais a capa e cortex (Madigan, Martinko & Parker, 2004).

Usualmente, cepas probióticas de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. são adicionadas ao leite já pasteurizado, juntamente com as culturas *starters* no tanque de processamento de

queijos, devido à sua sensibilidade a altas temperaturas (Gomes da Cruz et al., 2009). Esses probióticos são vulneráveis a diferentes fatores que podem causar injúrias às suas células, incluindo elevados teores de sal, presença de oxigênio, altas temperatura, baixo pH e mesmo a interação com as culturas *starters*. Portanto, é necessário que a exposição desses micro-organismos a tais condições seja minimizada a fim de que sua viabilidade no produto final não seja prejudicada e, conseqüentemente, seus possíveis efeitos benéficos à saúde (Mansouripour, Esfandiari, & Nateghi, 2013). Nesse sentido, diversas adaptações tem sido utilizadas para a superação desses obstáculos tecnológicos, incluindo a adição de micro-organismos probióticos em distintos estágios do processamento do alimento, além do emprego de diferentes técnicas como a fermentação em dois estágios, a microencapsulação, a utilização de temperaturas mais brandas e embalagens especiais, além de um rigoroso controle de temperatura de armazenamento, os quais têm se mostrado eficientes para a manutenção da viabilidade desse grupo de micro-organismos probióticos (Boylston et al., 2004; Gomes da Cruz et al., 2009). No entanto, em determinadas ocasiões tais práticas podem inviabilizar a produção em escala industrial de alimentos probióticos, uma vez que são processos mais onerosos e/ou que requerem maior tempo para sua execução; além disso, as populações de probióticos tradicionais obtidas no produto final são, normalmente, menores, comparativamente, frente àquelas verificadas com o emprego de esporos probióticos, confirmando sua elevada resistência térmica (Hong et al., 2005).

No presente estudo, quando compara-se a sobrevivência de diferentes cepas potencialmente probióticas entre si, determinada em intervalos de tempos regulares da etapa de pasteurização do leite, observa-se que as populações de esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 (7,28 log UFC/g) e *B. subtilis* PB6 (6,23 log UFC/g) apresentaram-se superiores ($p < 0,05$) àquelas observadas para *B. subtilis* PXN 21 (5,92 log UFC/g) e *B. flexus* HK1 (5,97 log UFC/g) no momento em que foram inoculadas ao leite (T_{0min}) (Figura 2). Após 10 min do início da etapa pasteurização do leite (T_{10min}), as populações de esporos das cepas PXN 21 e *B. flexus* HK1 no alimento foram inferiores ($p < 0,05$) àquelas observadas para *B. coagulans* GBI-30 6086 (7,34 log UFC/g), indicando a maior sensibilidade daquelas à operação unitária (Figura 2). A partir de 20 min do início da etapa de tratamento térmico, as populações de esporos de todas as cepas probióticas mantiveram-se com populações estáveis, com contagens de 5,72 a 7,42 log esporos/g, não tendo sido observadas reduções significativas nas contagens determinadas ($p > 0,05$) a partir deste momento (Figura 2).

Portanto, no presente estudo, a cepa mais resistente na etapa de pasteurização foi *B. coagulans* GBI-30 6086, cuja população manteve-se praticamente inalterada, embora de um modo geral, todas as cepas tenham demonstrado boa estabilidade térmica. Um estudo realizado por Samapundo et al. (2014) avaliou o efeito de diferentes parâmetros da pasteurização frente a esporos de *Bacillus cereus* FF119b e *Bacillus pumilus* FF128a, incluindo ausência de tratamento térmico (controle) e aquecimento a 70, 80 e 90°C por 10 minutos; diferentes valores de atividade de água (0,960 a 0,990), pH (5,5 a 7,0) e temperatura de armazenamento (7 e 10°C). De acordo com os autores, a 70 e 80°C houve ativação dos esporos enquanto que a 90°C foi observado aumento da fase lag seguida de germinação dos esporos, embora parte delas tenha sido inativada em meio de cultura artificial. Ao avaliar matrizes alimentícias reais, não foi observada inativação dos esporos em creme e molho bechamel submetidos a 90°C por 10 minutos, demonstrando um efeito protetor da matriz em relação aos esporos devido à gordura presente em ambos os alimentos. Dessa maneira, nós hipotetizamos que, no presente a estudo, a gordura presente no leite e a baixa temperatura empregada (65°C) também podem ter favorecido a manutenção das elevadas populações de esporos probióticos de *Bacillus* spp. determinadas durante a etapa de pasteurização.

3.1.2. Coagulação

A etapa de coagulação ácida (pH 5,4-5,8) a quente (70°C-80°C) das proteínas do leite foi realizada, para obtenção da massa básica do requeijão cremoso, representando condições estressante às células vegetativas probióticas. Bactérias probióticas tradicionalmente utilizadas na fabricação de queijos são inoculadas após a dessora da massa (Cádernas et al., 2014). Além disso, a lavagem da massa coagulada pode levar a perdas significativas desses microorganismos e reduzir sua viabilidade no produto final (Gomes da Cruz et al., 2009). Dessa maneira, se torna patente o emprego de cepas mais resistentes, como os esporos probióticos, a fim de tolerar as condições sub-letais da etapa de coagulação presente no processamento do requeijão cremoso.

Todas as cepas probióticas esporuladas foram inoculadas na concentração de 6 log esporos/g de requeijão cremoso, na etapa de coagulação (Figura 3). Porém já no tempo inicial da coagulação (T_{0min}), *B. subtilis* PXN 21 apresentou contagens menores em relação ao inóculo inicial (5,41 log esporos/g).

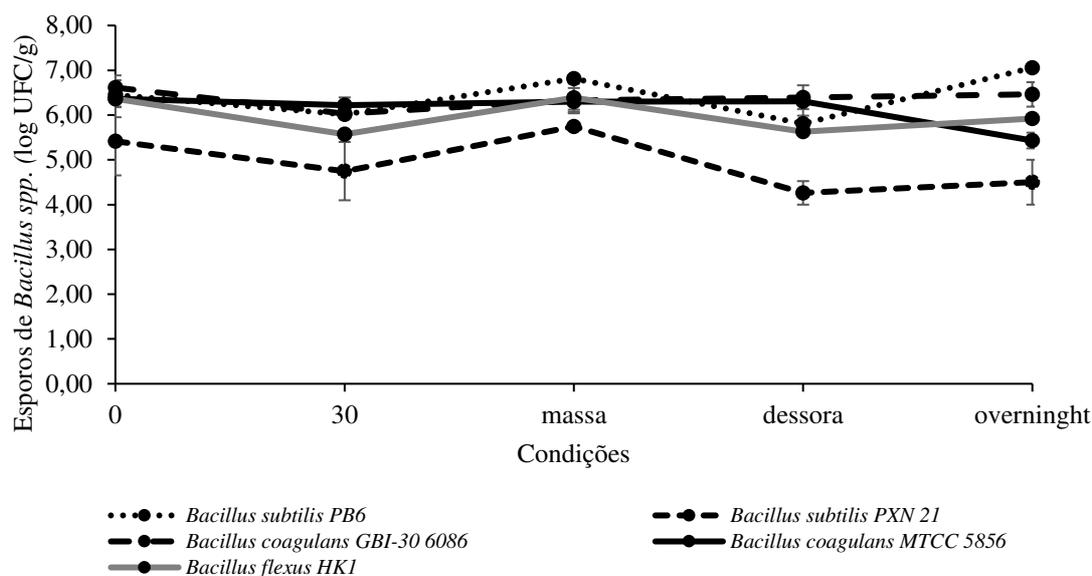


Figura 3. Enumeração (log esporos/g) de *Bacillus* spp. probióticos durante a etapa de coagulação determinada em intervalos de tempo correspondentes a 0 e 30 minutos, na massa coagulada obtida no primeiro dia (massa), na dessoragem e na massa fresca *overnight* do requeijão cremoso. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de esporos obtidas para uma mesma cepa probiótica, no início (0) e ao final (*overnight*) da etapa de coagulação da massa (Teste t). Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de esporos obtidas para diferentes cepas probióticas esporuladas, considerando-se um mesmo intervalo de tempo, durante a etapa de coagulação da massa (Teste de Tukey).

Nos tempos T_0 e $T_{30\text{min}}$ e no primeiro dia após obtenção da massa coagulada (Figura 3), não houve diferença significativa entre as contagens dos esporos probióticos ($p > 0,05$). Após a dessoragem da massa, somente a população de *B. subtilis* PXN 21 apresentou redução (1,16 log esporos/g) (Figura 3), indicando sua maior sensibilidade na etapa ou perda de esporos na lavagem da massa em comparação às demais cepas probióticas ($p < 0,05$).

Ao final da etapa de coagulação (após o descanso *overnight* da massa), observou-se que a cepa *B. subtilis* PB6 apresentou contagens de esporos mais elevadas (7,06 log esporos/g) em comparação às demais cepas ($p < 0,05$), embora não tenha diferido das populações de *B. coagulans* GBI-30 6086 (6,46 log UFC/g) ($p > 0,05$), caracterizando-as como cepas esporuladas mais resistentes a essa etapa. Por outro lado, *B. subtilis* PXN 21 exibiu menores contagens ao final do processo total de coagulação (4,5 log esporos/g), realçando como cepa mais sensível, a acidez e temperaturas acima de 70°C ou possivelmente por sua perda na dessoragem da massa.

3.1.3. Fusão

No processo de fabricação de requeijão cremoso, a etapa de fusão da massa é a mais agressiva aos micro-organismos probióticos tradicionalmente utilizados em alimentos. O tratamento térmico com o emprego de altas temperaturas (90-95°C) inativa células vegetativas probióticas, inviabilizando sua adição nessa fase, sendo utilizados após resfriamento da massa fundida (Drunkler, 2009). Os probióticos esporulados, por sua vez, podem ser utilizados na processamento de alimentos no qual há etapa(s) de tratamento(s) térmico(s) haja vista sua maior tolerância a elevadas temperaturas. Outra vantagem decorrente do emprego de esporos probióticos, é que ao serem adicionados antes dos procedimentos de inativação por calor de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, possibilitam uma maior homogeneização do inóculo na matriz alimentar e evitam a recontaminação do produto após o processamento.

As contagens dos esporos de diferentes cepas de *Bacillus* probióticos estudadas, determinadas nos tempos inicial e final da etapa de fusão, não variaram significativamente entre si ($p > 0,05$), sendo de aproximadamente 6 log UFC/g, com exceção de *B. subtilis* PB6, cuja população diminuiu 1,24 log UFC/g, conforme observada ao final da etapa de fusão.

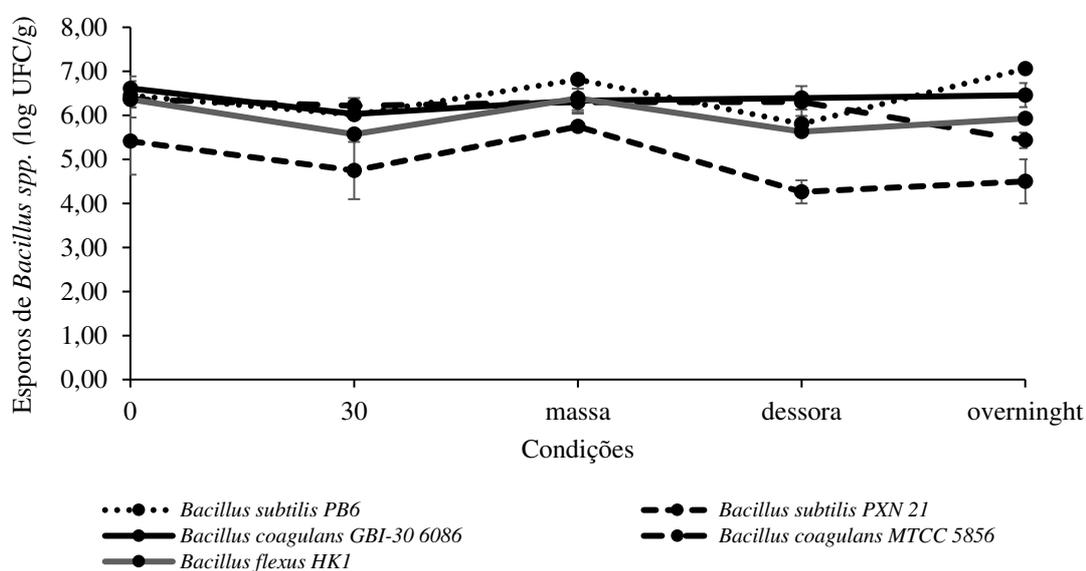


Figura 4. Enumeração (log UFC/g) de *Bacillus* spp. probióticos durante a etapa de fusão da massa do requeijão cremoso determinada em diferentes intervalos de tempo. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de esporos obtidas para uma mesma cepa probiótica, no início (0) e a o final (20 min) da etapa de fusão da massa (Teste t). Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de esporos obtidas para diferentes cepas probióticas, considerando-se em um mesmo intervalo de tempo, durante a etapa de fusão da massa (Teste de Tukey).

No decorrer da etapa de fusão da massa ($T_{2,5\text{min}}$ e $T_{5\text{min}}$) não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as contagens de esporos determinadas para todas as cepas probióticas estudadas. Tal comportamento pode estar relacionado à capacidade dos esporos de todas essas cepas serem intrinsecamente tolerantes às condições de estresse (Cutting, 2011). Após o resfriamento do requeijão ($T_{20\text{min}}$), as contagens de esporos determinadas para *B. subtilis* PXN 21 e PB6 foram inferiores àquelas observadas para *B. coagulans* GBI-30 6086 ($p < 0,05$), indicando maior sensibilidade da primeira frente às condições adversas avaliadas.

De acordo com os nossos resultados, os esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 apresentaram maior resistência (térmica e ácida) em todas as etapas do processamento do requeijão cremoso avaliadas. Por outro lado, os esporos de *B. subtilis* PXN 21 mostram-se os mais sensíveis frente às mesmas condições estudadas.

Diferentes temperaturas para adição de cepas probióticas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. em requeijão cremoso são citadas na literatura, a saber: 70°C (Drunkler, 2009); 45°C (Fernanda & Cardoso, 2011); 50°C (Gaino, 2012); 45°C/4 h (Teixeira, 2012) após a etapa de fusão da massa. Assim, a prática comum de inoculação desses micro-organismos após a etapa de fusão da massa demonstra a sensibilidade daqueles em relação a altas temperaturas, o que impacta sua viabilidade no produto final e durante toda sua vida de prateleira. Dessa maneira, a matriz fica propícia à micro-organismos esporulados contaminantes do ambiente e comuns no leite, que podem germinar e deteriorar o produto durante a vida de prateleira. A presença desses contaminantes está relacionada à qualidade microbiológica da matéria-prima utilizada (leite), na qual alguns esporos conseguem sobreviver às altas temperaturas do processamento do produto (Reyes, 2008). Portanto, a adição dos esporos probióticos no pré ou durante o tratamento térmico aplicado ao requeijão cremoso se torna vantajoso, quando se pensa na vida útil do produto final.

Não foram encontrados na literatura nacional e/ou internacional dados sobre o comportamento de cepas probióticas esporuladas durante as etapas do processamento do requeijão cremoso. Nesse sentido, o presente estudo é inédito quanto à adição de esporos probióticos a esse produto e determinação de sua sobrevivência nessa matriz alimentícia, sendo promissora à indústria de alimentos no desenvolvimento de novos produtos funcionais.

3.2. Avaliação do comportamento de esporos de *Bacillus* probióticos durante a vida de prateleira do requeijão cremoso

O tempo de estocagem estabelecido para o produto em questão foi de 45 dias, tempo inferior àquele utilizado pelas indústrias de alimentos (90 dias), visto que, no presente estudo, o queijo produzido em escala de bancada obviamente não passou por um processamento industrial e foi adicionado pouca concentração e tipos de conservantes como usados na indústria.

A avaliação da sobrevivência de probióticos durante a vida de prateleira do alimento é importante para assegurar que aqueles micro-organismos exerçam seus efeitos benéficos à saúde do consumidor (Martinez et al., 2015).

A Tabela 3 reúne os resultados encontrados para a composição centesimal dos 4 tratamentos de requeijão cremoso (controle e probióticos) avaliados no presente estudo no tempo zero da vida de prateleira.

Para esta etapa foram utilizados os esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 por ter apresentado melhor estabilidade de sua população em todas as etapas do processamento, como apresentado anteriormente e terem status GRAS.

A avaliação da composição química de um alimento possui grande relevância, pois a partir dela pode-se avaliar a qualidade do produto final, já que a mesma interfere nas características nutricionais, sensoriais e conservação do alimento (Drunkler, 2009). Os valores obtidos a partir da determinação da composição centesimal para os diferentes tratamentos de requeijão cremoso produzidos no presente estudo estão condizentes com aqueles preconizados pela legislação vigente para esse tipo produto alimentício (umidade máxima de 65%) (BRASIL, 1997). Portanto, a adição de esporos probióticos não ocasionou quaisquer mudanças na composição química do produto em relação ao requeijão controle no tempo inicial de observação.

Tabela 3. Médias e desvio padrão dos valores da composição centesimal das formulações de requeijão cremoso controle e probiótico no tempo zero da vida de prateleira.

Formulações	Umidade (g/100g)		Lípidios (g/100g)		Proteínas (g/100g)	
	Médias±DP	p value	Médias±DP	p value	Médias±DP	p value
Controle	63,2 ^a ±0,35	0,75	22,2 ^a ±0,56	0,52	13,4 ^a ±0,23	0,87
RP	63,4 ^a ±0,25		22,7 ^a ±0,66		13,2 ^a ±0,68	
RF	62,9 ^a ±0,27		22,5 ^a ±0,71		13,1 ^a ±0,58	
RPF	63,6 ^a ±0,32		22,9 ^a ±0,14		13,6 ^a ±0,74	

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de composição centesimal entre os tratamentos avaliados. RP: requeijão com esporo probiótico adicionado ao leite, antes da etapa de pasteurização; RF: requeijão com esporo probiótico inoculado na etapa de fusão da massa; RPF: requeijão inoculado com esporo probiótico após a etapa de fusão da massa e Controle: requeijão sem adição de esporo probiótico).

O comportamento de *B. coagulans* GBI-30 6086 durante a vida de prateleira do requeijão cremoso (45 dias) está representado na Figura 5.

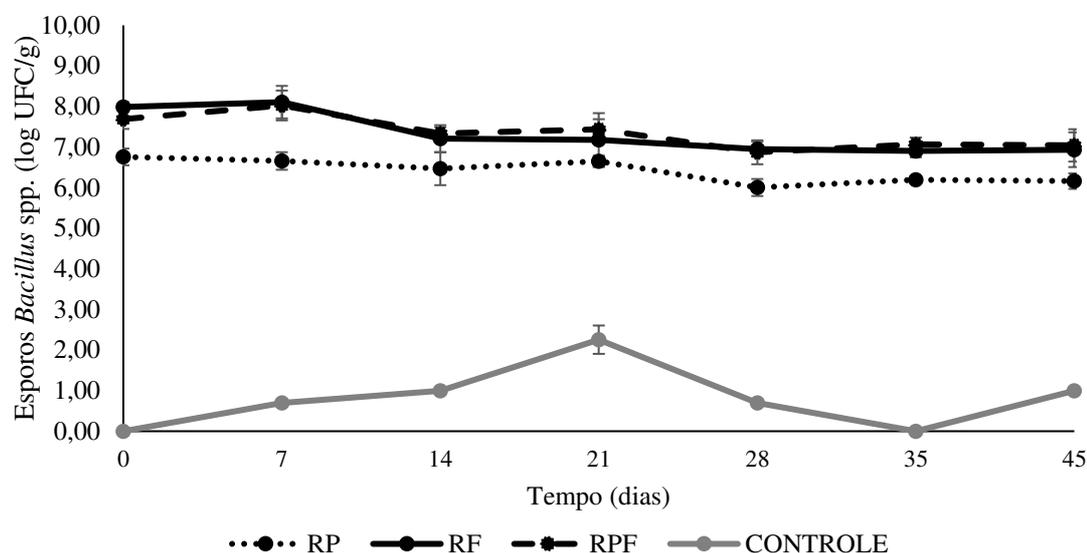


Figura 5. Enumeração (log esporos/g) de *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 determinada em diferentes tratamentos de requeijão cremoso, durante a estocagem do produto sob refrigeração (6°C). Controle: requeijão sem adição de esporo probiótico, RP: requeijão com esporo probiótico adicionado ao leite, antes da etapa de pasteurização; RF: requeijão com esporo probiótico inoculado na etapa de fusão da massa; RPF: requeijão inoculado com esporo probiótico após a etapa de fusão da massa. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para uma mesma formulação, comparando-se as populações de esporos determinadas no início (0) e ao final da vida de prateleira do produto (45 dias) (Teste t). Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de esporos determinadas em diferentes tratamentos, comparando-se um mesmo intervalo de tempo, durante o mesmo período de vida de prateleira do produto (Teste de Tukey).

Dentre as amostras de requeijão cremoso testadas, as populações de esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculadas na etapa de pasteurização do leite (RP) foram inferiores às daquelas (6,41 log esporos/g) ($p < 0,05$) determinadas nas outras formulações avaliadas no início da vida de prateleira do produto. Por outro lado, as amostras de requeijão inoculadas na etapa de fusão da massa (RF) e após a etapa de fusão (RPF) apresentaram contagens de esporos mais elevadas e semelhantes entre si (7,33 log e 7,35 log UFC/g, respectivamente) ($p > 0,05$), mantendo contagens acima de 7 log esporos/g até o final de seu período de armazenamento (Figura 7). O mesmo não foi observado para as populações de esporos da formulação RP as quais foram expostas a consecutivos tratamentos térmicos, e não atingiram tão elevados ($6,31 \pm 0,19$ log esporos/g). Portanto, de acordo com nossas observações, não recomenda-se a inoculação do micro-organismo nessa etapa do processamento do requeijão cremoso; contudo,

uma alternativa para a indústria de alimentos seria a utilização de uma concentração mais elevada de esporos, o que poderia impactar o custo do produto final. É importante destacarmos também que, sob um outro prisma, a adição da cepa esporulada no início do processamento de requeijão cremoso pode estimular a germinação precoce dos esporos, causando deterioração do produto durante a sua vida de prateleira. Portanto, deve-se maior controle desse produto durante a sua vida útil, ou ainda pensar na possibilidade de aumentar a concentração do inóculo inicial.

Na literatura, os probióticos tradicionalmente empregados na indústria de alimentos (bactéria ácido-láticas- BAL) são adicionadas após a etapa de fusão da massa, devido a sua sensibilidade a altas temperaturas (Drunkler, 2009). No presente estudo, utilizando-se probióticos esporulados, sua inoculação na etapa de fusão (90°C/5 minutos), etapa térmica mais agressiva do produto, por outro lado, não impactou negativamente a viabilidade do micro-organismo, cujas populações foram altas e semelhantes às aquelas determinadas no tratamento RPF, na qual há a presença de condições estressantes mais brandas. Nossos achados são de grande valia para a indústria de produtos lácteos, pois a adequação do momento de adição de cepas probióticas para a etapa de fusão da massa permite que melhore a homogeneização do inóculo, evita a recontaminação do produto final após passar pelos tratamentos térmicos e não prejudique sua viabilidade. Portanto, para assegurar a viabilidade dos esporos probióticos até o momento da ingestão, pelo consumidor, do requeijão cremoso a etapa mais adequada para a adição desses micro-organismos corresponde à da fusão da massa. Tal informação é inédita do ponto de vista tecnológico, uma vez que na literatura científica há predomínio de estudos nos quais cepas probióticas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. foram adicionadas após a realização das etapas de tratamento(s) térmico(s) ou protegidas por meio do emprego da técnica de microencapsulação, em especial no processamento de queijos, e exibiram elevada viabilidade ao longo da vida de prateleira do produto (Alves, 2009; Araújo et al., 2009; Barcelos et al., 2013; Buriti et al., 2005; Buriti et al., 2007; Santana e Delfino, 2014, Santini et al., 2012; Vinderola et al., 2012).

Vários estudos relatam boa viabilidade de cepas probióticas BAL adicionadas em diferentes tipos de queijos, após etapas que seriam deléteras a sua sobrevivência, encontrando-se concentrações acima de 6 log UFC/g. Em um estudo utilizando queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus* probiótico e o emprego da coagulação ácida (Carolina, Buriti, & Paulo, 2005) não foram observadas diferenças estatísticas nas contagens da cepa probiótica determinadas durante o período de armazenamento de 21 dias do alimento, as quais mantiveram-se constantes e elevadas (Buriti et al., 2005). Ao adicionar *L. paracasei* em co-

cultura com *S. thermophilus* na produção de queijo fresco cremoso simbiótico, foi verificado populações acima de 7 log UFC/g do microrganismo probiótico durante 21 dias de armazenamento do alimento (Buriti et al, 2007). Populações de células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em queijo tipo Cottage simbiótico, estocado a 5°C durante 20 dias, foram observadas, e não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) nas populações determinadas para o microrganismo ao longo do período de estocagem, as quais apresentaram valores médios 8,20 log UFC/g (Araújo et al. (2009). Em outro estudo com queijo cremoso caprino, observou-se altas populações de *L. rhamnosus* determinadas entre 8,35 e 8,83 log UFC/g durante um período de 21 dias estudado (Barcelos et al., 2013). De maneira semelhante, foi encontrada contagens de 8,62 log UFC/g durante todo o período de estocagem avaliado (30 dias) de *Lactobacillus casei* BGP 93, adicionado em queijo do tipo *petit-suisse*, mantido sob refrigeração, não apresentando diferença significativa durante os diferentes intervalos de tempo estudados ($p>0,05$) (Santana e Delfino, 2014).

Por outro lado, outros estudos também apresentam reduções das populações de BAL probióticas em alguns queijos. Populações de *B. animalis* acima de 6 log UFC/g foram encontradas em amostras de cream cheese durante todo o período de armazenamento do produto, enquanto que *L. acidophilus* exibiu viabilidade reduzida, determinada em $6,67\pm 0,01$ a $8,20\pm 0,05$ log UFC/g no primeiro dia e $3,10\pm 0,17$ a $5,40\pm 0,12$ log UFC/g no 45º dia da vida de prateleira do produto (Alves, 2009). Estudo avaliando queijo fresco ultrafiltrado corrobora com o encontrado anteriormente, onde foram adicionadas as culturas probióticas *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, observando redução das populações de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* inferiores a 1 log UFC/g durante a vida de prateleira do produto mantido sob refrigeração durante 60 dias (Vinderola et al., 2000). O mesmo foi encontrado em amostras de cream cheese com sabor tomate, em que foi observada população inicial de *L. paracasei* LPC-37 em cerca de 8 log UFC/g. No entanto, esse valor mostrou-se reduzido durante a primeira semana de armazenamento, elevou-se na segunda semana, e, finalmente, manteve-se constante na terceira semana avaliada (Santini et al., (2012). Em queijos brancos turcos, foi observada que populações de *L. acidophilus* elevaram-se de 4 log UFC/g para 9-10 log UFC/g nos primeiros 7 dias de maturação. Os autores atribuíram o fato à capacidade de produção de ácido láctico pela cultura *starter*, o qual teria potencializado a multiplicação da cepa probiótica (Kasımoğlu, Göncüoğlu, & Akgün, 2004). Visto todos esses estudos com cepas de células vegetativas probióticas, a variabilidade da sobrevivência dessas nas matrizes estudadas, dependem não somente do momento da sua adição nos alimentos, mas

também o tempo de estocagem desses e tipo de cepa utilizada. Além disso, depende muito da cepa utilizada e quais mecanismos que a mesma apresenta ou não de resposta ao estresse.

Os queijos controles apresentaram crescimento microbiano esporulado em alguns tempos da vida de prateleira. Isso pode estar associado a contaminação da matriz por bactérias deteriorantes esporuladas, as quais são comumente ou possivelmente encontradas neste tipo de produto (Reys, 2008).

No presente trabalho, as populações de esporos probióticos de *B. coagulans* GBI-30 6086 mantiveram-se estáveis em todos os tratamentos de requeijão testados (RP, RF e RPF) durante o período de armazenamento do produto, demonstrando que nessas condições não ocorreu a germinação dos esporos. Portanto, tanto o processamento quanto o armazenamento do requeijão cremoso adicionado de *Bacillus* probiótico na forma de esporos, devem ser cuidadosamente monitorados para que o micro-organismo mantenha-se viável, requisito primordial para que essa possa atingir o TGI em nível adequado, germinar e exercer seu(s) efeito(s) benéfico(s) à saúde.

Os dados obtidos a partir das análises de proteólise dos diferentes tratamentos de requeijão cremoso realizadas no início e ao final da vida de prateleira do produto estão apresentados na Tabela 4.

Perante à análise de química de proteólise dos queijos (Tabela 4), não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores correspondentes aos níveis de proteólise determinados nos diferentes tratamentos do requeijão cremoso, no início e ao final da vida de prateleira do alimento. Esse dado reforça a semelhança entre os tratamentos quanto à composição e à boa estabilidade protéica, não havendo interferência do micro-organismo probiótico nesse parâmetro.

Proteólise é caracterizada como o processo bioquímico em que há quebra de proteínas do produto por meio da ação de enzimas do próprio produto, fermentos ou enzimas bacterianas contaminantes, formando assim outros compostos voláteis tais como aminas, ácidos (isobutírico, isovalérico e valérico), tióis, ésteres e outros (Bezerra et al., 2016). Todas os tratamentos de requeijão cremoso testados apresentaram um aumento dos níveis de proteólise ao longo da vida de prateleira do produto. Comportamento semelhante foi encontrado em estudo realizado com queijo frescal, no qual o índice de proteólise aumentou, significativamente, ao longo da vida de prateleira (Isepon & Oliveira, 1989).

Tabela 4. Resultados das análises de proteólise das diferentes formulações de requeijões cremosos adicionadas, em diferentes etapas de seu processamento, de esporos probióticos de *B. coagulans* GBI-30 6086 e realizadas no início e ao final de sua vida de prateleira (0 e 45 dias, t_0 e t_{45} , respectivamente).

Formulações	Proteólise*	
	Média±DP	Média±DP
	(t_0)	(t_{45})
Controle	0,345 ^{aA} ±0,03	0,478 ^{aB} ±0,05
RP	0,378 ^{aA} ±0,06	0,633 ^{bB} ±0,08
RF	0,389 ^{aA} ±0,05	0,432 ^{bB} ±0,06
RPF	0,399 ^{aA} ±0,02	0,701 ^{aB} ±0,08

Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença significativa ($p < 0,05$), considerando-se um mesmo tratamento e comparando-se o início (T_0) e o final da vida de prateleira do produto (T_{45}). Letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos, considerando-se um mesmo tempo da estocagem do produto. RP: requeijão com esporo probiótico adicionado ao leite, antes da etapa de pasteurização; RF: requeijão com esporo probiótico inoculado na etapa de fusão da massa; RPF: requeijão inoculado com esporo probiótico após a etapa de fusão da massa e Controle: requeijão sem adição de esporo probiótico). *Proteólise é expressada em absorbância ($\lambda = 340\text{nm}$).

Neste estudo, todas as amostras apresentaram aumento da proteólise durante a vida de prateleira do requeijão cremoso. Somente as formulações de requeijão cremoso controle e RPF não exibiram aumento significativo ($p > 0,05$) dos níveis de proteólise determinados ao longo dos 45 dias de vida de prateleira do produto armazenado sob refrigeração, indicando a estabilidade do sistema protéico dessas formulações. Por outro lado, o aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de proteólise observados nas formulações RP e RF, nessas mesmas condições, pode indicar possível germinação dos esporos probióticos, os quais foram submetidos a um maior número de etapas de estresse (pasteurização, coagulação e fusão) em relação aos esporos inoculados no alimento à baixa temperatura (50°C), tal qual na formulação RPF.

A germinação desses esporos poderia levar à produção de enzimas, as quais podem estar associadas com o fenômeno da proteólise do produto. Outra hipótese para essa maior instabilidade protéica dos tratamentos RP e RF, seria a presença de bactérias esporuladas contaminantes na matriz, já que os controles apresentaram aumento de população desses possíveis micro-organismos que poderiam causar deterioração do produto. Enzimas intrínsecas

do leite, como a plasmina, foi exposta a condições térmicas mais agressivas para esses tratamentos, podendo ter causado alguma modificação na estabilidade do alimento e está associada à proteólise ocorrida durante a vida de prateleira de queijos. O índice de extensão da proteólise está fundamentalmente relacionado às proteinases naturais do leite e do agente coagulante, as quais degradam a proteína em peptídeos de alto peso molecular (Fox, 1989). Embora uma das possíveis causas da proteólise também possa ser a contaminação das matérias-primas, por exemplo, por micro-organismos psicotróficos (Wolfschoon-Pombo & Lima, 1989), no presente estudo tal hipótese foi desconsiderada, uma vez que as matérias-primas utilizadas para a produção do requeijão cremoso apresentarem adequada qualidade microbiológica e também não foi observada a formação de gases no produto e os controles não tiveram a proteólise observada em RP e RF.

Vários estudos na literatura relatam a interferência da proteólise na estocagem de queijos. Em um estudo com queijo manteiga, avaliando os níveis de nitrogênio solúvel em pH 4,6 foi encontrado um indicativo da proteólise primária, pois não houve adição do agente coagulante, sendo possivelmente causada pela protease alcalina do leite (plasmina) ou por ação de proteases microbianas provenientes de micro-organismos psicotróficos e micro-organismos termotróficos, os quais sobreviveram à pasteurização do leite e ao processo de cocção do queijo de manteiga (Almeida, 2008). Em queijos brancos turcos, a proteólise foi ligeiramente maior nos queijos probióticos do que nos queijos controles. Os autores associaram este fato à variação de atividades proteolíticas do fermento e das bactérias probióticas utilizadas (Kasimoğlu et al., 2004).

Na tabela 5 estão expressos os resultados das análises de ácidos graxos dos requeijões probióticos realizadas no dia 1, considerando que não foram observadas alterações durante o período de armazenamento. Embora tenha sido relatado que as bactérias probióticas são capazes de alterar o perfil lipolítico dos queijos durante o armazenamento (Felicio et al., 2016; Rodrigues, Santos, Gomes, Goodfellow, & Freitas, 2012), não foi observada essa mudança no requeijão cremoso, possivelmente, por serem queijos de alta umidade com uma vida de prateleira limitada, não tendo tempo suficiente para a ação das enzimas lipolíticas produzidas por cepas probióticas. Outra hipótese, é que visto que foram utilizados esporos de *Bacillus*, esses não germinaram no alimento, não causando alterações químicas no produto.

No presente trabalho, os valores de ácidos graxos insaturados determinados nas diferentes formulações de requeijão produzidos foram baixos em relação aos AG saturados,

com média de 1,58g/100g de gordura dos queijos. Está bem documentado que alguns micro-organismos probióticos podem alterar o perfil de ácidos graxos do leite, formando ácidos graxos biologicamente ativos (Vieira et al., 2015; Yilmaz-Ersan, 2013). A gordura do leite representa uma boa fonte de nutrientes, incluindo vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais. Dessa maneira, alguns estudos tem concentrado em avaliar os teores de ácidos graxos bioativos como ácido butírico, ácido oléico e ácido linoléico conjugado (CLA), os quais tem apresentando papel importante na prevenção de certas doenças (Yilmaz-Ersan, 2013).

A composição dos ácidos graxos de todas as formulações apresentou valores semelhantes entre elas. O leite de vaca, utilizado na fabricação do requeijão cremoso é, principalmente, rico em ácidos graxos saturados, dentre eles os de cadeia longa (Alves, 2009). Em estudos utilizando queijos como matriz probiótica, foi encontrado maior quantidade de ácidos graxos saturados em *cream cheese* simbiótico (mínimo e máximo de gordura de, respectivamente, $226,74 \pm 0,39$ mg/g e $411,17 \pm 20,79$ mg/g). Porém, foi observada redução na concentração de ácidos graxos insaturados durante o período de estocagem do produto (Alves, 2009). Por outro lado, não foi verificada diferença significativa entre os teores de ácidos graxos insaturados determinados durante o armazenamento de queijos produzidos com leite de búfala adicionados de culturas probióticas (Van Nieuwennhove et al, 2007).

Alguns trabalhos afirmam que a adição de culturas probióticas é capaz de elevar a quantidade de ácidos linoléicos conjugados (CLA) em produtos lácteos (Akalin et al, 2007; Van Nieuwhennhove et al, 2007; Ekinci et al, 2008; Oliveira et al, 2009). Tal comportamento foi observado em relação às formulações RP e RPF, as quais apresentaram teores mais elevados ($p < 0,05$) de CLA em relação àqueles determinadas no requeijão cremoso controle (sem adição de esporo probiótico). No entanto, o mesmo não foi observado em *cream cheese* adicionado de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e armazenado a 8°C por 45 dias, em que os níveis de CLA não foram alterados com a presença das cepas probióticas (Alves, 2009).

A presença de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, como o ácidos graxos alfa-linolênico (ômega 3) e ôleicos (omêga 9) em alimentos estão relacionados à ações antiinflamatória, antialérgicas, neuroprotetora e cardioprotetora (Balthazar et al., 2016). Além disso, favorece o crescimento, adesão e tolerância das bactérias probióticas no intestino, potencializando a ação benéfica das mesmas (Kastel et al., 2007). No presente trabalho, o requeijão cremoso apresentou perfis de ácido ôleico altos quando comparados aos outros ácidos graxos (Tabela 5).

Tabela 5. Perfis de ácidos graxos determinados em diferentes tratamentos de requeijão cremoso adicionados de esporos de *Bacillus* probióticos em etapas distintas do processamento do alimento no tempo 1 de vida de prateleira.

Ácidos Graxos	Formulação			
	Controle	RP	RF	RFP
Butanoico (C4:0)	1,10 ^a ±0,04	1,20 ^a ±0,05	1,40 ^a ±0,03	1,30 ^a ±0,04
Hexanoico (C6:0)	1,50 ^a ±0,03	1,30 ^a ±0,06	1,60 ^a ±0,04	1,50 ^a ±0,05
Octanoico (C8:0)	1,20 ^a ±0,03	1,30 ^a ±0,07	1,40 ^a ±0,03	1,00 ^a ±0,01
Docanico (C10:0)	2,20 ^a ±0,03	2,10 ^a ±0,01	2,40 ^a ±0,02	2,10 ^a ±0,07
Dodecanoico (C12:0)	2,50 ^a ±0,05	2,00 ^b ±0,05	2,00 ^b ±0,09	2,00 ^b ±0,06
Tetradecanoico (C14:0)	10,1 ^a ±0,68	8,50 ^c ±0,06	9,50 ^b ±0,08	9,70 ^b ±0,06
Pentadecanoico (C15:0)	1,60 ^a ±0,02	1,10 ^b ±0,05	1,70 ^a ±0,08	1,80 ^a ±0,05
Palmitico (C16:0)	33,0 ^a ±0,78	34,1 ^a ±0,97	31,5 ^b ±0,77	31,2 ^b ±0,85
Palmitoleico (C16:1)	1,70 ^a ±0,05	1,74 ^a ±0,05	1,80 ^a ±0,07	1,90 ^a ±0,59
Estearico (C18:0)	10,4 ^b ±0,65	10,7 ^b ±0,77	11,2 ^a ±0,66	9,50 ^c ±0,92
Trans-vacênico (C18:1t)	2,80 ^a ±0,08	2,50 ^a ±0,66	2,70 ^a ±0,06	2,30 ^b ±0,06
Oleico (C18:1c)	29,0 ^b ±0,56	31,2 ^a ±0,76	30,4 ^b ±0,88	31,5 ^a ±0,95
Linolenico (C18:2)	0,70 ^a ±0,04	0,60 ^a ±0,06	0,80 ^a ±0,06	0,90 ^a ±0,04
α-ácido linoléico, ALA (C18:3)	0,40 ^b ±0,05	1,20 ^a ±0,07	0,60 ^b ±0,02	1,10 ^a ±0,05
Ácido linoléico conjugado (CLA)	1,80 ^b ±0,04	2,20 ^a ±0,03	1,50 ^b ±0,05	2,60 ^a ±0,03
Ácidos graxos de cadeia curta (SCFA)	1,10 ^a ±0,06	1,40 ^a ±0,03	0,80 ^b ±0,02	1,30 ^a ±0,05
Ácidos graxos de cadeia média (MFCA)	7,40 ^a ±0,07	5,40 ^b ±0,06	7,40 ^a ±0,03	6,60 ^b ±0,05
Ácidos graxos de cadeia longa (LCFA)	91,5 ^a ±0,97	93,8 ^a ±0,08	91,7 ^a ±0,88	92,5 ^a ±0,45
Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)	33,5 ^b ±0,58	35,4 ^a ±0,06	34,90 ^b ±0,96	35,7 ^a ±0,57
Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA)	1,10 ^b ±0,06	1,80 ^a ±0,03	1,40 ^b ±0,54	2,00 ^a ±0,03
Total	100	100,64	99,9	100,4

Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os perfis de ácidos graxos determinados nas formulações de requeijão cremoso avaliadas, no final a vida de prateleira do produto (T_{45}). RP: requeijão com esporo probiótico adicionado ao leite, antes da etapa de pasteurização; RF: requeijão com esporo probiótico inoculado na etapa de fusão da massa; RFP: requeijão inoculado com esporo probiótico após a etapa de fusão da massa e Controle: requeijão sem adição de esporo probiótico).

A produção de ácidos graxos de cadeia curta, promove ambiente intestinal mais ácido, desfavorecendo crescimento de bactérias patogênicas, além disso bactérias probióticas podem fermentar oligossacarídeos e produzir ácidos graxos de cadeia curta, auxiliando na redução dos níveis de colesterol (Manzoni et al., 2008). O ácido láurico está associado a atividade antibacteriana e atividades antivirais (Shobharani e Agrawal 2009). As baixas concentrações de ácido butírico contribuem para a inibição *in vitro* das linhas celulares de câncer humano, embora os ácidos caproico, caprílico e capilar possam reduzir o peso corporal ea gordura corporal (Rasmussen e outros 2010, Foglietta e outros 2014). O ácido esteárico apresentou altas quantidades no requeijão cremoso controle e probiótico, em relação aos outros ácidos graxos estudados. Este tipo de lipídeo são os mais encontrados em alimentos como carne vermelha e lácteos (Balakrishnan & Agrawal, 2014). O mesmo, por mais que seja classificado dentro dos ácidos graxos saturados, não foi associado ao aumento dos níveis de colesterol sérico, e portanto não possui caráter aterogênico (Ebringer et al., 2008).

4. Conclusão

O requeijão cremoso, alimento amplamente consumido em território brasileiro, possui importante papel econômico dentro da indústria de alimentos, sendo um excelente candidato para a veiculação de micro-organismos probióticos, os quais são capazes de promover efeito(s) benéfico(s) a saúde ao consumidor.

A adição dos esporos probióticos na etapa de fusão do requeijão cremoso (90°/5min) mostrou-se a mais apropriada, facilitando o processo tecnológico e evitando a recontaminação do produto final.

Neste estudo foi demonstrado que esporos probióticos de *Bacillus* spp. constituem uma opção promissora e inovadora para a produção de alimentos processados sob condições adversas/drásticas. Dentre as cepas avaliadas, os esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 apresentaram melhor resistência térmica durante todas as etapas do processamento do requeijão cremoso, exibindo elevadas populações ao longo da vida de prateleira do produto (45 dias a 6°C). A mesma cepa, não afetou os níveis de proteólise, nem alterou o perfil de ácidos graxos e a composição centesimal do produto final ao final da estocagem

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos à M. B. Soares (Processo nº 2013/21544-9). Os pesquisadores são gratos à empresa Ganeden, a qual forneceu a cepa probiótica utilizadas no presente estudo.

5. Referências Bibliográficas

Akalin, A.S.; Tokusoglu, O.; Gonç, S.; Aycan, S. 2007. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*, 17, p. 1089-1095.

Almeida, A.P.N., (2008). Departamento de tecnologia de alimentos efeito do ph na qualidade do queijo de manteiga Engenharia de Alimentos Dissertação apresentada à Faculdade da Universidade Estadual de Campinas Tecnologia de Alimentos.

Alves, L.D.L. (2009). Desenvolvimento de cream cheese simbiótico : caracterização e perfil lipídico com ênfase em ácido linoleico conjugado. Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Association of Official Analytical Chemists - AOAC, Inc. (2002) Official Methods of Analysis. 17th edition. Gaithersburg: AOAC International 1878

Balakrishnan, G., Agrawal, R. (2014). Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. *J Food Sci Technol* 51:4138–4142. doi: 10.1007/s13197-012-0891-9

Balthazar, C.F., Pimentel, T.C, Ferrão L.L., Almada, C.N., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A. M., Nascimento, J.S., Silva, M.C., Freitas, M.Q., Sant'Ana, A. S., Granato, D., Cruz A. G. (2017) Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 16:247–262. doi: 10.1111/1541-4337.12250

Barcelos, S.C., Oliveira, I.C.S., Egito, A. S., Benevides, S.D., Santos, K.M.O. 2013. Desenvolvimento de queijo cremoso caprino potencialmente probiótico. II Encontro de Iniciação Científica da Embrapa de Caprinos e Ovinos.

Boyston, T.D; Vinderola, C.G; Ghoddusi, H.B; Reinheimer, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.*, v.14, p.375-387, 2004.

Brasil, 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento PORTARIA Nº 359, DE 04/09/1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de requeijão ou requesón.

Brasil, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n_ 68 de 12/12/2006. Métodos Análíticos Oficiais Físico-Químicos para controle de leite e produtos lácteos. Available in: <http://www.agricultura.gov.br>.

Buriti, F. C. A., Cardarelli, H. R., Filisetti, T. M. C. C., & Saad, S. M. I. (2007). Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, 104(4), 1605e1610.

Buriti, F. C. A., Cardarelli, H. R., & Saad, S. M. I. (2007). Biopreservation by *Lacobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. *Journal of Food Protection*, 70(1), 228e235.

Buriti, F.C.A., Okazaki, T. Y., Alegro, J.H. A., & Saad, S. M. I. (2007). Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh-cheeses in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoamericanos de Nutricio´n*, 57(2), 179e185.

Buriti, F. C. A., Rocha, J. S., Assis, E. G., & Saad, S. M. I. (2005). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT e Food Science and Technology*, 38(2), 173e180.

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(12), 1279e1288.

Cárdenas, N., Calzada, J., Peirotn, A., Jiménez, E., Escudero, R., Rodríguez, J.M., Medina, M., Fernández, L., 2014. Development of a potential probiotic fresh cheese using two *Lactobacillus salivarius* strains isolated from human milk. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/801918

Cutting, S.M., 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28, 214–20. doi:10.1016/j.fm.2010.03.007

Drunkler, D. A. (2009). Produção de requeijão cremoso simbiótico. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Drunkler, D. A.; Sene, L.; Oliviera, L. F. Probióticos, prebióticos e simbióticos: alimentos funcionais em ascensão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora (MG)*, v. 60, p. 29-37, 2005.

Espírito Santo, A. P., Cartolano, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S. M., Gioielli, L. A., Perego, P., Converti, A., & Oliveira, M. N. (2012). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 135–144.

Ekinci, F.Y; Okur, O.D.; Ertekin, B.; Guzel-Seydim, Z. 2008. Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acids profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, p. 216-224.

Ebringer, L., Ferenčík, M., Krajčovič, J. (2008) Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. Review. *Folia Microbiol(Praha)* 53:378–394

Felicio, T.L., Esmerino, E. a., Vidal, V. a S., Cappato, L.P., Garcia, R.K. a, Cavalcanti, R.N., Freitas, M.Q., Conte Junior, C. a., Padilha, M.C., Silva, M.C., Raices, R.S.L., Arellano, D.B., Bollini, H.M. a, Pollonio, M. a R., Cruz, a. G., 2016. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chem.* 196, 628–637. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.102

Fernanda, A., Cardoso, C., 2011. Qualidade e viabilidade de requeijão cremoso caseiro probiótico. XIX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco.

Foglietta, F., Serpe, L., Canaparo, R., Vivenza, N., Riccio, G., Imbalzano, E., Gasco, P., Zara, G.P. (2014). Modulation of butyrate anticancer activity by solid lipid nanoparticle delivery: an in vitro investigation on human breast cancer and leukemia cell lines. *J Pharm Pharm Sci* 17:231–47.

Fox, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.72, n.6, p.1379-1400, 1989.

Furtado, M.M., Lourenço Neto, J.P.M. 1979. Estudo rápido sobre a composição média dos queijos Prato e Minas no mercado. *Boletim do Leite*. Rio de Janeiro, n.605, p.4-38.

Gomes da Cruz, A., Alonso Buriti, F.C., Batista de Souza, C.H., Fonseca Faria, J.A., Isay Saad, S.M., 2009. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 344–354. doi:10.1016/j.tifs.2009.05.001

Gomes, A. A., Braga, S. P., Cruz, A. G., Cadena, R. S., Lollo, P. C., Carvalho, C. C., et al. (2011). Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance towards commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94, 4777–4786.

Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J.D.A.F., Shah, N.P., 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 455–470. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x

Hayes, M., Coakley, M. E., O'Sullivan, L., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Murphy, J. J., Ross, R. P. 2006. Cheese as a delivery vehicle for probiotic and biogenic substances. *Australian Journal Dairy Technology*, v.6, n.2, p.132–141.

Hong, H. a, Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 813–35. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.001

Isepon, J.S., Oliveira, a. J., 1989. Influência das culturas lácticas no índice de proteólise do queijo Minas frescal. *Sci. Agric.* 50, 454–454. doi:10.1590/S0103-90161993000300018

Janstová, B. & Lukasová, J. (2001). Heat resistance of *Bacillus* spp . spores isolated from cow's milk and farm environment *Acta Veterinária Brno*, 70, 179-184.

Jogen, W. (2002). *Fruit and Vegetable Processing - Improving Quality*, Washington: CRC Press, 397.

Kasımoğlu, a., Göncüoğlu, M., Akgün, S., 2004. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy J.* 14, 1067–1073. doi:10.1016/j.idairyj.2004.04.006

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2004). *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 608.

Mansouripour, S., Esfandiari, Z., Nateghi, L., 2013. The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotic by microencapsulation : A review. *Ann. Biol. Res.* 4, 83–87.

Martinez, R.C.R., Bedani, R., Saad, S.M.I., 2015. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *Br. J. Nutr.* 1–23. doi:10.1017/S0007114515003864

Manzoni, S.M, Cardoso, J.D, Cavallini, U., Rossi, E.A. (2008). Efeitos do consumo de probióticos nos lípides sanguíneos. *Alim. Nutr. Araraquara*, 19, 3, 351–360.

Mercosul Res. N°82/1996. Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade do Requeijão.

Munck, A. V.; Campos, W. A. 1984. Requeijão: um produto brasileiro. *Informe Agropecuário*, São Paulo, v. 10, n. 115, p. 35-38.

Nithya, V., Halami, P.M., 2012. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Ann. Microbiol.* 63, 129–137. doi:10.1007/s13213-012-0453-4

Queiroz, L., Eduardo, Z.I., Lucy, J.I.L., Fries, M., I, N.N.T., 2013. Microencapsulação de probióticos : avanços e perspectivas 1–8. doi:10.1590/S0103-84782013005000084

Rasmussen, N., Andersen, J.H., Jespersen, H., Mouritsen, O.G., Ditzel, H.J. (2010). Effect of free fatty acids and lysolipids on cellular uptake of doxorubicin in human breast cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 21:674–7.

Reyes, A.F., 2008. *Esporulados E Indicadores Em Requeijão Cremoso*. Dissertação (Mestrado) em Ciência de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas.

Rodrigues, D., Santos, T. A. P. R., Gomes, A. M., Goodfellow, B. J., & Freitas, A. C. (2012). Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chemistry*, 131, 1414–1421.

Samapundo, S; Heyndrickx, M.; Xhaferi, R.; de Baensta, I.; Devlieghere, F. (2014). The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 10–18.

Santana, L., Delfino, N.D.C., 2014. Petit-Suisse Cheese Production with Addition of Probiotic *Lactobacillus casei*. *Food and Nutrition Science*, 5, 1756–1764.

Santini, M.S.S., Koga, E.C., Aragon, D.C., Santana, E.H.W., Costa, M.R., Costa, G.N., Aragon-Alegro, L.C., 2012. Dried Tomato-Flavored Probiotic Cream Cheese with *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Food Science*, v. 77, n. 11.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) (2008). Queijos Nacionais. Estudo de Mercado SEBRAE / ESPM.

Sheehan, V.M., Ross, P., Fitzgerald, G.F., 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 279–284. doi:10.1016/j.ifset.2007.01.007

Shobharani, P., Agrawal, R. (2009). Supplementation of adjuvants for increasing the nutritive value and cell viability of probiotic fermented milk beverage. *Int J Food Sci Nutr* 60:70–83

Shori, A.B., 2015. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 423–431. doi:10.1016/j.bcab.2015.09.010

Silva, L. I., Rodrigues, D., Freitas, A. C., Gomes, A. M., Rocha-Santos, T., Pereira, M., et al. (2011). Optical fibre based methodology for screening the effect of probiotic bacteria on conjugated linoleic acid (CLA) in curdled milk. *Food Chemistry*, 127, 222–227.

Silva, F.V.M., Gibbs, P. (2004). Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 353–360.

Sorokulova, I., 2008. Preclinical testing in the development of probiotics: a regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example. *Clin. Infect. Dis.* 46 Suppl 2, S92–5; discussion S144–51. doi:10.1086/523334

Teixeira, G.L.S.B. 2012. Qualidade e viabilidade de requeijão cremoso adicionado de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Van Dender, A.G.F. 2008. Prebióticos e Probióticos em Queijos. I Simpósio Internacional: Prebióticos e Probióticos em Produtos Lactéos. Campinas, São Paulo, Brasil.

Van Nieuwenhove, C.P. et al. 2007. Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Research International*, v. 40, n. 5, p.559-564.

Vieira, C.P., Álvares, T.S, Gomes, L.S, Torres, a. G., Paschoalin, V.M.F., Conte, C. a. (2015). Kefir grains change fatty acid profile of milk during fermentation and storage. PLoS One 10:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0139910

Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. 2000. Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1905-1911.

Sunny-Roberts, E.O.; Knorr, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *International Dairy Journal*, v.19, p.209-214, 2009. Disponível em: . Acesso em: 2 mar. 2013. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.10.008.

Zhang, Y.-R., Xiong, H.-R., Guo, X.-H., 2014. Enhanced viability of *Lactobacillus reuteri* for probiotics production in mixed solid-state fermentation in the presence of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 59, 31–6. doi:10.1007/s12223-013-0264-4

Wilbey, R.A. (2014). Heat treatment of foods: principles of pasteurization. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2 nd edition. San Diego: Academic Press. 169–174

Wolfschoon-Pombo, A. L.; Lima, A. (1989). Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 44, 261-266, 50-52.

Yilmaz-ersan, L. (2013). Fatty acid composition of cream fermented by probiotic bacteria. 63:132–139.

Capítulo 4

**Avaliação da expressão de proteínas antiestresse (HSP) e
de parâmetros de saúde por ratos alimentados com
requeijão cremoso com esporos de *Bacillus coagulans*
probiótico**

Avaliação da expressão de proteínas antiestresse (HSP) e de parâmetros de saúde por ratos alimentados com requeijão cremoso com esporos de *Bacillus coagulans* probiótico

Mariana B. Soares^a, Pablo C.B. Lollo^b; Priscila N. Morato^b, Jaime Amaya-Farfan, Hugo L. A. Silva^b, Adriano G. Cruz^{cd}; Rafael C.R. Martinez^a, Anderson de Souza Sant'Ana^{a*}

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

^bDepartamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

^cDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

^dInstituto Federal Fluminense, Campos dos Goitacazes, RJ, Brasil.

.

*Autor correspondente: Prof. A.S. Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brasil. Contato: +55(19) 3521-2174.

Artigo formatado segundo a revista "Applied Microbiology and Biotechnology"

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da suplementação da dieta com esporos probióticos de *Bacillus coagulans* nos sistemas antiestresse de ratos Wistar. A cepa liofilizada de *B.coagulans* GBI-30 6086 foi adicionada em requeijão cremoso, a fim de atingir 10^6 - 10^7 UFC de esporos do micro-organismo por grama do produto. Trinta e nove animais foram alocados aleatoriamente em cinco grupos (n=7-8 por grupo), correspondendo a três dietas experimentais (requeijões diferindo em relação à fase do processamento na qual o probiótico foi adicionado ao produto: pré-pasteurização do leite (RPP), durante a fusão do queijo (RPF) e após a etapa de fusão do queijo (RAPF) e dois controles [RC – requeijão sem adição de probiótico e C (animais suplementados com 5 mL de água)]. Ao final de 14 dias de tratamento, a análise dos marcadores moleculares de proteínas do sistema de estresse e antioxidante, HSP 25, 60, 70 e 90, SOD e catalase foram realizadas nos músculos sóleos por meio da técnica de Western Blot. Os resultados mostraram que os níveis dos biomarcadores HSP25, HSP90 e catalase dos grupos de requeijão com esporos não diferiram do grupo controle (C), indicando que a homeostase se manteve inalterada. Porém, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão de HSP 70 nos animais que receberam dieta experimental com menores doses de esporos (RPP) em relação aos animais dos grupos controle (C e RC), o que pode significar que a quantidade de esporos viáveis afetou de maneira particular, levando a uma menor expressão de proteínas do estresse no organismo dos animais que o consumiram. Concluiu-se que, na ausência de alterações negativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estresse no rato, inclusive utilizando o sensível critério das proteínas endógenas do estresse, a adição de esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 probiótico ao requeijão cremoso mostrou-se adequada e segura, não afetando o sistema de estresse e a homeostase do organismo de ratos saudáveis alimentados de requeijão cremoso adicionado de probiótico esporulado.

Palavras-chave: *Bacillus coagulans*, esporos probióticos, requeijão cremoso, Western blot, biomarcadores, sistema antiestresse.

1. Introdução

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem efeito benéfico significativo à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; Hill et al., 2014). Esses micro-organismos são capazes de estimular o sistema imunológico por meio de seu contato com diversos tipos de células presentes na mucosa intestinal, incluindo as células B, as células T, os monócitos, os macrófagos, as células dendríticas e as células NK (Coppola & Turnes, 2004; Lollo et al., 2013; Trejo & Sanz, 2013). Dessa maneira, os probióticos podem auxiliar na manutenção da homeostase do organismo, protegendo-o frente a diferentes tipos de estresse.

Uma das funções do sistema imunológico da mucosa intestinal é montar uma resposta imune-inflamatória adequada para suprimir a ação de patógenos ou para induzir tolerância a substâncias e micro-organismos que sejam vantajosos ao hospedeiro, tais quais os nutrientes dos alimentos e bactérias probióticas (de Almada, Nunes de Almada, Martinez, & Sant'Ana, 2015).

Dentre as bactérias probióticas, aquelas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão entre os micro-organismos probióticos mais estudados e utilizados em produtos alimentícios processados ao redor do mundo, com destaque para os produtos lácteos (Dantas et al., 2016; Esmerino et al. 2015; Felicio et al., 2016; Pereira et al., 2016). O requeijão cremoso é um queijo tipicamente brasileiro e de amplo consumo, fabricado sob diferentes formulações e tecnologias (Van Dender et al., 2012). A sua massa, entretanto, é invariavelmente submetida a um processo de fusão na qual são utilizadas temperaturas entre 85 e 95°C, o que inviabiliza a adição de células vegetativas probióticas, susceptíveis a efeitos deletérios durante esta etapa de processamento.

Uma alternativa para possibilitar a veiculação desses micro-organismos por meio de produtos como o requeijão cremoso é a adição do probiótico na forma de esporos, uma vez que estes são capazes de sobreviver às condições drásticas de processamento e, ainda, tolerar e resistir ao ataque das secreções do TGI (Cutting, 2011). Adicionalmente, os esporos podem ser vantajosos devido à sua longa vida útil e, conseqüentemente, à elevada viabilidade em produtos alimentícios durante todo o período de armazenamento, seja em temperatura ambiente ou sob refrigeração (Tripathi & Giri, 2014), ou ainda a possibilidade de trabalhar com doses efetiva menores de esporos como suplementos probióticos, devido a sua melhor capacidade de sobrevivência (Blanch, Méndez, Castel, & Reina, 2014).

Estudos sobre os benefícios à saúde associados aos produtos alimentícios adicionados de cepas esporuladas probióticas, como suplemento alimentar animal, têm demonstrado que estes micro-organismos apresentam atividade antimicrobiana e são capazes de estimular o sistema imune (Cartman et al., 2007; Huang et al., 2013) ou, de forma geral, interagir com outros comensais (Sassone-Corsi et al., 2016). Nos seres humanos, cepas de *Bacillus* têm sido utilizadas como suplementos alimentares para a profilaxia de distúrbios gastrointestinais e como agentes terapêuticos para o tratamento de infecções do trato urinário (Nithya & Halami, 2012). Entretanto, a utilização de esporos de *Bacillus* probióticos em produtos alimentícios ainda é recente e a segurança de cepas desse gênero deve continuar a ser criteriosamente analisada a fim de identificar e excluir aquelas que apresentem potencial de virulência ou de deterioração de alimentos (Cutting, 2011).

As HSPs (Heat Shock Proteins) são proteínas do sistema de defesa-antioxidante, protetoras e reparadoras de proteínas celulares danificadas, conferindo à célula uma maior tolerância e resistência contra uma variedade de fatores agressores. O sistema é ativado durante episódios de elevação da temperatura corporal, descontrole das espécies reativas de oxigênio (ROS), isquemia, hipóxia e privação de glicose, bem como vários outros tipos de estresse fisiológico (Belter, Carey, & Garland, 2004; Jang, 2008; Morimoto, 1998; Lollo, Moura, Morato, & Amaya-Farfan, 2013; Staib, Tümer, & Powers, 2009). Portanto, as HSPs servem para manter a integridade celular, a estrutura e a funcionalidade da célula durante os períodos de estresse (Silver & Noble, 2012). Em diferentes tecidos, a HSP70 também está associada ao auxílio do sistema antioxidante, protegendo outras proteínas presentes nos tecidos de possíveis danos e até mesmo da ocorrência do fenômeno de desnaturação (De Moura, Lollo, Morato, Carneiro, & Amaya-Farfan, 2013; Silver & Noble, 2012). Um outro importante grupo de enzimas capaz de indicar o estado de estresse no organismo é o conjunto da superóxido-dismutase (SOD) e catalase, que defendem as células e tecidos contra o ataque por radicais livres (Aguiló et al., 2005).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são um conjunto de proteínas presente em todos os tipos de células. Elas desempenham funções de limpeza intracelulares e extracelulares importantes para manter a integridade da barreira mucosa e a homeostase do intestino. Considerando que as HSPs são proteínas indicadoras de estresse, o papel protetor dos probióticos pode ser mediado, em parte, através da expressão de HSP, que são induzidas em condições estressantes para a célula. Ou seja, quando o organismo é exposto a situações que desestabiliza a sua homeostase, mas contém população microbiana habitante benéfica

(probióticos), essa estimula a produção de HSPs para proteção do mesmo, que interligam com o sistema imune para produção de células de defesa do corpo (Liu, Dicksved, Lundh, & Lindberg, 2014).

Contando com um produto alimentício de consumo popular, o qual não foi explorado ainda como veículo para a adição de *Bacillus* probióticos devido a barreiras tecnológicas, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial probiótico do requeijão cremoso brasileiro adicionado de esporos probióticos de *B.coagulans* GBI-30 6086. Para tanto, os esporos foram incorporados ao produto alimentício em diversos estágios de seu processamento e os efeitos metabólicos advindos de seu consumo foram avaliados em ratos por meio da determinação de parâmetros bioquímicos clássicos e marcadores moleculares de estresse.

2. Material e Métodos

2.1. Cepa probiótica

Bacillus coagulans GBI-30 6086 (Ganeden Biotech, Mayfield Heights, Estados Unidos) é um micro-organismo probiótico Gram-positivo, aeróbio, produtor de ácido láctico, com status GRAS (generally recognized as safe) disponível comercialmente na forma de esporos. *B. coagulans* GBI-30 6086 coloniza transitoriamente o intestino sem a necessidade de seu consumo (via oral) frequente (Maathuis, Keller, & Farmer, 2010).

O esporo liofilizado de *B.coagulans* GBI-30 6086 foi adicionado às amostras de requeijão na concentração 10^7 - 10^8 esporos/g do produto final.

2.2. Enumeração de *B. coagulans* GBI-30 6086

A contagem dos esporos probióticos no início e ao final (14 dias) do estudo e a confirmação do inóculo inicial foi realizada submetendo-se amostras do produto contendo o micro-organismo, inicialmente, ao choque térmico (80°C/10 min). Posteriormente, o material foi diluído (1:10) em água peptonada 1% e empregado para a obtenção de diluições decimais seriadas, a partir das quais foram retiradas alíquotas de 1mL que foram semeadas em profundidade, em meio de cultura formulado Ágar Glicose Extrato de Levedura [BC- Extrato de Levedura (Oxoid) (5g/L), D-Glicose (Dinâmica) (5g/L), Peptona (Acumedia, Lansing, USA)

(5g/L); Fosfato de Potássio Monobásico (Dinâmica) (0,5g/L), Fosfato de Potássio Dibásico (Dinâmica) (0,5g/L), Sulfato de Magnésio (Dinâmica) (0,3g/L); Ágar Bacteriológico (Inlab) (15g/L); Solução de Minerais (1ml/L - Sulfato de Manganês (Dinâmica) (16mg/mL); Cloreto de Sódio (Dinâmica) (10mg/mL); Sulfato de Zinco (Dinâmica) (1,6mg/mL); Sulfato de Cobalto 7H₂O (Dinâmica) (1,6mg/mL); Sulfato de Cobre 5H₂O (1,6mg/mL); Sulfato de Ferro 7H₂O (Dinâmica) (18mg/mL)]. Em seguida, as placas foram incubadas a 40°C/48h em condições aeróbias conforme fornecedor das cepas. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras do queijo ao fim do experimento *in vivo* para determinação da viabilidade dos esporos probióticos no 14º dia de estudo.

2.3. Animais e Procedimentos Experimentais

Foram usados trinta e nove ratos Wistar machos (21 dias de idade, livres de patógenos) criados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (SP, Brasil) e mantidos ($\pm 22^{\circ}\text{C}$, 55% UR, ciclo de luz invertido de 12 h) em gaiolas de crescimento individuais com acesso à ração comercial (Labina, Purina, Brasil) e água *ad libitum* até que atingissem peso de aproximadamente 300g. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Campinas (CEUA/UNICAMP, protocolo nº 3444-1, Anexo 1).

Os animais foram alocados aleatoriamente em cinco grupos (n=8 por grupo), correspondendo às três dietas experimentais avaliadas contendo esporos probióticos (RPP - requeijão com esporos inoculados ao leite antes da pasteurização, 65°C/30min, RPF – requeijão inoculado na etapa de fusão da massa, 90°C/5min e RAPF – requeijão inoculado com esporos após a etapa de fusão da massa, resfriado até 50°C) e mais dois controles estudados [RC - requeijão sem adição de probiótico e C (suplementados com 5 mL de água)] (Figura 1). As dietas experimentais e o requeijão cremoso controle foram administrados aos animais por via orogástrica durante 14 dias, da seguinte maneira: os animais foram gavados diariamente com 6 mL do produto alimentício correspondente, em duas doses de 3 mL por dia. Os animais foram sacrificados ao final do experimento para a coleta das amostras (sangue, tecidos e órgãos) para realização das análises bioquímicas, hematológicas e moleculares.

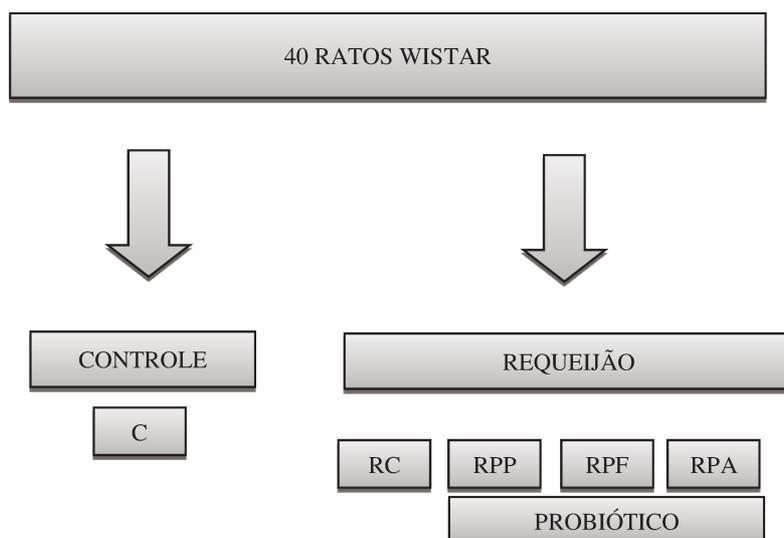


Figura 1. Fluxograma dos grupos experimentais avaliados

Sendo: Controle (C, n = 8); Requeijão Controle (RC, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados na etapa de pasteurização do leite (RPP, n = 7); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados durante a etapa de fusão (RPF, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão (RPAF, n = 8).

2.4. Ração comercial e Dieta experimental

A ração comercial (Labina, Purina, Brasil) foi a base da alimentação dos ratos Wistar durante todo o ensaio, sendo sua ingestão controlada diariamente (100-200g por dia). O requeijão cremoso, utilizado como dieta experimental, foi ofertado durante 14 dias de tratamento, baseado em estudos com cepas probióticas (Lollo et al., 2015) e apresentou a seguinte composição: 40% (m/m) de massa fresca do requeijão, 37% (m/m) de creme de leite com 35% de gordura (Atilate, Itatiba, São Paulo, Brasil), 20% (v/m) água destilada, 1,5% (m/m) de sal fundente Joha S2 (ICL Food Specialties, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) e 1,5% (m/m) de NaCl (Dinâmica, São Paulo, Brasil). Os requeijões foram mantidos à temperatura de 6°C durante todo o período do ensaio *in vivo*.

Para a avaliação da composição centesimal da dieta comercial e experimental foram determinados os teores de umidade, cinzas e proteína bruta (Kjeldahl), de acordo com a metodologia da AOAC (1997) e a quantidade de lipídeos foi obtida pelo método de Bligh & Dyer (1959); os carboidratos, por sua vez, foram estimados indiretamente por diferença.

2.5. Acompanhamento do ganho de peso e consumo de ração comercial

Os ratos foram pesados uma vez por semana e o controle do consumo alimentício foi realizado por meio da diferença entre a quantidade da ração ofertada e aquela não consumida pelos animais.

2.6. Parâmetros bioquímicos

Amostras de sangue foram colhidas no 14º dia de experimento, após sacrifício dos animais, utilizando-se tubos BD-Vacutainers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). O material biológico foi mantido a 4°C e centrifugado (Sigma, Alemanha) a 3.000 x g (4°C, 12 min) para obtenção do soro e avaliação das taxas de glicose, ácido úrico, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), proteína total, albumina, triacilgliceróis, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina-quinase (CK). Os parâmetros bioquímicos avaliados foram determinados em duplicata. Todas as determinações espectrofotométricas foram realizadas utilizando-se kits Laborclin (São Paulo, SP, Brasil) e um leitor de microplacas Biotech Época (BioTek, Winooski, VT, Estados Unidos).

2.7. Parâmetros hematológicos

Amostras de sangue dos animais foram colhidas no final do 14º dia de experimento com o auxílio de tubos Vacutainer (4 mL), as quais foram adicionadas de EDTA e K3 e submetidas a análise hematológica, utilizando-se um contador de células automático (Ac. T5diff Hematology Analyzer, Beckman Coulter, High Wycombe, UK). O coeficiente de variação intra-ensaio para todos os parâmetros determinados foi inferior a 3,0%.

2.8. Extração de proteínas e imunotransferência

Para a análise molecular das proteínas do sistema anti-estresse e antioxidante, ao final do experimento, os animais foram sacrificados e os músculos sóleo direito e esquerdo foram coletados. As análises dos marcadores moleculares foram realizadas empregando-se a técnica de

Western blot. e a quantificação das proteínas foi feita utilizando-se o método de Lowry (1951). As amostras do músculo sóleo foram preparadas por homogeneização de aproximadamente 100 mg de tecido congelado em tampão Triton (Tris 100 mM, pH 7,4, 1% de Triton X-100,) contendo pirofosfato de sódio a 100 mM, NaF 100 mM, EDTA 10 mM, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina. Para a realização da etapa de imunotransferência, homogenatos de tecidos foram submetidos à técnica de SDS-PAGE e as bandas proteicas transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o sistema Western Blot Biocom Ocidental (Bridge of Weir, Reino Unido). As membranas foram incubadas com anticorpos primários e secundários apropriados para a determinação de cada proteína-alvo e parâmetro de interesse (HSP25, HSP60, HSP70, HSP90, SOD e Catalase). As bandas obtidas foram visualizadas por quimiluminescência (UVITEC Cambridge (Model Alliance LD2)) e a intensidade das bandas (avaliação semi-quantitativa ou quantitativa) foi determinada através da utilização do programa ImageJ (v. 1.44 para Windows).

2.9. Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de significância entre as médias (Teste de Tukey) com o intuito de comparar os valores dos parâmetros hematológicos e pesos dos órgãos determinados nos diferentes grupos experimentais estudados. Para avaliar os níveis de proteínas do sistema de defesa e antioxidante (técnica de Western Blot) foi aplicado o teste post hoc de Duncan ao nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Os resultados bioquímicos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguido por teste de Tukey. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3. Resultados e Discussão

Diferentes marcadores são utilizados para averiguar a eficiência e segurança do uso de probióticos inoculados em alimentos oferecidos a animais. Nesse estudo, os valores encontrados para os parâmetros de saúde de ratos saudáveis ao utilizarem requeijão cremoso adicionado de esporo probiótico estão expostos a seguir.

As diferentes dietas (requeijão controle e probiótico) avaliadas no presente estudo apresentaram composição nutricional semelhante entre si, conforme destacado na Tabela 1. O requeijão cremoso mostrou-se adequado como matriz carreadora de probióticos esporulados, uma vez que foram observadas populações elevadas e estáveis desses micro-organismos, sem que prejudicasse a saúde dos animais. Dessa maneira, a matriz alimentícia não causou qualquer interferência negativa nos grupos de animais estudados que consumiram o requeijão cremoso. Na realidade, sabe-se que o queijo pode ser considerado um meio eficiente para a veiculação de bactérias probióticas uma vez que, além de possuírem teores relativamente elevados de lipídios, as suas proteínas podem proteger os micro-organismos de interesse contra a acidez do estômago, favorecendo sua sobrevivência ao longo do TGI (Cruz, Buriti, de Souza, Faria, & Isay Saad, 2009; Lollo et al., 2015).

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão) dos diferentes grupos de substâncias avaliadas para a determinação da composição centesimal das dietas comercial e experimentais oferecidas aos animais acompanhados no presente estudo.

(g/100g)	Dieta comercial	Requeijão cremoso controle*	Requeijão cremoso probiótico#
Umidade	8,7 \pm 0,8	56,7 \pm 0,9	55,7 \pm 0,5
Lipideos	6,2 \pm 0,2	19,5 \pm 1,2	20,7 \pm 1,0
Proteína	21 \pm 1,1	19,1 \pm 0,4	18,6 \pm 0,4
Cinzas	8,3 \pm 0,7	2,5 \pm 1,1	2,7 \pm 0,6
Carboidratos	55,8 \pm 0,9	2,2 \pm 0,7	2,3 \pm 0,9
Total	100	100	100

* Requeijão cremoso controle - sem adição dos esporos da cepa *B. coagulans* GBI-30 6086); # Requeijão cremoso probiótico - contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão.

As contagens iniciais dos esporos probióticos de *Bacillus* GBI-30 6086 inoculados no requeijão cremoso determinadas no primeiro dia de tratamento dos animais avaliados, apresentaram os seguintes valores: $7,85 \times 10^5$; $5,5 \times 10^7$ e $1,4 \times 10^7$ UFC/g para os tratamentos RPP, RPF e RPAF, respectivamente. Ao final do período de tratamento dos animais (14º dia), as populações dos esporos probióticos foram, respectivamente, de $2,05 \times 10^4$, $2,8 \times 10^7$ e $1,17 \times 10^7$ UFC/g para as formulações RPP, RPF e RPAF. A formulação na qual a cepa foi adicionada no

momento da pasteurização do leite para preparação do queijo (RPP) atingiu valores mais baixos que os outros tratamentos, contagens inferior a 6-8 log UFC/g do produto alimentício no início e ao final do período do estudo. Este fato deve-se a menor resistência dos esporos ao passarem por tratamentos térmicos consecutivos na produção do requeijão cremoso, desde a pasteurização do leite, estressando-os e possivelmente germinando na matriz, não atingindo seu sítio alvo (intestino). Porém, ainda não há nenhuma regulamentação aprovada em relação a adição de esporos probióticos em alimentos.

Os efeitos do processo de digestão que os esporos probióticos sofrem ao passar pelo TGI ainda é pouco conhecido; porém, uma dose adequada permite a sobrevivência de praticamente 100% de sua população mesmo no estômago, local em que uma pequena população pode germinar e colonizar transitoriamente o intestino delgado e exercer seus efeitos benéficos (Casula & Cutting, 2002). Além disso, efeitos benéficos distintos são obtidos por cepas probióticas adicionadas a matrizes alimentares, pois essas interferem na sobrevivência dos mesmos ao passarem pelo TGI, protegendo-as e fornecendo-lhes nutrientes, aumentando sua viabilidade (Homayoni Rad et al., 2012; Shori, 2015).

Todos os animais apresentaram ganho de peso corpóreo ponderal durante o tratamento (Figura 2A). Dessa maneira, os animais dos grupos RPP, RPF, RPAF e RC consumiram, comparativamente, menor quantidade de ração comercial, o que pode ter interferido nos valores de pesos finais dos animais, em comparação àqueles pertencentes ao grupo controle (C), ao qual foi oferecido somente água e ração comercial. Tal fato pode ter ocorrido, devido a maior saciedade dos animais que receberam a dieta experimental (requeijão cremoso), a qual possui uma elevada viscosidade, e portanto maior retardo de esvaziamento gástrico (Mourão & Bressan, 2009), além de uma composição rica em proteínas e lipídeos, aproximadamente 40% no total (Pedrosa, Junior, & Tirapegui, 2009). Portanto, no presente estudo, não foi observada alteração significativa que indicasse possível estresse dos animais ou deficiência nutricional em decorrência da dieta suplementada. Esse dado tem grande valia para a indústria de queijos processados, pois confirma a utilização benéfica desse tipo de alimento como matriz probiótica, podendo a indústria investir na melhoria dos seus aspectos nutricionais e se inserir no mercado de alimentos funcionais.

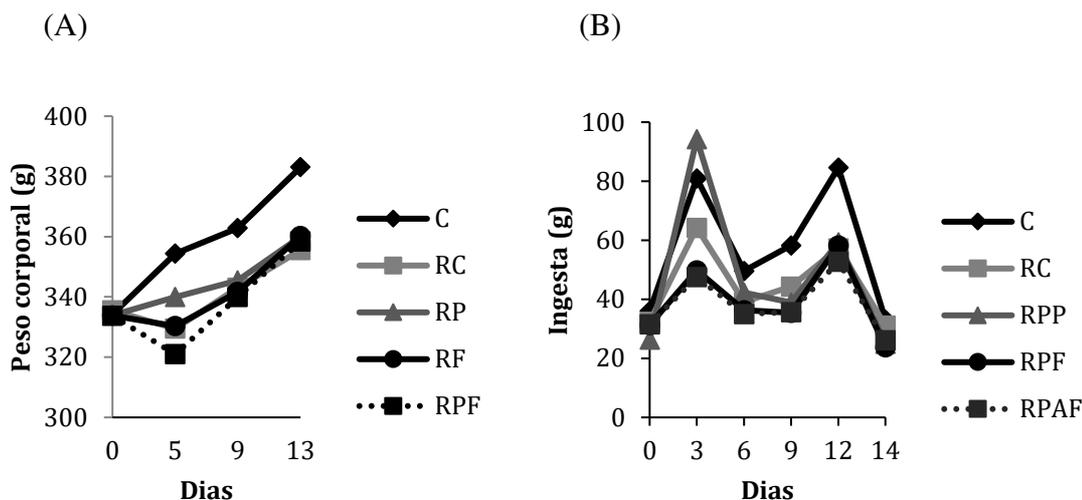


Figura 2. Evolução do ganho de peso corpóreo (A) e da ingestão da dieta comercial (B) em 39 ratos machos Wistar, alocados aleatoriamente em cinco grupos experimentais, durante 15 dias de tratamento. Dietas: Controle (C, n = 8); Requeijão Controle (RC, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados na etapa de pasteurização do leite (RPP, n = 7); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados durante a etapa de fusão (RPF, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão (RPAF, n = 8).

Na Figura 3, estão apresentados os resultados referentes à quantificação de diferentes proteínas dos sistemas anti-estresse e antioxidante dos animais avaliados no presente estudo.

Os níveis de proteínas de estresse testadas mostraram-se conservadas em praticamente todos os tecidos animais, quando comparadas entre os animais do grupo controle e os animais que consumiram os diferentes tipos de amostras de requeijão probiótico, indicando a existência de equilíbrio na homeostase do organismo dos animais (Figura 3). Tais observações foram coerentes com os resultados encontrados ao analisar as populações de células do sistema imune (Tabela 2), as quais mantiveram-se dentro de intervalos normais (Branco, 2011), indicando o adequado estado de saúde dos animais. No entanto, foi observada uma tendência à elevação da expressão da HSP60 mediante a adição do requeijão à dieta, embora sem haver qualquer relação à adição dos esporos de *Bacillus* GBI-30 6086.

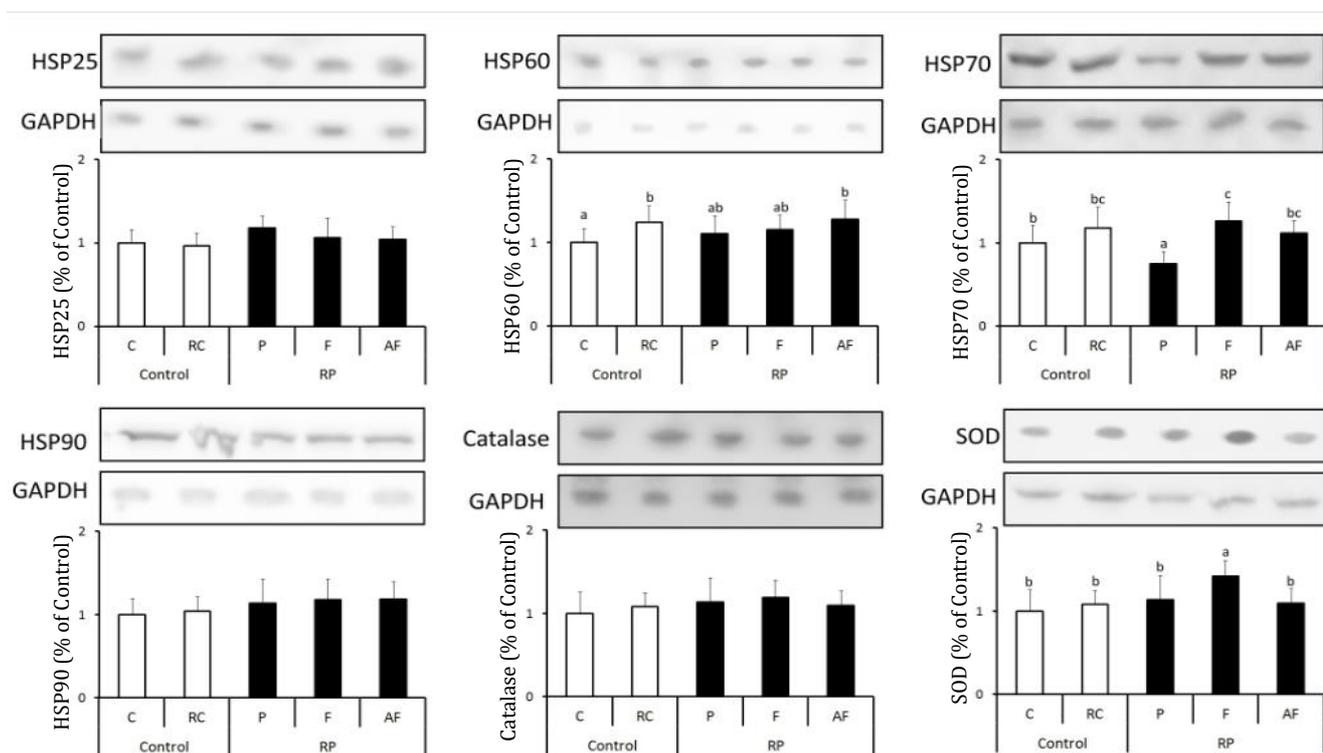


Figura 3. Médias e desvios-padrão da expressão de HSP25, HSP60, HSP70, HSP90, Catalase e SOD sanguíneos nos diferentes grupos, determinados empregando-se a técnica de Western blot. Dietas: Controle (C, n = 8); Requeijão Controle (RC, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados na etapa de pasteurização do leite (RPP, n = 7); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados durante a etapa de fusão (RPF, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão (RPAF, n = 8). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos para uma mesma expressão de proteínas. Ausência de letras representa que não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Em relação ao nível de HSP70, observou-se taxas de expressão adequadas dessas proteínas nos animais que receberam as dietas controle e experimental com ou sem probióticos, podendo indicar a homeostase do organismo dos animais, sem injúrias causadas pela matriz e pelo micro-organismo probiótico esporulado estudado. A redução na expressão de HSP70 ($p < 0,05$) no grupo RPP quando comparada aos outros grupos, pode indicar perda de esporos viáveis quando a adição foi feita nesta fase do processamento, tendo em vista que os animais eram saudáveis, ou seja, que não houve a participação de qualquer agente claramente estressor. Ou seja, obteve um nível basal baixo de estresse, não permitindo a expressão alta desse marcador. Tal resultado, entretanto, não teve reflexo concomitante na expressão da SOD. Na realidade, os níveis de SOD dos animais que receberam os esporos probióticos adicionados na

etapa da fusão (RPF) foram superiores ($p < 0,05$) aos dos demais grupos, sugerindo que o tratamento térmico e as condições microambientais na etapa da fusão possam ter sido determinantes para uma maior germinação dos esporos e uma maior expressão da enzima do sistema antioxidante.

A quantificação de HSPs, quando houve ingestão de amostras de requeijões adicionadas de probióticos, possuiu valor preditivo do estado de saúde, visto que essas proteínas são indicadoras do estado homeostático do organismo e lesão celular. A ingestão de probióticos, particularmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, é capaz de modular os níveis de oxidação do organismo uma vez que esses micro-organismos são capazes de induzir reações antioxidantes, inibindo a formação de metabólitos reativos de oxigênio no trato gastrointestinal (Amaretti et al., 2013). Nesse contexto, as HSPs podem ser úteis para avaliar o efeito de probióticos, os quais são conhecidos por estimularem o sistema imune e controlarem o processo inflamatório, consequentemente diminuindo o estresse oxidativo mediado por citocinas (Coppola & Turnes, 2004; Taverniti & Guglielmetti, 2011)

Em estudo *in vitro* com células epiteliais intestinais, por exemplo, a cepa Ganeden BC30 mostrou-se capaz de modular a produção de metabólitos anti-inflamatórios e o sistema imune, enfatizando que o micro-organismo esporulado em questão apresenta potencial para exercer efeitos benéficos à saúde humana (Jensen, Benson, Carter, & Endres, 2010).

As Figuras 4, 5 e 6 exibem os diferentes parâmetros bioquímicos determinados no sangue dos animais alocados aleatoriamente nos diferentes grupos, expressos como valores médios e desvios-padrão.

Conforme observado na Figura 4, não houve alteração significativa ($p > 0,05$) do perfil lipídico e dos níveis de glicose entre os grupos, demonstrando que a matriz alimentícia e os esporos probióticos inoculados não induziram alterações na homeostase do metabolismo energético, em concordância com o não-aumento dos biomarcadores de estresse, SOD e catalase. Dessa maneira, os valores médios determinados encontraram-se dentro dos limites dos intervalos de referência preconizados pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP, 2008), que são 98,9-110,2mg/dL para colesterol total, 11,4-20,4mg/dL para HDL-colesterol, 110 – 174,8mg/dL para triglicérides e 150,7-207,5mg/dL para glicemia.

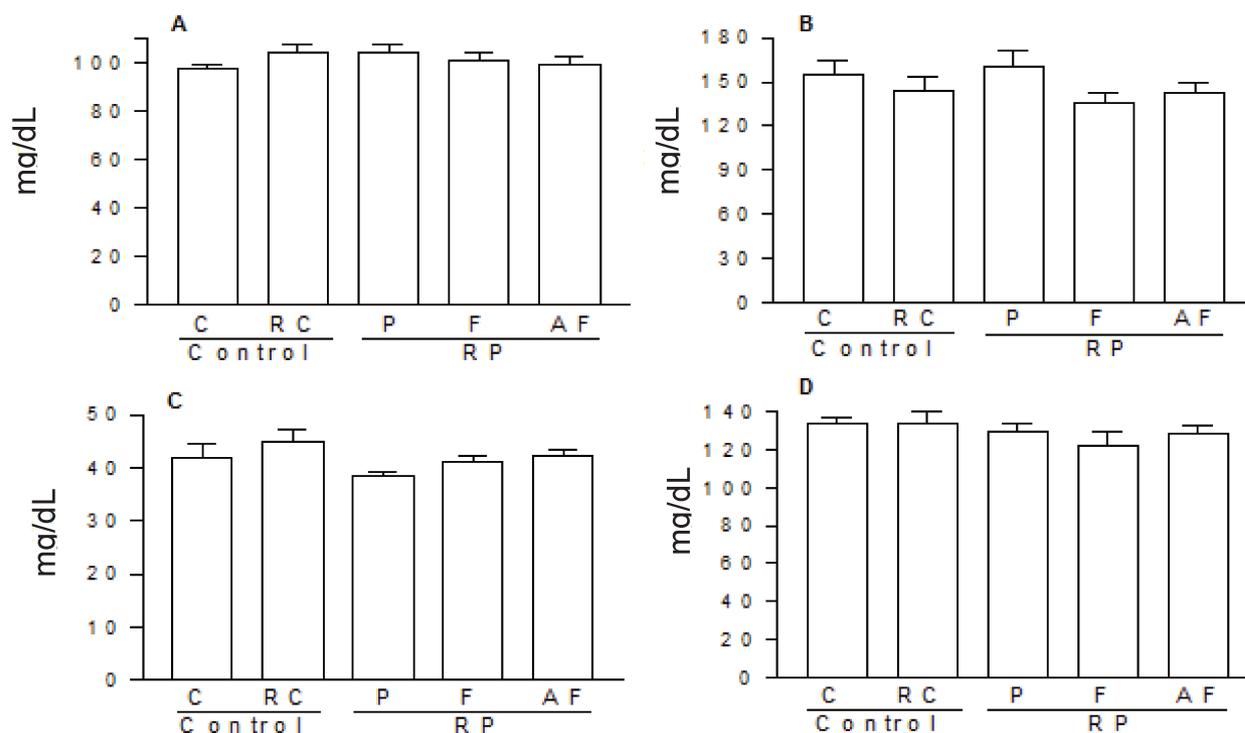


Figura 4. Valores médios e desvios padrão do perfil lipídico: (A) colesterol total, (B) triglicérides e (C) colesterol de alta densidade- HDL e de glicose (D) das análises bioquímicas de amostras de sangue dos 39 animais alimentados com requeijão probiótico e grupo controle. Dietas: Controle (C, n = 8); Requeijão Controle (RC, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados na etapa de pasteurização do leite (RPP, n = 7); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados durante a etapa de fusão (RPF, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão (RPAF, n = 8).

A análise do perfil lipídico é de extrema importância para a avaliação do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O colesterol total, o triglicérides e o HDL são marcadores bioquímicos facilmente alterados pela dieta. Uma desregulação desses marcadores pode provocar um quadro de dislipidemia, obstruindo artérias e resultando em problemas cardiovasculares (Castro, Franceschini, Priore, & Pelúzio, 2004; Zambon et al., 2009).

A dosagem de glicose, por sua vez, é utilizada para a avaliação de possíveis alterações na produção e/ou absorção do hormônio insulina, os quais são indicativos do risco aumentado do desenvolvimento de diabetes mellitus (Fernandez et al., 2005).

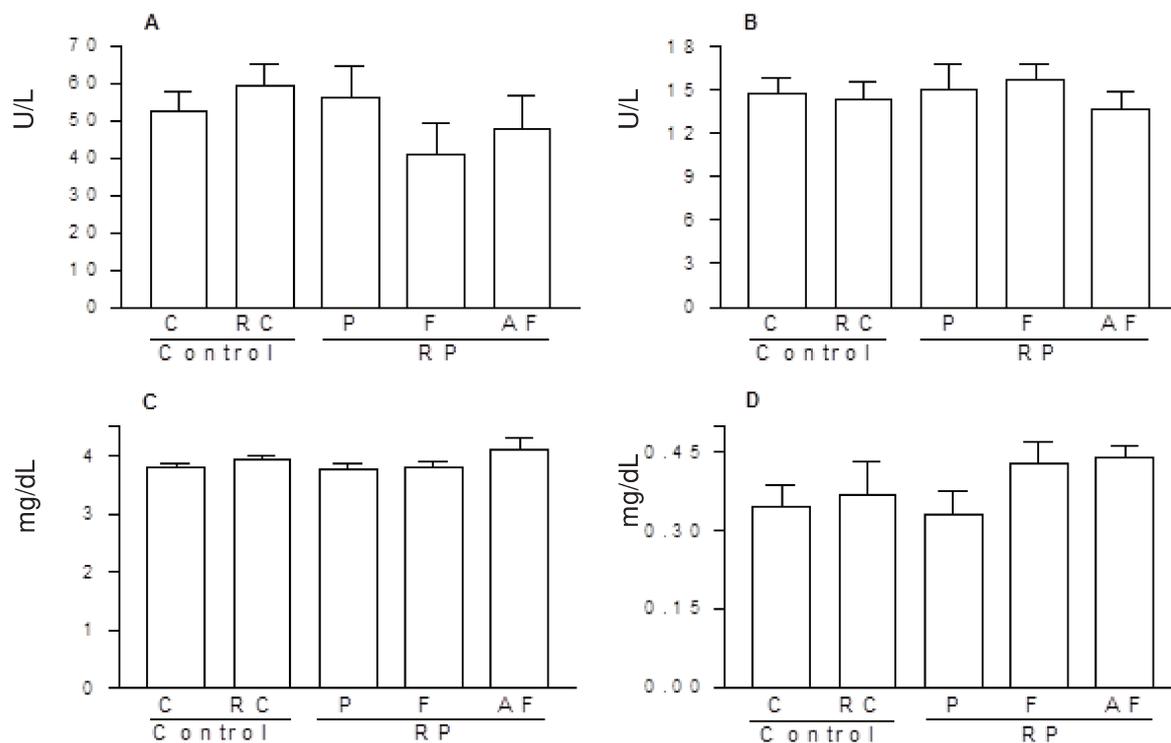


Figura 5. Valores médios e desvios-padrão do perfil hepático: (A) AST: aspartato aminotransferase, (B) ALT: alanina aminotransferase e renal: (C) ácido úrico e (D) creatinina-quinase das análises bioquímicas de amostras de sangue dos 39 animais alimentados com requeijão probiótico e grupo controle. Dietas: Controle (C, n = 8); Requeijão Controle (RC, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados na etapa de pasteurização do leite (RPP, n = 7); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados durante a etapa de fusão (RPF, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão (RPAF, n = 8).

Os níveis de enzimas do sistema hepático e marcadores bioquímicos do sistema renal (Figura 5), por sua vez, não se mostraram alterados devido à ingestão do produto alimentício contendo esporos probióticos de *B. coagulans* GBI-30 6086 ($p > 0,05$). Os valores obtidos para as enzimas hepáticas foram inferiores ao intervalo de referência utilizado pela FMUSP (114,0 – 290,8 U/L para ALT e 129,0 – 148,1 U/L para AST); em compensação, os grupos que receberam a dieta experimental exibiram valores semelhantes aos do grupo controle (C). Tal defasagem pode estar relacionada à variabilidade genética do animal, influência ambiental ou diferenças na manipulação dos ratos, conforme apontado por outros pesquisadores (Branco et al., 2011, Lima et al., 2014; Santos et al., 2010). Os níveis de creatina e ácido úrico determinados no presente estudo, por sua vez, foram similares aos valores de referência adotados por outro estudo no qual foram avaliados os parâmetros hematológicos e bioquímicos

de ratos da linhagem Wistar, provenientes do biotério da Universidade Tiradentes (0,24-1,20 mg/dL para creatina e 1,00-3,20 mg/dL para ácido úrico) (Lima et al., 2014).

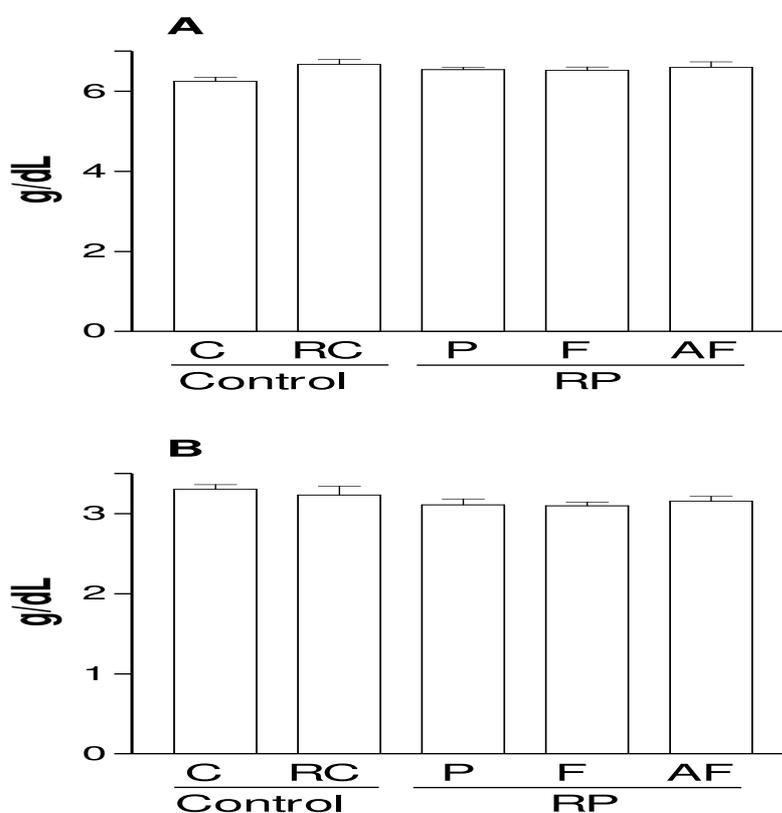


Figura 6. Valores médios e desvios padrão de proteínas totais (A) e albumina (B) sanguíneas dos 39 animais alimentados com requeijão probiótico e grupo controle. Dietas: Controle (C, n = 8); Requeijão Controle (RC, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados na etapa de pasteurização do leite (RPP, n = 7); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados durante a etapa de fusão (RPF, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão (RPAF, n = 8).

Os resultados obtidos para os parâmetros bioquímicos, a saber proteína total e albumina (Figura 6) estão dentro das respectivas faixas de valores de referência adotados pelo biotério da FMUSP (5,5-10,4g/dL e 2,8-6,1g/dL, respectivamente). Dessa maneira, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos estudados, demonstrando que o estado nutricional dos animais não foi alterado em função da dieta. Valores de proteínas totais anormais, por sua vez, indicam, principalmente, problemas nutricionais, doença renal ou hepática. A comparação entre os valores encontrados para animais e seres humanos é realizada devido a semelhança fisiológica dos dois, podendo prever comportamentos análogos à realidade. O valor ideal para proteínas totais em seres humanos está na faixa de 6-8,3g/dL, semelhante àqueles observados

nos roedores avaliados em nosso trabalho (6,29-6,65 g/dL). O ácido úrico, por sua vez, é naturalmente produzido pelo organismo através da quebra de proteínas (purinas) provenientes principalmente da dieta, sendo eliminado pelos rins. Em seres humanos, seu nível ideal encontra-se na faixa de 3,4-7g/dL, valor similar àquele determinado nos animais acompanhados no presente estudo, que foi de 3,74-4,29g/dL. Um quadro de hiperuricemia pode levar à formação de cristais de uratos, os quais se depositam principalmente nas articulações, dando origem ao processo denominado gota (Stangarlin & Rodrigues, 2011).

Os dados referentes aos parâmetros hematológicos determinados nos animais alocados em diferentes grupos experimentais estão reunidos na Tabela 2. Os resultados obtidos a partir da análise hematológica e imune encontram-se dentro dos valores de referência e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diversos grupos estudados (ratos saudáveis). Resultado distinto foi observado por Lollo et al. (2013). Segundo os autores, ratos submetidos a exercício físico extenuante apresentaram as funções do sistema imune comprometidas, as quais foram restabelecidas após a ingestão de iogurte probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* LA 14 e *Bifidobacterium longum* BL 05. Os valores de referência para parâmetros hematológicos variam sobremaneira de acordo com raça, linhagem, idade, sexo e estado de saúde do animal, assim como podem sofrer alterações relacionadas à manipulação do sangue, tornando difícil a comparação precisa entre diferentes estudos.

A quantificação de neutrófilos é um indicador rápido e simples da intensidade de estresse e do estado inflamatório (Zahorec, 2001). O aumento do número de neutrófilos e linfócitos na corrente sanguínea é indicativo de estados inflamatórios e infecciosos (Lollo et al., 2013). Ao avaliar os marcadores do sistema de defesa, os valores encontrados no leucograma dos animais analisados realçam os efeitos benéficos relacionados à quantificação de proteínas do estresse, indicando uma homeostase do organismo, assim como indicam que a matriz alimentícia carreadora do probiótico é inerte à saúde dos animais estudados.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão dos parâmetros hematológicos determinados em 40 animais do estudo.

Haematological Parameters						
Feeding type	Eritogram					
	Red blood cell (10 ⁶ cel/μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	Platelets (10 ⁶ cel/μL)		
Control	7,6 ± 2 ^a	14,14 ± 0,96 ^a	43,5 ± 1 ^a	1 ± 1 ^a		
RC	8,50±2,49 ^a	15,85±1,32 ^a	43,71±1,95 ^a	1,25±1,40 ^a		
RPP	8,19±4,02 ^a	17,29±0,87 ^a	41,43±2,03 ^a	1,22±1,72 ^a		
RPF	8,60±2,64 ^a	15,25±0,92 ^a	41,88±1,22 ^a	1,08±3,46 ^a		
RPAF	8,39±4,78 ^a	13,25±0,96 ^a	41,63±2,10 ^a	1,06±3,01 ^a		
Haematological Parameters						
Feeding type	Leucogram					
	Leukocytes (10 ³ cel/μL)	Lymphocyte (10 ³ cel/μL)	Eosynophil (cel/μL)	Monocyte (cel/μL)	Neutrophil (10 ³ cel/μL)	Basophile (cel/μL)
Control	12,60 ±6589 ^a	7,42 ±3438 ^a	262 ±317 ^a	1008 ±653 ^a	3,91 ±3284 ^a	0
RC	13,06 ±5122 ^a	8,75 ±3353 ^a	363 ±330 ^a	590 ±715 ^a	3,36 ±3239 ^a	0
RPP	12,53 ±3351 ^a	7,30 ±3006 ^a	299 ±249 ^a	421 ±485 ^a	4,52 ±3092 ^a	0
RPF	13,33±911 ^a	8,76 ±2702 ^a	350 ±204 ^a	804 ±456 ^a	3,41 ±2896 ^a	0
RPAF	13,99 ±4353 ^a	9,70 ±2481 ^a	417 ±208 ^a	574 ±444 ^a	3,31 ±782 ^a	0

Dietas: Controle (C, n = 8); Requeijão Controle (RC, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados na etapa de pasteurização do leite (RPP, n = 7); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculados durante a etapa de fusão (RPF, n = 8); Requeijão probiótico contendo esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 inoculado após a etapa de fusão (RPAF, n = 8).

Dessa maneira, com base nos resultados obtidos para os diferentes parâmetros hematológicos e bioquímicos no presente modelo animal, permite inferir que o esporo probiótico utilizado é seguro, não tendo causado nenhum processo adverso, inflamatório ou sinais que sugiram alergenicidade nos animais testados durante o período do estudo uma vez que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes tratamentos.

4. Conclusão

Os efeitos na saúde, determinados por métodos clássicos e altamente sensíveis com biomarcadores moleculares, mostraram que a cepa probiótica *Bacillus coagulans* GBI30 6086 foi adequada e segura quando veiculada em requeijão cremoso sob a forma de esporos e administrada a ratos Wistar jovens e saudáveis. Os diferentes tratamentos do requeijão probiótico não afetaram a manutenção da homeostase metabólica dos animais estudados. Considerando a função que HSP70 possui na proteção contra o estresse, pode se afirmar que a adição dos esporos probióticos, em qualquer uma das fases do processamento do queijo, não alterou seus níveis nas amostras de sangue dos animais testados, indicando que a cepa probiótica na forma de esporos (*Bacillus coagulans* GBI30 5660) mostrou-se viável e segura na ingestão dessa matriz. Portanto, a adição dos esporos na etapa de fusão do requeijão cremoso, facilita o processo tecnológico de obtenção do alimento funcional, visto que aumenta a homogeneização da cepa, evita possíveis recontaminações do produto após processos térmicos e sua ingestão por ratos saudáveis não causa prejuízos à saúde.

Agradecimentos

Financiamento: Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) mediante a concessão da bolsa de estudos à M. B. Soares (Processo nº 2013/21544-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) aos projetos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos da FEA/UNICAMP.

5. Referências Bibliográficas

- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J. A., Córdova, A., & Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology and Behavior*, *84*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.07.034>
- Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., & Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: In vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(2), 809–817. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4241-7>
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC, Inc. (2002) Official Methods of Analysis. 17th edition. Gaithersburg: AOAC International 1878.
- Belter, J. G., Carey, H. V, & Garland, T. (2004). Effects of voluntary exercise and genetic selection for high activity levels on HSP72 expression in house mice. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *96*(4), 1270–1276. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00838.2003>
- Blanch, A. R., Méndez, J., Castel, S., & Reina, M. (2014). Comparison of procedures for the extraction of supernatants and cytotoxicity tests in Vero cells, applied to assess the toxigenic potential of *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* spp., intended for use as probiotic strains. *Journal of Microbiological Methods*, *103*, 64–69. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.019>
- Bligh, E.G. & Deyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37* (8).
- Branco, A.C.S.C. et al. (2011). Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Rats and Swiss Mice in the Professor Thomas George Animal Laborator. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, *15*, 209-214.
- Bressan, J. (2009). Influência de alimentos líquidos e Influence of liquid and solid foods on appetite control, *22*(4), 537–547. <http://doi.org/dx.doi.org/10.1590/S1415-52732009000400009>
- Cartman.,M.; Ragione L.;& Woodward M.J. (2007). Bacterial spore formers as probiotics for poultry. *Food Science & Technology Bulletin*, *4*, 21–30.
- Castro, L. C. V., Franceschini, S. D. C. C., Priore, S. E., & Pelúzio, M. D. C. G. (2004). Nutrition and cardiovascular diseases: the risk markers in adult. *Revista de Nutricao*, *17*(3), 369–377. <http://doi.org/10.1590/S1415-52732004000300010>
- Casula, G., & Cutting, S. M. (2002). Bacillus Probiotics : Spore Germination in the Gastrointestinal Tract, *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(5), 2344–2352. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2344>
- Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo FMUSP.(2008). Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de bioterismo da FMUSP. Disponível em: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17¶metros=sim.
- Coppola, M. D. M., & Turnes, C. G. (2004). Probióticos e resposta imune, 1297–1303. *Ciência Rural*, *34*, 1297-1303.
- Cutting, S. M. (2011). Bacillus probiotics. *Food Microbiology*, *28*(2), 214–20. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>

- Cruz, A.G., Alonso Buriti, F. C., Batista de Souza, C. H., Fonseca Faria, J. A., & Isay Saad, S. M. (2009). Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 344–354. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.001>
- Dantas, A.B.; Jesus, V.F.; Silva, R.; Almada, C.N.; Esmerino, E.A.; Cappato, L.P.; Silva, M.C.; Raices, R.S.L.; Cavalcanti, R.N.; Carvalho, C.C.; Sant'Ana, A.S.; Bolini, H.M.A.; Freitas, M.Q.; & Cruz, A.G. (2016). Manufacture of probiotic minas frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. *Journal of Dairy Science*, 99, 18-30.
- De Almada, C. N., Nunes de Almada, C., Martinez, R. C. R., & Sant'Ana, A. D. S. (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4175–4199. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6582-5>
- De Moura, C. S., Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Carneiro, E. M., & Amaya-Farfan, J. (2013). Whey protein hydrolysate enhances the exercise-induced heat shock protein (HSP70) response in rats. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1350–1357. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.070>
- Esmerino, E.A.; Paixão, J.A.; Cruz, A.G.; Garitta, L.; Hough, G.; & Bolini, H.M.A. (2015). Survival analysis: A consumer-friendly method to estimate the optimum sucrose level in probiotic petit suisse. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7544–7551.
- Felicio, T. L., Esmerino, E. A., Vidal, V. A. S., Cappato, L. P., Garcia, R. K. A, Cavalcanti, R. N., & Cruz, A. G. (2016). Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, 196, 628–637. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.102>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(August 2014), 9. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Homayoni Rad, A., Mehrabany, E. V., Alipoor, B., Mehrabany, L. V., & Javadi, M. (2012). Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28(7-8), 733–6. <http://doi.org/10.1016/j.nut.2012.01.012>
- Huang, Q., Xu, X., Mao, Y., Huang, Y., Rajput, I. R., & Li, W. (2013). Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 84(3), 247–52. <http://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2012.01064.x>
- Jang, H.J., Kwak, J.H., Cho, E.Y., We, Y.M., Lee, Y.H., Kim, S.C. & Han, D.J. (2008). Glutamine induces heat-shock protein-70 and glutathione expression and attenuates ischemic damage in rat islets. *Transplantation Proceedings*, 40, 2581-2584.
- Jensen, G. S., Benson, K. F., Carter, S. G., & Endres, J. R. (2010). GanedenBC30™ cell wall and Metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. Jensen et al. *BMC Immunology* 2010, 11-15.
- Lima, C. M., Lima, A. K., Melo, M. G. D.; Dória, G. A. A.; Leite, B. L. S.; Serafini, M. R.; Albuquerque-Júnior, R. L. C., & Araújo, A. A. S. (2014). Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*, 10 (3).

- Liu, H., Dicksved, J., Lundh, T., & Lindberg, J. (2014). Heat Shock Proteins: Intestinal Gatekeepers that Are Influenced by Dietary Components and the Gut Microbiota. *Pathogens*, 3(1), 187–210. <http://doi.org/10.3390/pathogens3010187>
- Lollo, P. C. B., De Moura, C. S., Morato, P. N., Cruz, A. G., Castro, W. D. F., Betim, C. B., & Amaya-Farfan, J. (2013). Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage. *Food Research International*, 54(1), 118–124. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.003>
- Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Moura, C. S., Almada, C. N., Felicio, T. L., Esmerino, E. A., & Cruz, A. G. (2015). Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Research International*, 76, 611–617. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.015>
- Lollo, P. C. B., Moura, C. S., Morato, P. N., & Amaya-Farfan, J. (2013). Differential response of heat shock proteins to uphill and downhill exercise in heart, skeletal muscle, lung and kidney tissues. *Journal of Sports Science and Medicine*, 12(3), 461–466.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maathuis, a. J. H., Keller, D., & Farmer, S. (2010). Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. *Beneficial Microbes*, 1(1), 31–36. <http://doi.org/10.3920/BM2009.0009>
- Martinez, R. C. R., Bedani, R., & Saad, S. M. I. (2015). Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition*, 1–23. <http://doi.org/10.1017/S0007114515003864>
- Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat-shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, 12, 3788-3796.
- Nithya, V., & Halami, P. M. (2012). Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Annals of Microbiology*, 63(1), 129–137. <http://doi.org/10.1007/s13213-012-0453-4>
- Pedrosa, R. G., Junior, J. D., & Tirapegui, J. (2009). Dieta rica em proteína na redução do peso corporal. *Revista de Nutricao*, 22(1), 105–111. <http://doi.org/10.1590/S1415-52732009000100010>
- Pereira, E. P. R., Cavalcanti, R. N., Esmerino, E. A., Silva, R., Guerreiro, L. R. M., Cunha, R. L., & Cruz, A. G. (2016). Effect of incorporation of antioxidants on the chemical, rheological, and sensory properties of probiotic petit suisse cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1762–1772. <http://doi.org/10.3168/jds.2015-9701>
- Santos, M. R. V., Souza, V. H., Menezes, I. A. C., Bitencurt, J. L., Resende-Neto, J. M., Barreto, A. S., & Barbosa, A. P. O. (2010). Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*, 6(10), 106101. Retrieved from <http://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/144>
- Sassone-Corsi, M., Nuccio, S. P.; Liu, H., Hernandez, D., Vu, C.T., Takahashi1, A.A., Robert A. Edwards, R. A., & Raffatellu, M. (2016). Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature*, 540, 280-283. <http://doi:10.1038/nature20557>

Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 423–431. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010>

Silver, J. T., & Noble, E. G. (2012). Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), 1–9. <http://doi.org/10.1007/s12192-011-0290-6>

Staib, J. L., Tümer, N., & Powers, S. K. (2009). Increased temperature and protein oxidation lead to HSP72 mRNA and protein accumulation in the in vivo exercised rat heart. *Experimental Physiology*, 94(1), 71–80. <http://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.044685>

Stangarlin, J. C. B. & Rodrigues, E.R. P. (2011). Determinação dos níveis séricos de ácido úrico em ratos. Anais do Encontro Internacionall de Produção Científica Cesumar. CESUMAR – Centro Universitário de Maringá Editora, Maringá, PR.

Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6(3), 261–274. <http://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>

Trejo F, Sanz Y (2013). Intestinal bacteria and probiotics: effects on the immune system and impacts on human health. In: Calder PC, Yaqoob P (eds) Diet, immunity and inflammation. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp 267–291

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

Van Dender, A. G. F. (2012) Requeijão Cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado. São Paulo: Fonte e Editora Ltda. 392p.

Zahorec, R. (2001). Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratislavske Lekarske Listy*, 102(1), 5–14.

Zambon, L., Duarte, F. O., de Freitas, L. F., Scarmagnani, F. R. R., Dâmaso, A., de Oliveira Duarte, A. C. G., & Sene-Fiorese, M. (2009). Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Revista de Nutricao*, 22(5), 707–715. <http://doi.org/10.1590/S1415-52732009000500011>

Capítulo 5

**Avaliação do comportamento de micro-organismos
probióticos em condições simuladas do trato
gastrointestinal usando modelos preditivos**

**Avaliação do comportamento de micro-organismos probióticos em condições simuladas
do trato gastrointestinal usando modelos preditivos**

Mariana B. Soares^a, Verônica O. Alvarenga^a, Rafael Chaves^a, Anderson de Souza Sant'Ana^{a*}

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

*Autor correspondente: Prof. A.S. Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862.
Campinas, SP, Brasil. Contato: +55(19) 3521-2174.

Artigo formatado conforme as normas da revista "Journal of Functional Foods"

Resumo

Modelos matemáticos têm sido cada vez mais aplicados em áreas de ciência e engenharia com o intuito de permitir um melhor entendimento do comportamento de sistemas e aumentar sua eficácia, explorar novos conceitos teóricos e solucionar problemas práticos. Dessa maneira, essa abordagem se torna interessante para investigação da sobrevivência dos micro-organismos probióticos quando submetidos a condições similares do TGI. Este trabalho teve como objetivo utilizar a modelagem preditiva para determinar a sobrevivência de micro-organismos probióticos (*Bacillus* e *Lactobacillus*) em condições simuladas do TGI em diferentes matrizes alimentícias (requeijão cremoso, pão e suco de laranja) em função do pH. O comportamento dos micro-organismos probióticos foram analisados em condições estáticas do TGI. Para cada alimento, adicionado de uma única cepa probiótica, foram realizados diferentes ensaios empregando-se solução gástrica com pH 1; 2; 3 e 4. Todas as amostras foram mantidas a 37°C sob agitação (150rpm) durante diferentes intervalos de tempo. O modelo de inativação Weibull com cauda (log linear com cauda) de primeira ordem foi utilizado para o ajuste dos dados provenientes das contagens (UFC/g ou mL) de *L. paracasei* PXN 37. Curvas de inativação e valores de taxa de inativação foram obtidas, separadamente, para cada valor de pH e cada matriz alimentar em que foi inserido, estimados através da utilização do software GInaFiT®. O efeito do pH sobre a taxa de inativação (k_{max}) foi estimado utilizando-se o modelo de Raíz Quadrada de Ratkowsky. Os dados gerados do comportamento do *L. paracasei* PXN 37 nas condições dinâmicas foram comparados com dados da literatura. Não foi realizada modelagem preditiva para os esporos de *Bacillus* probióticos, visto que a população dos mesmos permaneceu estável entre início e final da digestão nos pH avaliados nas condições estáticas. O *L. paracasei* PXN 37 apresentou cinética de inativação mais significativa no pH 1, onde não manteve as concentrações de células viáveis indicadas pela literatura (>6 log UFC/g) nos alimentos estudados. A microbiologia preditiva como ferramenta possibilita a triagem de cepas adequadas ao melhor ajuste da dose, o emprego de diferentes cepas probióticas pela indústria de alimentos, a identificação das condições que inibem/retardam a sua multiplicação, averiguação dos limitantes para a vida de prateleira dos alimentos nos quais as cepas foram inseridas e cepas com melhor sobrevivência ao passar pelo TGI.

Palavras chaves: microbiologia preditiva, modelos matemáticos, probióticos, condições gástricas, inativação.

1. Introdução

A área de pesquisa de probióticos avançou muito nos últimos anos, estimulada pela necessidade da compreensão da função da microbiota humana na saúde e na doença, procurando definir táticas eficazes para tornar a microbiota mais saudável (Hill et al., 2014). Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício para a saúde no hospedeiro (Hiil et al., 2014, FAO/WHO, 2001). Esses devem ser administrados regularmente e necessitam ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) (Hill et al., 2014; Jensen et al., 2012; Klu & Chen, 2015).

A matriz alimentícia, agindo como carreadora de micro-organismos probióticos, desempenha papel importante na proteção das cepas probióticas às condições deletérias do TGI (acidez e sais biliares), bem como fornecem substratos (prebióticos) para que haja crescimento e boa colonização no ambiente intestinal, garantindo sua viabilidade e consequentes benefícios à saúde (Shori, 2015). Para que um produto seja considerado probiótico, a viabilidade de suas células, é um dos critérios principais, sendo importante sua manutenção desde o processamento à ingestão pelo consumidor (Ranadheera et al., 2010; Valerio et al., 2006). Na literatura, concentrações de 10^6 - 10^8 log UFC/g ou ml de produto final são relacionadas a efeitos positivos na saúde (Silva et al., 2015). Infelizmente, é observado uma gama de alimentos rotulados como probióticos que não atendem a critérios mínimos, como conteúdo definido, contagem viável apropriada no final da vida útil e evidência adequada para benefício à saúde (Hill et al., 2014).

Testes convencionais para avaliação da viabilidade da cepa probiótica em alimentos, desde o seu processamento ao seu consumo, devem ser obrigatoriamente utilizados. A aplicação de testes de resistência às barreiras intestinais e modelos *in vivo* se agrupam como ferramentas complementares e de triagem para avaliação da capacidade dos micro-organismos probióticos, em um alimento específico, exercerem efeitos funcionais (Vinderola, Binetti, Burns, & Reinheimer, 2011). Ensaio de avaliação da sobrevivência às condições de estresse do TGI são amplamente utilizados para triar e caracterizar uma cepa com potencial probiótico. Estes testes podem ser estáticos ou dinâmicos. O primeiro possui a vantagem de ser mais rápido, simples e acessível, porém, não leva em consideração a influência da dieta e constituintes não-ácidos da secreção gástrica, além de seu tempo e espaço serem variáveis. O segundo, *in vitro* dinâmico (simulação dos processos biológicos), é mais consistente com o teste *in vivo*, sendo reprodutível e de fácil implementação, além

de ser possível a coleta de amostra em qualquer etapa do processo digestivo. Contudo, a maioria destes testes não simulam as interações dos probióticos com a microbiota e são mais onerosos em relação ao primeiro. Testes *in vivo* (animais e seres humanos) são os que mais se aproximam das reais condições encontradas em um sistema biológico. Porém ainda existem diversas restrições importantes à sua aplicação relacionadas às questões éticas e financeiras, entre outros motivos (Roy, Laval, & City, 2011).

Na microbiologia preditiva, o estudo da multiplicação ou morte microbiana em relação a fatores ambientais é expresso em equações matemáticas que permitem a predição do comportamento de micro-organismos e estimativa da população em alimentos (Alvarenga 2008; Zwietering et al., 1991; McMeekin et al., 2002; Janssen et al., 2007; McMeekin et al., 2008). A modelagem preditiva tem sido empregada em algumas espécies de bactérias ácido-lácticas (BAL), consideradas micro-organismos indesejáveis em alguns alimentos (Devlieghere et al., 1998, Rodrigo et al., 2003; Gómez et al., 2005; Kilimann et al., 2005; Altieri et al., 2008). Mais recentemente, tem sido investigada a sobrevivência de cepas probióticas deste grupo em alimentos, aplicando a microbiologia preditiva afim de se determinar o tempo de vida de prateleira dos mesmos (Cruz et al., 2010; Dorota et al., 2014; Slaćanac et al., 2013). Dessa maneira, essa abordagem se torna interessante para investigação da sobrevivência dos micro-organismos probióticos quando submetidos a condições similares do TGI. Os dados gerados possibilitam a triagem de cepas adequadas ao melhor ajuste da dose, o emprego de diferentes cepas probióticas pela indústria de alimentos, a identificação das condições que inibem/retardam a sua multiplicação, averiguação dos limitantes para a vida de prateleira dos alimentos nos quais as cepas foram inseridas e melhor sobrevivência de uma cepa em determinada matriz e sob as condições do TGI. Assim, os resultados advindos dos ensaios propiciam economia de tempo e redução da necessidade da realização de testes *in vitro*, que oneram a sua aplicação.

Dado o exposto, este trabalho teve como objetivo utilizar a modelagem preditiva para determinar a sobrevivência de micro-organismos probióticos (*Bacillus* e *Lactobacillus*) em condições simuladas do TGI em diferentes matrizes alimentícias (requeijão cremoso, pão e suco de laranja) em função do pH.

2. Metodologia

2.1.Cepas probióticas

As cepas probióticas *Lactobacillus paracasei* PXN 37, *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 e *Bacillus coagulans* MTCC 5856 liofilizadas (DVS) foram inoculadas na concentração de 10^6 a 10^8 UFC ou esporos/g ou mL nas matrizes alimentares. As duas primeiras foram inoculadas no requeijão cremoso e suco de laranja e a última, foi inoculada somente no pão, a fim de simular a ingestão de uma refeição completa e com diferentes composições nutricionais e físico-químicas.

2.2.Matrizes probióticas

i. Requeijão Cremoso

O requeijão cremoso foi processado utilizando-se leite pasteurizado semi-desnatado tipo A (Xandô, São Paulo, SP, Brasil), creme de leite pasteurizado com 35% de teor de gordura (Atilate, Itatiba, SP, Brasil), ácido láctico com 85% de pureza (Dinâmica, São Paulo, SP, Brasil), cloreto de sódio (NaCl) (Dinâmica, São Paulo, SP, Brasil), sal fundente JOHA S9 (ICL Food Specialties, São Bernardo do Campo, SP) e sorbato de potássio (Dinâmica, São Paulo, SP, Brasil). Um total de 42 litros de leite e 8 litros creme de leite foram adquiridos no comércio local da cidade de Campinas (SP, Brasil).

Para o processamento do requeijão cremoso, o creme de leite (v/v), o NaCl (m/m), o sal fundente (m/m) e a água destilada (v/v) foram adicionados, respectivamente, na proporção de 37, 1,5, 1,5 e 20% em relação à massa básica. O leite foi aquecido à temperatura de 70°C e, em seguida, o ácido láctico (0,28% v/v) foi adicionado, mantendo-se agitação lenta e contínua até sua completa homogeneização. Posteriormente, esta mistura foi mantida em repouso por 30 minutos para precipitação da massa (coagulação ácida a quente). Em seguida, foi realizada a etapa de dessora com auxílio de peneiras de tecido e lavagem com água destilada esterilizada gelada até que a massa atingisse o valor de pH correspondente a 5,2. Finalmente, a massa foi prensada e refrigerada *overnight*. Após a pesagem dos ingredientes, foram adicionados à massa fresca triturada o sal fundente e o NaCl; a seguir, a mistura foi submetida a aquecimento (90°C) até completa fusão. Posteriormente, foram adicionados creme de leite e água, com manutenção da temperatura durante 5 minutos. O conservante sorbato de potássio foi utilizado na proporção

de 1g/Kg de produto, adicionado após a fusão do requeijão cremoso, quando o produto foi resfriado e a temperatura de 70°C foi atingida. As cepas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram ativadas em leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil), previamente esterilizado em autoclave (Fabbe Primar Industrial Ltda, Modelo 146, São Paulo, Brasil) (121°C/15 min), e posteriormente reconstituído a 12%, m/v) a 37°C/2 h. Foi preparada uma matriz láctea para cada micro-organismo probiótico testado. Os micro-organismos probióticos (*L. paracasei* PXN 37 e *B. coagulans* GBI-30 6086) foram inoculados, separadamente, na massa fundida, após o requeijão cremoso atingir a temperatura de 50°C, durante a etapa de resfriamento. Finalmente, realizou-se o envase do requeijão cremoso a quente utilizando-se potes plásticos com capacidade para 100 mL, previamente sanitizados com solução de hipoclorito de sódio 200 ppm. O valor médio do pH do produto final correspondeu a 5,97 e este foi estocado à temperatura de 6°C por 45 dias.

ii. Suco de laranja

O suco de laranja foi preparado a partir de suco de laranja concentrado (70° Brix) pasteurizado, proveniente de uma empresa localizada no Estado de São Paulo. Para o preparo, o suco foi diluído com água destilada estéril para obtenção de 11°Brix. Após a diluição do suco concentrado, pasteurizou-se o suco à temperatura de 105°C durante 10 minutos em autoclave (Fabbe Primar Industrial Ltda, Modelo 146, São Paulo, Brazil), sendo, a seguir, resfriado em banho de gelo. Foi preparada uma matriz para cada micro-organismo probiótico testado. As cepas probióticas foram adicionadas (*L. paracasei* PXN 37 e *B. coagulans* GBI-30 6086), individualmente, às amostras de suco de laranja após resfriamento. Posteriormente, alíquotas do suco de laranja (200 mL) foram acondicionadas em frascos de vidro previamente esterilizados e mantidos à temperatura de 6°C por 7 dias (simulação da estocagem do suco de laranja pasteurizado refrigerado). O valor médio do pH do produto correspondeu a 4,15.

iii. Pão

Para o preparo do pão, foram utilizados como ingredientes farinha de trigo branca, fermento biológico seco, açúcar cristal, glúten, sal, óleo de soja e propionato de cálcio, os quais foram doados por empresa de panificação do estado de São Paulo. A formulação (m/m) utilizada consistiu em 55% de farinha de trigo branca, 3,8% de fermento biológico seco, 34,1% de água

estéril, 3,3% de açúcar cristal, 0,5% de glúten, 1,1% de sal iodado, 2,2% de óleo de soja e 0,15% de propionato de cálcio. Os ingredientes secos foram misturados primeiramente, exceto o açúcar e o fermento biológico, os quais foram homogeneizados em água e mantidos à 37°C/1h (formação da “esponja”, responsável pela textura, sabor e aroma característicos do produto final). Posteriormente, foram adicionados o óleo de soja e a “esponja” aos ingredientes secos e esses foram misturados manualmente até a obtenção de uma massa homogênea e solta. A massa do pão, por sua vez, foi inoculada somente com a cepa *B. coagulans* MTCC 5856, antes da etapa de forneamento do produto, para se obter melhor homogeneização do inóculo. Após a produção da massa, fez-se a moldagem dos pães e os mesmos foram colocados em estufa a 40°C/1h para fermentação e, a seguir, levados ao forno (Tron, Catanduva, Brazil) para serem assados (180°C/20 minutos). O pH médio dos pães foi de 5,71. Os pães foram acondicionados em sacos plásticos vedados e armazenados à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 7 dias.

2.3. Preparo das soluções simuladas do TGI estático

A solução gástrica para os testes estáticos consistiu de 6,2g NaCl/L; 2,2g KCl/L; 0,3g CaCl₂/L; 600U/ml de pepsina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 37,5U/ml de lipase (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O pH dessa solução variou entre 1,0 e 4,0. A correção dos valores de pH foi realizada com o emprego das soluções de HCl 1M e NaOH 1M.

2.4. Enumeração das cepas probióticas

A enumeração dos micro-organismos probióticos foi realizada conforme metodologia recomendada para cada cepa, de acordo com instruções das empresas fabricantes das culturas, com adaptações. Para *L. paracasei* PXN 37 utilizou-se o meio MRS Ágar (Merse, Campinas-SP) e incubação a 30°C/72h, em atmosfera de aerobiose. Para *B. coagulans* MTCC 5856, utilizou-se o meio formulado Ágar glicose extrato de levedura (GYEA – Extrato de levedura (Oxoid), D-glicose (Dinâmica), peptona (Acumedia, Lansing, USA) (5g.L⁻¹); fosfato de potássio monobásico (Dinâmica), fosfato de potássio dibásico (Dinâmica) (0,5g.L⁻¹), sulfato de magnésio (Dinâmica) (0,3g.L⁻¹); sulfato de manganês (Dinâmica) (0,01g.L⁻¹); NaCl (Dinâmica) (0,01g.L⁻¹); ágar bacteriológico (Inlab) (15g.L⁻¹); sulfato de zinco (Dinâmica) (1,6mg.L⁻¹); sulfato de cobalto 7H₂O (Dinâmica) (1,6mg.L⁻¹); sulfato de cobre 5H₂O (Dinâmica) (1,6mg.L⁻¹).

¹) e incubação a 37°C/72h em condições aeróbias, enquanto que para *B. coagulans* GBI-30 6086 utilizou-se meio formulado Ágar Glicose Extrato de Levedura (BC- Extrato de levedura (Oxoid) (5g.L⁻¹), D-glicose (Dinâmica) (5g.L⁻¹), peptona (Acumedia, Lansing, USA) (5g.L⁻¹); fosfato de potássio monobásico (Dinâmica) (0,5g.L⁻¹), fosfato de potássio dibásico (Dinâmica) (0,5g.L⁻¹), sulfato de magnésio (Dinâmica) (0,3g.L⁻¹); ágar bacteriológico (Inlab) (15g.L⁻¹); solução de minerais (1ml.L⁻¹ - sulfato de manganês (Dinâmica) (16mg.mL⁻¹); NaCl (Dinâmica) (10mg.mL⁻¹); sulfato de zinco (Dinâmica) (1,6mg.mL⁻¹); sulfato de cobalto 7H₂O (Dinâmica) (1,6mg.mL⁻¹); sulfato de cobre 5H₂O (1,6mg.mL⁻¹); sulfato de ferro 7H₂O (Dinâmica) (18mg.mL⁻¹) e incubação a 40°C/48h em condições aeróbias. Para a enumeração de esporos das cepas de *Bacillus* foi utilizado um choque térmico realizado a 80°C/10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo. Os resultados das contagens dos micro-organismos probióticos foram expressos em UFC ou esporos/g ou mL. Os fatores Bias e Exatidão foram calculados para averiguar o quão adequado estão os valores observados em relação aos preditos pelo modelo utilizado.

2.5. Modelagem matemática em sistema estático do TGI

2.5.1. Estimativa dos parâmetros de inativação dos micro-organismos probióticos no sistema estático do TGI.

O comportamento dos micro-organismos probióticos foram analisados em condições estáticas do TGI. Após inoculação das matrizes alimentares, foi preparada uma amostra de 25g de cada alimento para cada 100mL de solução gástrica, respeitando-se a proporção de 1:5 (m/v), com o intuito de simular um processo de digestão real.

Para cada alimento, adicionado de uma única cepa probiótica, foram realizados diferentes ensaios empregando-se solução gástrica com pH 1; 2; 3 e 4. O mesmo foi realizado para um controle da cepa pura com solução gástrica, para avaliar da melhor maneira a influência da matriz nos resultados. Os esporos de *Bacillus* avaliados foram expostos somente à pH 1 e 1,5, visto que essas cepas possuem maior resistência as condições do TGI do que em bactérias ácido-láticas, não sendo necessária a avaliação de seu comportamento em pH gástrico com valores acima de 2. Todas as amostras foram mantidas a 37°C sob agitação (150rpm; Schaker, marca New Brunswick, modelo G24, NJ, USA) durante diferentes intervalos de tempo.

O tempo de exposição das cepas inseridas nas matrizes estudadas, juntamente com a solução gástrica simulada, variou de acordo com o valor do pH, sendo de 60h para pH1, 150 horas para pH 2 e 3, e 220 horas para pH 4, para os experimentos realizados com *L. paracasei* PXN 37. Os esporos de *Bacillus* foram expostos a pH 1 por 30 minutos e pH 1,5 por 40 min.

Durante o tempo de digestão avaliado, para cada condição avaliada, foram coletados no mínimo oito pontos (amostras) para construção das curvas de sobrevivência dos microorganismos probióticos. Essas alíquotas foram diluídas e semeadas nos meios de cultivo seletivos, conforme descrito no item 2.4. Estes experimentos foram realizados como duplicatas genuínas.

2.5.2. Modelo matemático primário

O modelo de inativação Weibull com cauda (log linear com cauda) de primeira ordem (Equação 1) foi utilizado para o ajuste dos dados provenientes das contagens (UFC/g ou mL) de *L. paracasei* PXN 37 obtidas *versus* tempo de exposição às condições gástricas simuladas do TGI. Curvas de inativação e valores de taxa de inativação foram obtidas, separadamente, para cada valor de pH e cada matriz alimentar em que foi inserido, estimados através da utilização do suplemento GInaFiT[®], um add-in do Excel[®] (Geeraerd et al, 2005). Os parâmetros coeficiente de determinação (R²) e a raiz do erro quadrático médio (RMSE - Root Mean of Square Error) foram utilizados para se avaliar a qualidade do ajuste. Além dos parâmetros obtidos, representações gráficas, apresentando os resultados obtidos experimentalmente e os estimados pelos modelos matemáticos, possibilitaram a averiguação da qualidade do ajuste. Somente os ajustes com R² > 0,90 foram considerados. Não foi realizada modelagem preditiva para os esporos de *Bacillus* probióticos, visto que a população dos mesmos permaneceu estável entre início e final da digestão nos pH avaliados nas condições estáticas. A Equação 1 representa o modelo primário de inativação utilizado.

$$\log \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (1)$$

$$\log \frac{N_t}{N_0} = (N_0 - N_{res}) \cdot 10^{\left(- \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \right)} + N_{res} \quad (2)$$

Equação 1: Onde N_t/N_0 representa taxa de redução decimal no tempo t , N_0 a população inicial microbiana, N_t a densidade populacional no tempo t , N_{res} a concentração residual do contaminante, δ é conhecido como o tempo necessário para se atingir a primeira redução decimal de uma população e p indica o padrão de curvatura. Quando $p > 1$, a curva assume um padrão convexo, e quando $p < 1$, padrão côncavo. No caso de $p = 1$, a curva descreve um padrão linear de primeira ordem (Mafart et al., 2002, Albert e Mafart, 2005).

2.5.3. Validação dos experimentos nas condições estáticas

Após o desenvolvimento de modelos preditivos com base nos dados experimentais, foi realizada a etapa de validação dos ensaios estáticos. Os experimentos como descrito no item 2.5.1. foram repetidos para a cepa probiótica *L. paracasei* PXN 37 pura e adicionadas ao requeijão cremoso e suco de laranja, expostas à solução gástrica utilizando faixa de pH nos valores de 1,5; 2,5 e 3,5. Os fatores Bias e Exatidão foram calculados através dos valores preditos e observados no experimento como descrito por Ross (Ross, 1996).

$$BIAS = \text{Log} (\sqrt{k_{max}} \text{ predito} \div \sqrt{k_{max}} \text{ observado})$$

2.5.4. Modelo matemático secundário

O efeito do pH sobre a taxa de inativação (k_{max}) foi estimado utilizando-se o modelo de Raíz Quadrada de Ratkowsky et al. (1982) (Equação 2). O modelo foi gerado através dos valores de taxa de inativação estimados em relação aos diferentes pH estudados nas diferentes matrizes, após ajuste do modelo Weibull com cauda aos dados de contagem das cepas de *L. paracasei* PXN 37 em função do tempo.

$$\sqrt{K_{max}} = b(pH - pH_0) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $\sqrt{K_{max}}$ é a raiz quadrada da taxa máxima de inativação, b é a inclinação da regressão linear, pH é o pH da solução gástrica e pH_0 é o pH conceitual mínimo para inativação microbiana.

2.6. Modelagem matemática em Sistema Dinâmico do TGI

2.6.1. Micro-organismos probióticos

A cepa probiótica *L. paracasei* PXN 37 foi inoculada na concentração de 10^7 a 10^8 log UFC/g ou mL no requeijão cremoso e no suco de laranja e avaliada em diferentes proporções dos alimentos em relação a solução gástrica (1:5 e 3:5).

2.6.2. Simulador do trato gastrintestinal

Os experimentos foram realizados em um Sistema Simulador de Digestão Dinâmica (Figura 1), com modificações, baseado nos sistemas dinâmicos citados por Alander (1999), Adouard (2015), Curto (2011); Helbig (20013), Manville (2005), Martinez (2011) e Vardakou (2011). O sistema foi composto por três vasilhames de vidro, mantidos em banho maria a 37°C, bombas peristálticas (Masterflex), pHmetro portáteis (Kasvi, Atuba, Curitiba, Brasil) e placas agitadoras (Kasvi, Atuba, Curitiba, Brasil).

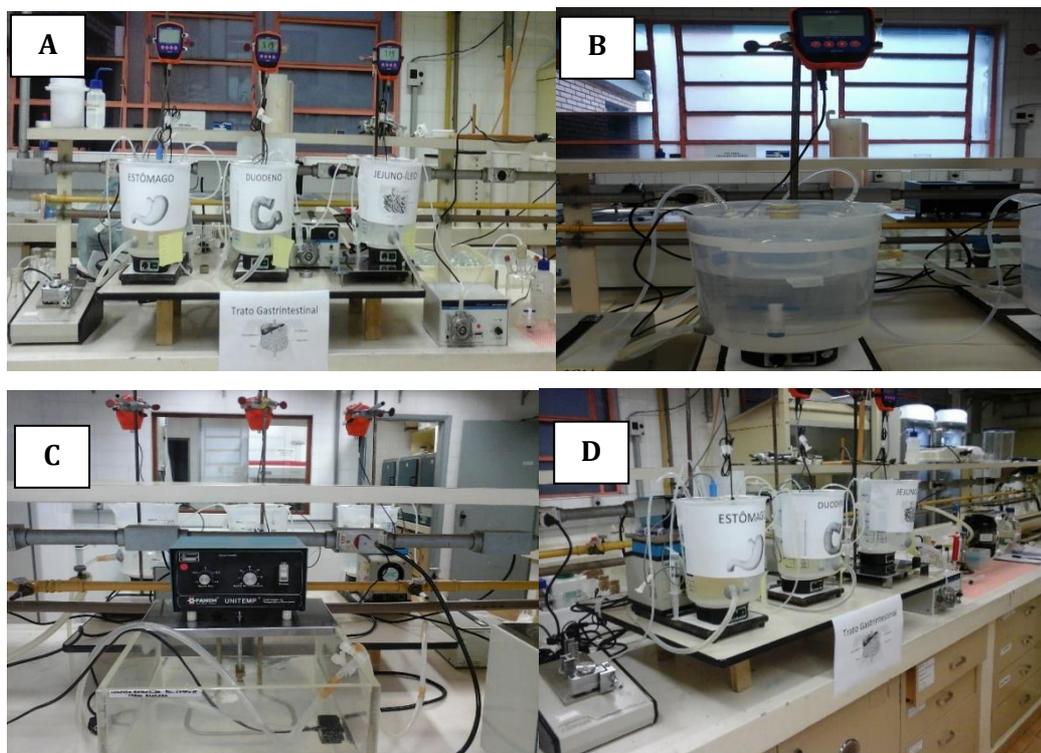


Figura 1. Sistema simulador do trato gastrintestinal dinâmico. (A) Parte frontal do sistema; (B) digestor individual para adição das soluções intestinal mais alimentos; (C) Visão posterior do sistema e (D) Visão lateral do sistema.

A assepsia do sistema foi realizada através da higienização das mangueiras empregando-se 100 ml (cada) de solução de Dodigen 1%, por duas vezes. Após essa etapa, o dispositivo foi enxaguado com bombeamento de água destilada esterilizada, cujo processo foi repetido por duas vezes. Para a etapa de sanitização, foram aplicados 100 ml de ácido peracético a 0,3%, por duas vezes e, finalmente, o último enxágue foi realizado com utilização de água esterilizada, cujo processo também foi repetido duas vezes. Os biodigestores e demais materiais utilizados para análise foram autoclavados a 121°C/15 min. As análises foram realizadas em ambiente isolado, limpo e sanitizado com dodigen 1% e álcool 70%. As amostras dos pontos da digestão foram coletadas próximas ao bico de Bunsen.

As soluções simuladas gástricas e entéricas foram preparadas de acordo com Minekus et al (2014), Martinez (2011) e Curto (2011) com adaptações. Dessa maneira, a solução gástrica simulada foi composta por Cloreto de Sódio (NaCl) 47,2mmol, Cloreto de Potássio (KCl) 6,9mmol, Hidrogeno Fosfato de Potássio (KH₂PO₄) 0,9mmol, Cloreto de Magnésio hexa-hidratado (MgCl₂(H₂O)₆) 0,1 mmol, Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) 25mmol, Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 0,3g/L, pepsina 600U/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e lipase 37,5U/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). As soluções duodenal e jejunal foram compostas por Cloreto de Sódio (NaCl) 38,4mmol, Cloreto de Potássio (KCl) 6,8mmol, Hidrogeno Fosfato de Potássio (KH₂PO₄) 0,64mmol, Cloreto de Magnésio hexa-hidratado (MgCl₂(H₂O)₆) 0,33 mmol, Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) 85mmol, Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 0,37g/L, pancreatina 0,9g/L (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e bile 6g/L (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

Os compartimentos que simulam o estômago, duodeno e jejuno foram preenchidos com 400ml de solução gástrica, 200ml de solução duodenal e 100ml de solução jejunal (proporção 1:5) e 200ml de solução gástrica, 100ml de solução duodenal e 50ml de solução jejunal (proporção 3:5), de acordo com o volume máximo que o digestor comportava em relação à proporção dos fluidos digestivos em contato com os alimentos testados. A cada 10 minutos, foi realizada a homogeneização dos fluidos simulados na presença dos alimentos através do emprego de uma barra magnética (previamente autoclavada) mantida em velocidade constante, simulando-se o movimento peristáltico *in vivo* do TGI.

A vazão de cada bomba peristáltica foi ajustada para cada matriz e proporção. O sistema digestor foi alimentado com uma vazão de 100ml/20min e a digestão foi simulada em um processo dinâmico. O requeijão cremoso e o pão foram diluídos na proporção de 1:10 com

intenção de facilitar a passagem do alimento pelas mangueiras de polipropileno conectivas dos compartimentos do sistema dinâmico.

Os tempos de digestão e residência do alimento nos compartimentos com solução gástrica, duodenal e jejunal foram, respectivamente, de 90min/45min, 120min/60min e 120min/60min, respectivamente, sendo o tempo total do processo de digestão de cada matriz estabelecido em 5,5h. As soluções gástricas, duodenal e jejunal foram ajustadas, respectivamente, para valores de pH 2,0, 5,0 e 7,0, sendo a primeira mantida no intervalo de pH 2,0 a 3,0 após entrada completa do alimento. Os valores de pH das soluções adicionadas do alimento foram corrigidos manualmente utilizando-se soluções de HCl 1M e NaOH 1M.

Durante o processo de digestão simulado, um total de 8 pontos foram coletados a partir do homogeneizado dos alimentos em presença das soluções digestivas, em cada um dos compartimentos analisados. Essas amostras foram utilizadas para determinação da sobrevivência dos probióticos.

2.6.3. Modulagem matemática e Validação nas condições dinâmicas do TGI

Os dados gerados do comportamento do *L. paracasei* PXN 37 nas condições dinâmicas foram comparados e validados com dados da literatura (validação externa) (Clark, 1993; Lennard-Jones & Babouris, 1965; Lennard-Jones, 1968) para condições similares do TGI, utilizando o modelo secundário de raiz quadrada gerado nos testes estáticos. Os fatores Bias e Exatidão não foram aplicados nessa etapa do trabalho.

2.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Skott-Knott (Granato et al., 2014, Nunes et al., 2015) e Teste T. O software estatístico utilizado foi o Assistat versão 7.5 (Campina Grande, Brazil) (Silva; Azevedo, 2002).

3. Resultados e Discussão

3.1. Viabilidade das cepas probióticas nas matrizes

Os resultados de viabilidade das cepas probióticas estudadas no sistema simulado do TGI estático estão indicadas na Tabela 1 e 2. Os esporos probióticos dos *Bacillus* foram utilizados na concentração de 6 log esporos/g ou mL. Já os *L. paracasei* PXN 37 foram inoculados na dosagem de 7-8log UFC/g ou mL.

Tabela 1: Viabilidade dos esporos probióticos de *Bacillus* no início (T₀) e no final (T_f) da fase gástrica simulada expostos a diferentes valores de pH e matrizes alimentar.

	Suco de Laranja		Requeijão cremoso		Pão	
	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade
	T ₀	T _f	T ₀	T _f	T ₀	T _f
pH 1*	5,07 ^a ±0,45	5,21 ^a ±1,00	5,63 ^a ±0,18	5,35 ^a ±0,30	5,11 ^a ±0,32	5,00 ^a ±0,70
pH 1,5**	5,42 ^a ±0,67	5,19 ^a ±0,94	5,58 ^a ±0,10	6,19 ^a ±0,33	4,90 ^a ±0,07	3,96 ^a ±0,79

*exposição por 30 min. **exposição por 40 min. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as diferentes condições de pH em uma mesma matriz no início ou final da digestão gástrica, pelo Teste T.

As populações de esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 diminuíram menos de 1 ciclo log e mantiveram estáveis (p>0,05) ao final da digestão gástrica simulada nos valores de pH estudados no suco e no requeijão cremoso (Tabela 1). Nas amostras de de pão, as populações de *B. coagulans* MTCC 5856 no tempo inicial da digestão já apresentavam redução de aproximadamente 1 ciclo log após a etapa de forneamento da matriz. Posteriormente, houve, a redução de mais 1 ciclo log nas amostras submetidas ao pH 1,5/40 min, apresentando contagens de 3,96±0,79 log esporos/g. Não foi realizado testes em valores de pH 2, 3 e 4 para os esporos de *Bacillus*, visto que o objetivo do trabalho avaliar o comportamento desses micro-organismos em condições de estresse mais intensas, devido a sua resistência intrínseca.

Os resultados expressos na Tabela 2 indicam a sensibilidade da cepa *L. paracasei* PXN 37 ao pH 1 nas 3 matrizes estudadas (p<0,05), não conseguindo manter viável sua população ao final do processo de digestão gástrica. O mesmo não foi encontrado para o meio com pH 2, 3 e

4, mesmo expostos por tempo prolongado (60 a 220 horas), mantendo concentrações acima de 6 log UFC/g ou mL do produto.

Tabela 2. Viabilidade de *L. paracasei* PXN 37 no início (T₀) e no final (T_f) da fase gástrica simulada expostos a diferentes valores de pH e matrizes alimentar.

	Suco de Laranja		Requeijão cremoso		Cepa Pura	
	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade
	T ₀	T _f	T ₀	T _f	T ₀	T _f
pH 1*	7,78 ^a ±0,52	1,26 ^b ±0,93	7,05 ^a ±0,05	4,04 ^b ±0,08	7,37 ^a ±0,01	0,77 ^b ±0,10
pH 2**	8,38 ^a ±0,25	6,54 ^a ±0,17	8,53 ^a ±0,34	7,77 ^a ±0,69	7,54 ^a ±0,48	7,34 ^a ±0,30
pH 3**	8,38 ^a ±0,72	7,31 ^a ±1,07	8,23 ^a ±0,39	8,27 ^a ±0,72	8,02 ^a ±0,08	6,76 ^a ±0,62
pH 4**	8,13 ^a ±0,03	7,37 ^a ±0,13	8,23 ^a ±0,43	7,24 ^a ±0,32	8,12 ^a ±0,52	6,76 ^a ±0,76

*exposição por até 60h. **exposição por até 220h. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as diferentes condições de pH em uma mesma matriz no início ou final da digestão gástrica, pelo Teste T.

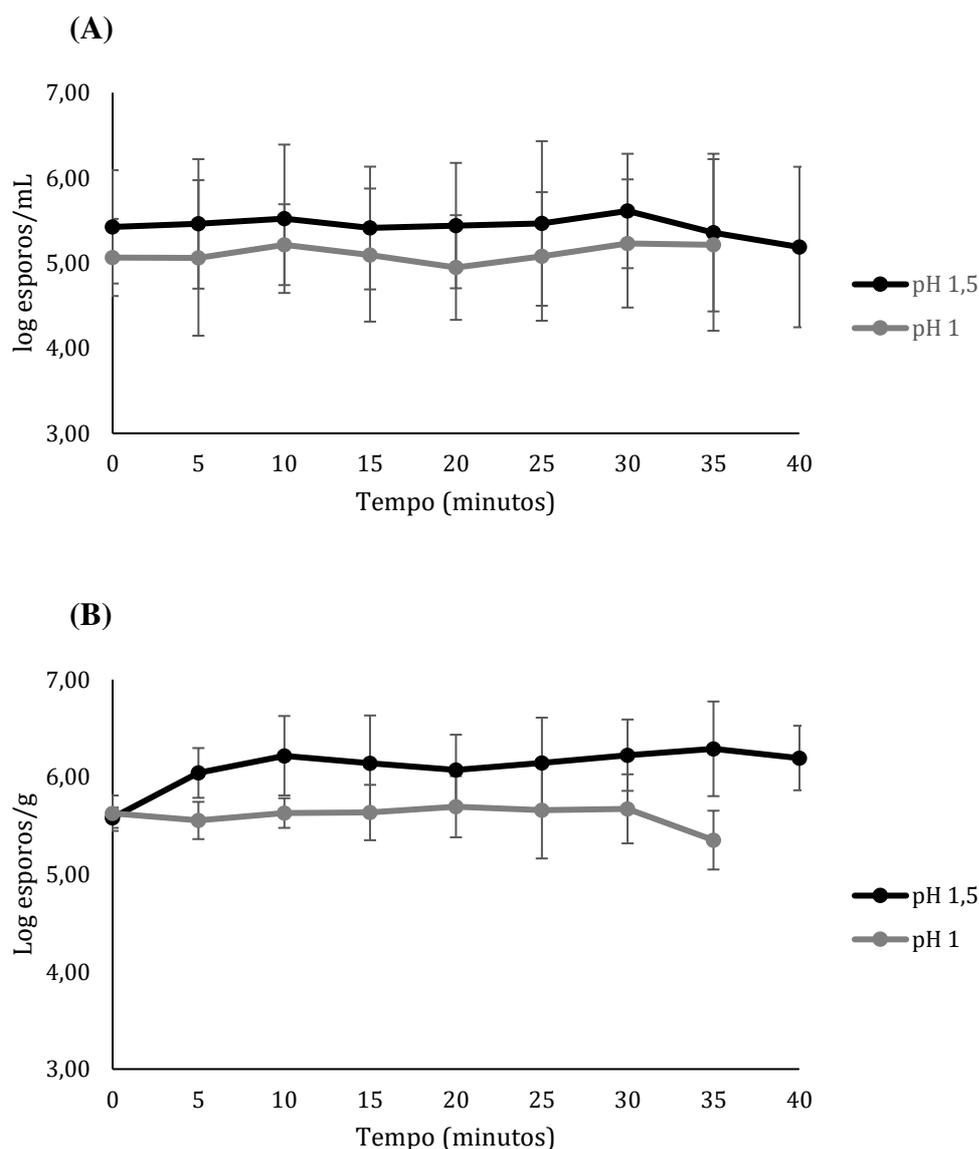
3.2. Comportamento dos esporos probióticos de *B. coagulans* GBI-30 6086 e *B. coagulans* MTCC 5856 durante o processo simulado de digestão estática

A contagem dos esporos dos *Bacillus* probióticos inoculados no pão, requeijão cremoso e suco de laranja, permaneceu estável durante o tempo de exposição à solução gástrica simulada em diferentes valores de pH (Figura 1). Esse comportamento indica a grande resistência dos esporos às condições do TGI no intervalo de tempo estudado, não havendo redução significativa (p>0,05) em nenhuma das matrizes probióticas estudadas que pudesse indicar inativação ou germinação dos esporos.

Dessa maneira, não foi possível gerar curvas de crescimento ou inativação para esse grupo de micro-organismos, e conseqüentemente parâmetros de modelo primário e modelo secundário para as condições estáticas do TGI.

A maior resistência dos esporos às condições de variação de pH e presença de enzimas digestivas permite que eles cheguem viáveis ao intestino delgado e sejam capazes de colonizá-

lo temporariamente para promover seus benefícios (Jesen et al., 2010). Os esporos são estruturas de dormência bacteriana, com resistência às condições ambientais desfavoráveis (pH, falta de nutrientes, etc) muito superior às células vegetativas. A presença de uma dupla camada externa, ausência de atividades biossintéticas e desidratação da célula permite que os esporos sejam extremamente resistentes ao calor, acidez, pressão, desidratação e irradiação (Madigan; Martinko e Parker, 2004). No momento em que esses esporos se encontram em um ambiente mais propício, o processo de germinação pode se iniciar e as células voltam ao seu estado vegetativo. Em estudo utilizando *Bacillus coagulans* GBI 30 no sistema dinâmico TIM 1, foi observada boa sobrevivência do probiótico esporulado (Maathuis et al., 2010), corroborando com os dados encontrados no presente estudo para a mesma cepa esporulada probiótica.



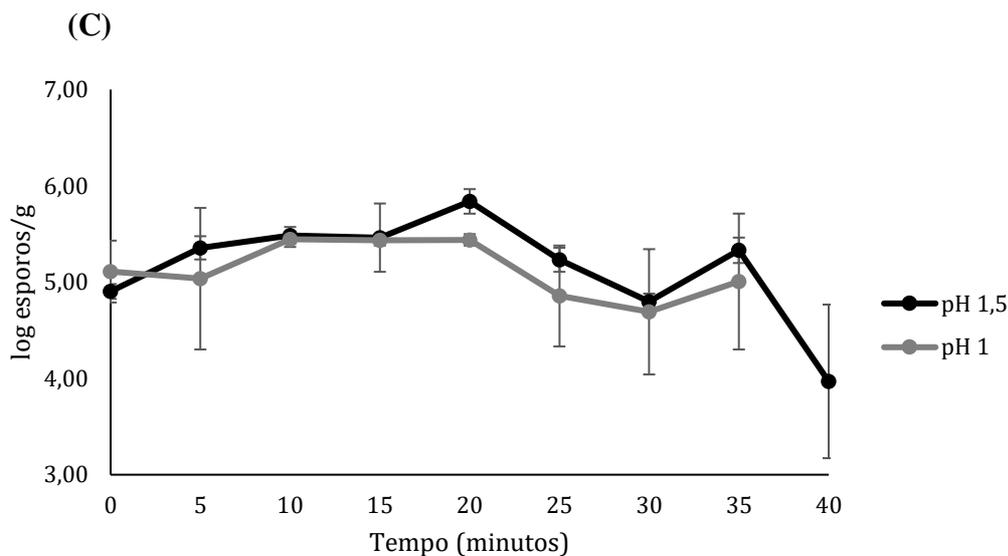


Figura 2. Comportamento dos esporos probióticos inoculados em diferentes matrizes alimentícias: (A) pão (*B. coagulans* MTCC 5856); (B) suco de laranja (*B. coagulans* GBI-30 6086) e (C) requeijão cremoso (*B. coagulans* GBI-30 6086) em solução gástrica em diferentes valores de pH em relação ao tempo de digestão.

A utilização de probióticos esporulados em diferentes tipos de alimentos teve a intenção de representar a influência da composição nutricional e estado físico dos alimentos na viabilidade da cepa probiótica durante o contato com as enzimas digestivas. Além disso, buscou-se a avaliação da viabilidade desses micro-organismos probióticos, através da análise de sobrevivência a processamentos distintos das matrizes com etapas estressantes à cepa em estudo e em seguida, o estresse causado pelos fluidos simulados da digestão. Esta abordagem seria uma representação mais próxima à realidade, quando se pensa em produção e consumo de alimentos probióticos. Mesmo sendo matrizes com composições diferentes, as mesmas tiveram o mesmo impacto de proteção aos esporos probióticos ao serem testados frente às condições simuladas do trato gastrintestinal, resultando em uma contagem final entre 5-7 log esporos/g ou mL.

3.3. Comportamento de *L. paracasei* PXN 37 durante o processo simulado de digestão estática

A cepa probiótica *L. paracasei*, utilizada nesse estudo, apresentou comportamento distinto dos esporos de *Bacillus* ao serem colocados em contato com os fluidos simulados da trato gastrointestinal durante o tempo (Tabela 2). Quando inoculado em suco de laranja, o *L. paracasei* não sobreviveu nas condições gástricas (pH=1), tendo suas contagens menores que o limite de quantificação do método e significativamente mais baixas ($p < 0,05$) que as encontradas para pH 2, 3 e 4. Esse fato pode ter ocorrido devido à alta acidez do meio em que o micro-organismo foi exposto, prejudicando assim, sua sobrevivência. Porém, a cepa foi capaz de se manter viável quando exposta a valores mais altos de pH (Tabela 2). O mesmo pode ser observado quando inoculada no requeijão cremoso e à solução gástrica puramente (Tabela 2).

As curvas de inativação, obtidas pelo software GInaFit[®] podem ser visualizadas nas Figuras 3 e 4. Para as condições de pH 2 (suco de laranja) e pH 3 (requeijão cremoso), as contagens encontradas não ajustaram a nenhum modelo preditivo, visto que houve pouca redução das populações de *L. paracasei* PXN 37 (Tabela 1), mantendo sua viabilidade acima de 6 log UFC/g ou mL, nessas condições e alimentos, porém com grande variabilidade ao longo da etapa gástrica da digestão simulada do TGI.

O processo de digestão estática empregado simula adequadamente as mudanças no pH no estômago, porém com o emprego de tempo acima do que seria uma digestão real, pois o estudo tem como intuito avaliar a cinética de sobrevivência dos micro-organismos probióticos em estudo. No pH 1, em ambas matrizes alimentar estudadas, as populações da cepa probiótica foram reduzidas (6,53 log UFC/mL no suco e 3,01 log UFC/g no requeijão cremoso) (Figura 3).

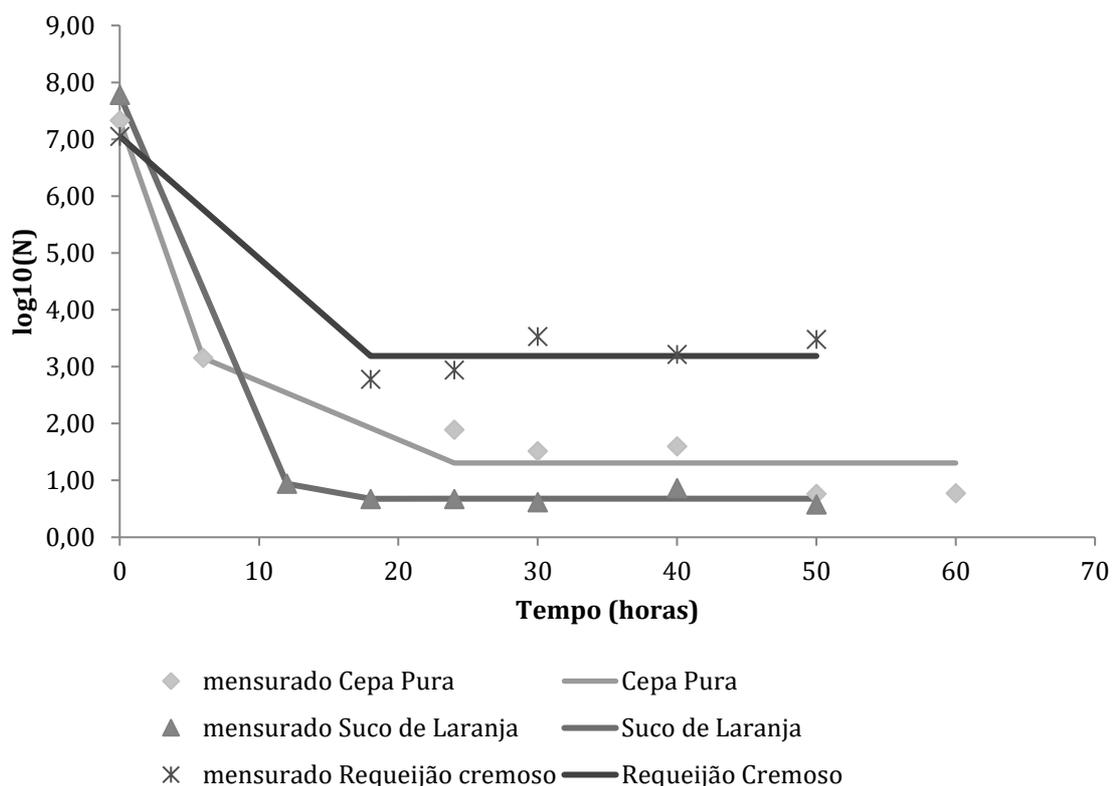


Figura 3. Cinética de inativação de *L. paracasei* PNX37 em solução gástrica pura e inoculados em suco de laranja e requeijão cremoso, pH 1.

Mesmo que as contagens da cepa probiótica em estudo apresentaram bom ajuste para os modelos de inativação Log Linear com cauda para as condições de pH 3 (suco de laranja) e pH 4 (requeijão cremoso), essas obtiveram pequena redução das suas populações (aproximadamente 1 log UFC), encontrando-se no final da digestão gástrica com concentrações acima de 7 log UFC/mL como indicado para conseguir seus efeitos benéficos à saúde ao colonizar o intestino (Figura 4). A quantidade e o tipo de matrizes alimentares ingeridas em uma refeição real tem grande influência no comportamento dos probióticos no TGI. Esses alimentos, devido sua capacidade tamponante, fazem com que o pH do estômago não diminua suficientemente para inativar a cepa probiótica (Ranadheera, Baines e Adams, 2010).

Tais ensaios, onde as cepas são expostas a diferentes valores de pH são de extrema valia, uma vez que o pH do estômago pode variar de acordo com a matriz que se ingere. A digestão dos alimentos também é influenciada pelos componentes dos alimentos, permitindo maior ou menor velocidade de esvaziamento gástrico (Mourão e Bressan, 2009), afetando diretamente o tempo de permanência das células probióticas em contato com os fluidos gástricos.

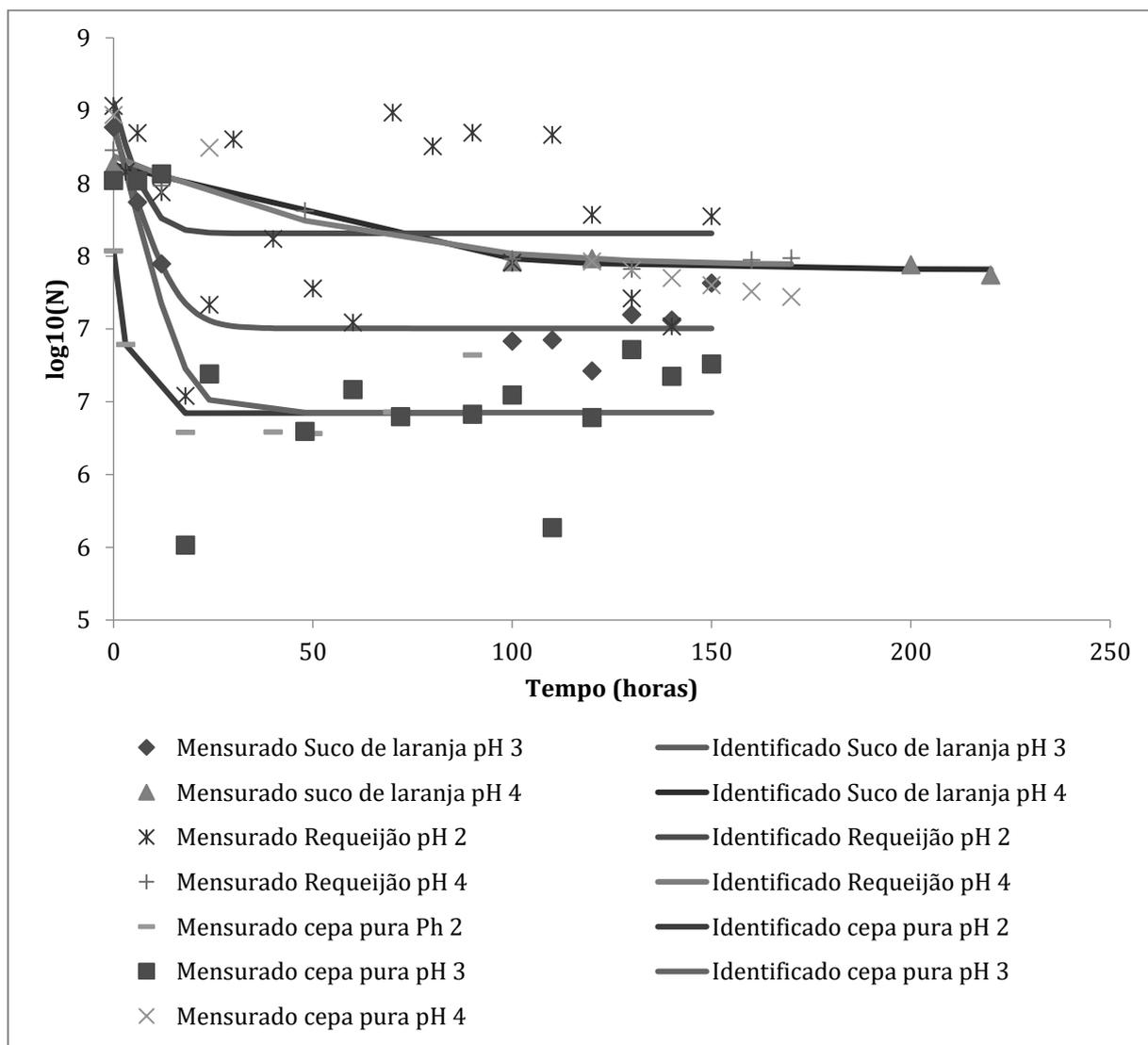


Figura 4. Cinética de inativação de *L. paracasei* PNX37 em solução gástrica pura, e adicionada de suco de laranja e requeijão cremoso em diferentes pH.

Os parâmetros cinéticos de inativação do *L. paracasei* no suco de laranja e no requeijão cremoso estão representados na Tabela 3 e foram estimados considerando o pH de cada matriz.

Tabela 3. Estimativa dos parâmetros cinéticos de inativação (média±desvio padrão) de *L. paracasei* PXN37 em solução gástrica pura e inoculados em diferentes matrizes e pH pelo modelo de Weibul com cauda.

pH	Suco de Laranja				Requeijão Cremoso				Cepa Pura			
	K_{max}	log10 (N_res)	log10 (N0)	R ² ajustado	K_{max}	log10 (N_res)	log10 (N0)	R ² ajustado	K_{max}	log10 (N_res)	log10 (N0)	R ² ajustado
1	1,38±0,05	0,68±0,05	7,78±0,11	0,9983	1,50±0,49	3,19±0,19	7,05±0,38	0,9442	1,61±0,28	1,31±0,23	7,33±0,51	0,9506
2	-	-	-	-	0,27±0,37	7,66±0,15	8,55±0,52	0,0629	0,61±0,33	6,42±0,10	7,54±0,23	0,7568
3	0,21±0,07	7,00±0,08	8,38±0,17	0,8773	-	-	-	-	0,25±0,12	6,43±0,17	8,41±0,47	0,5042
4	0,03±0,01	7,41±0,03	8,13±0,04	0,9799	0,03±0,01	7,44±0,05	8,19±0,06	0,9543	0,02±0,01	7,03±0,70	8,47±0,20	0,7912

• - não examinada.

O perfil de pH do procedimento experimental neste estudo correspondeu a uma situação real. A passagem intacta de micro-organismos probióticos pelo estômago é de extrema importância, visto que sua viabilidade ao chegar no intestino é pré-requisito para promoção dos benefícios à saúde. No presente estudo, a cepa probiótica apresentou populações baixas (<1 ciclo log UFC/mL) no pH 1. Porém tem boa viabilidade nos outros valores de pH estudados, simulados para a fase gástrica (pH 2, 3 e 4), os quais se aproximam mais dos valores reais do ambiente gástrico. Comportamento semelhante à cepa em estudo foi avaliado por um estudo com os patógenos *Salmonella*, *Escherchia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* em diferentes valores de pH da solução gástrica em que houve inativação dos mesmos ao longo do tempo (250min) (Koseki, Mizuno e Sotone, 2011) em valores de pH mais baixos. Outro estudo realizado com a espécie *L. paracasei*, avaliou a presença de suas populações em pH ácidos com a proteção contra colonização de micro-organismos patogênicos, principalmente *Helicobacter pylori*, ao aderirem à mucosa gástrica competindo sítios e nutrientes (Lesbros-Pantoflickova, Corthésy-Theulaz e Blum, 2007), o que abre a possibilidade dessa cepa ter potencial probiótico para saúde gástrica.

A geração do modelo secundário para a taxa de inativação (k_{max}) foi realizada com sucesso utilizando um modelo de raiz quadrada do pH e k_{max} (Ratkowsky et al., 1982), que se encontra na equação abaixo.

$$y = \sqrt{k_{max}} = -037 * (pH - 4,34) \text{ (Equação 2), onde o pH max} = 4,34.$$

Os parâmetros cinéticos são diretamente dependentes dos fatores ambientais, como temperatura, pH e atividade de água, os quais são os mais importantes para a cinética de inativação ou multiplicação de micro-organismo (Miller et al., 2004). A influência do pH sobre o parâmetro cinético de inativação (K_{max}) está representado na Figura 5.

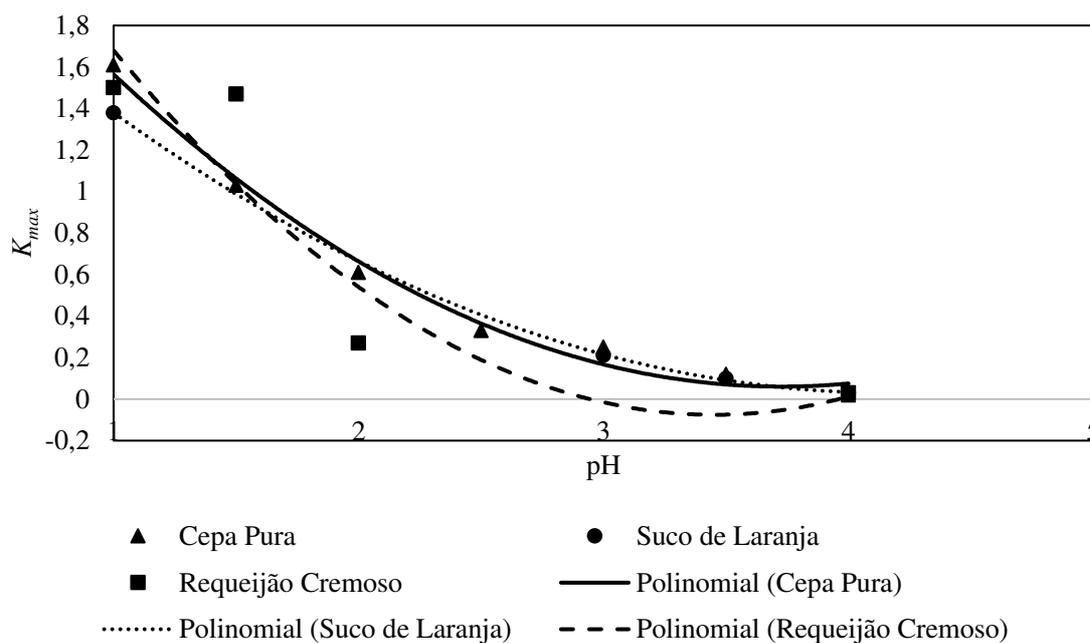


Figura 4. Efeito do pH na taxa máxima de inativação (K_{max}) de *L. paracasei* PXN 37 nos fluidos simulado gástrico.

A cinética de inativação da cepa probiótica em cada matriz alimentar foi evidentemente dependente do pH, uma vez que um pH mais baixo resultou numa inativação mais rápida. As relações entre o pH e a K_{max} foram polinômiais, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,98 para cada matriz (Figura 5). No presente estudo, os modelos de taxa de inativação foram descritos avaliando-se apenas o parâmetro de pH, mas outros fatores como níveis de gordura e concentrações de sal/açúcar da matriz probiótica poderiam ser utilizados como parâmetros combinados com o modelo de inativação, possibilitando avaliar também a interferência do alimento na sobrevivência da cepa durante a digestão (Koseki, Mizumo e Sotome, 2010).

3.4. Validação no Sistema Simulado do TGI estático

A validação da capacidade de sobrevivência de *L. paracasei* PXN37 nas matrizes estudadas foi realizada com valores de pH intermediários aos valores propostos experimentalmente (Tabela 3). O desempenho do modelo aplicado foi avaliado usando os fatores de precisão Bias e Exatidão.

Tabela 3. Testes de validação dos modelos preditivos na viabilidade do *L. paracasei* PXN 37 nas condições gástricas.

Suco de Laranja		
pH	K _{max}	
	Predito ^a	Observado ^b
3,5	0,10	0,10
Requeijão Cremoso		
pH	K _{max}	
	Predito ^a	Observado ^b
1,5	1,53	1,50
Cepa pura		
pH	K _{max}	
	Predito ^a	Observado ^b
1,5	1,10	1,03
2,5	0,46	0,33
3,5	0,10	0,12

^a valores preditos pelo modelo / ^b valores experimentais

O fator Bias, para as condições gástricas testadas, indicou predições com um bom nível de confiança, mantendo valores próximos a 1,0 (1,05 -cepa pura; 0,81- suco de laranja e 1,06 – requeijão cremoso). Os valores encontrados para o fator de precisão Exatidão foram: 1,76 – cepa pura; 1,59- suco de laranja e 2,67 – requeijão cremoso).

3.5. Modelagem Preditiva no Sistema Simulado do TGI Dinâmico

3.5.1. Viabilidade da cepa probiótica no sistema dinâmico

O comportamento de *L. paracasei* PXN 37 no suco de laranja e no requeijão cremoso na fase gástrica do sistema dinâmico foi simulada e sua viabilidade está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Viabilidade da cepa *L. paracasei* PXN 37 inoculadas em diferentes matrizes alimentar em função das proporções utilizadas, no início e final da etapa da digestão gástrica dinâmica.

Proporções	Suco de Laranja		Requeijão cremoso	
	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade	Viabilidade
	T ₀	T _f	T ₀	T _f
1:5	6,89 ^a ±0,12	6,42 ^a ±0,30	7,45 ^a ±0,27	6,80 ^a ±0,21
3:5	7,68 ^a ±0,23	7,37 ^a ±0,26	7,41 ^a ±0,09	7,11 ^a ±0,11

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes proporções de alimentos em relação a solução gástrica simuladas, no início ou final da digestão gástrica, pelo Teste T.

A digestão contínua do suco de laranja e requeijão cremoso inoculados com *L. paracasei* PXN 37, em diferentes quantidades, teve a intenção de validar os dados representativos do comportamento dos probióticos em condições mais próximas da realidade e dentro da faixa de pH estudada para solução gástrica (pH 2-3). A quantidade de alimento probiótico “ingerido” pode ser diretamente correlacionada com a sua sobrevivência dentro do sistema dinâmico. Neste estudo, durante a fase gástrica, não houve diferença significativa entre as contagens das diferentes proporções de alimentos em relação a solução gástrica ($p > 0,05$) (Tabela 5) e as populações da cepa probiótica mantiveram acima de 6 log UFC/mL. O mesmo comportamento e viabilidade foi observado nas condições estáticas.

Por outro lado, as contagens de *L. paracasei* PXN 37 apresentaram reduções nas condições estudadas ao entrar em contato com aos fluidos entérico simulados durante o sistema dinâmico, com pH 5 e pH 7 (suco (1:5) – 6,42 log e suco (3:5) – 4,78 log; requeijão (1:5) – 6,80 log e requeijão (3:5) – 7,11 log UFC/g ou mL), indicando sua maior sensibilidade à essa fase, possivelmente devido a dificuldade de adaptação ao meio com mudança contínua de condições de pH.

As populações de *L. paracasei* PXN 37 inoculadas nas matrizes alimentares em diferentes proporções foram comparadas a dados da literatura (validação externa) com condições de pH gástrico semelhante ao estudado no sistema dinâmico e estão apresentadas nas Figuras 6, 7 e 8.

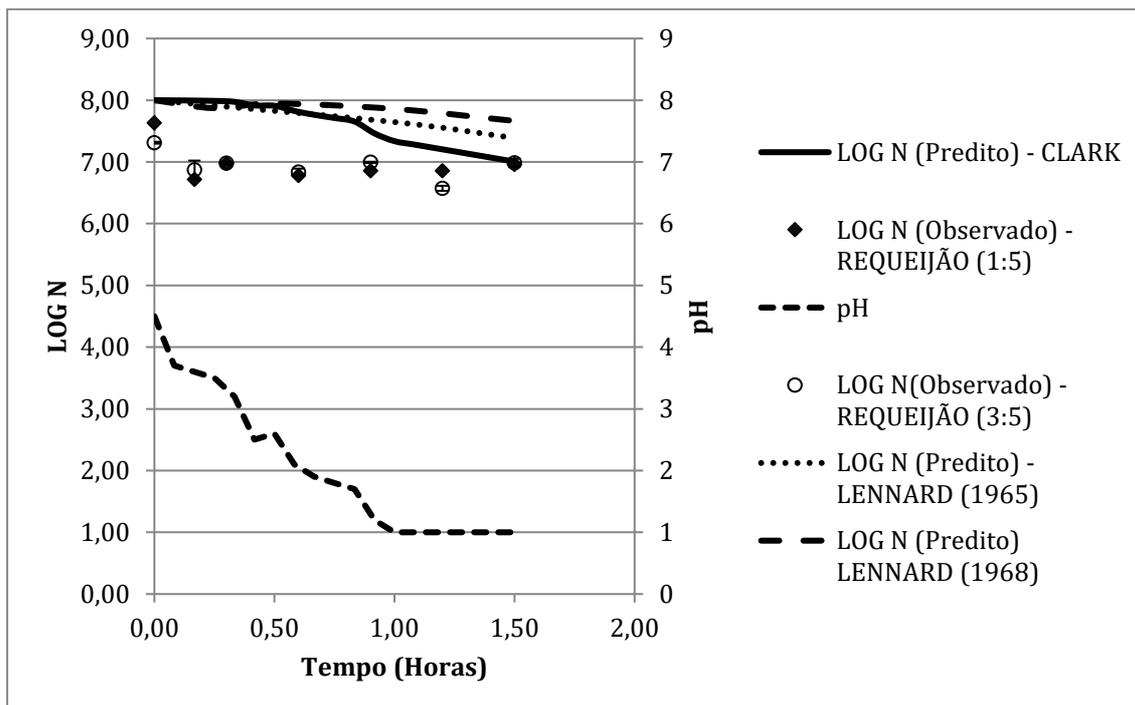


Figura 6: Avaliação do comportamento da cepa *L. paracasei* PXN 37 inoculadas em requeijão cremoso, na fase gástrica da digestão, comparada à dados da literatura, em sistema dinâmico simulado.

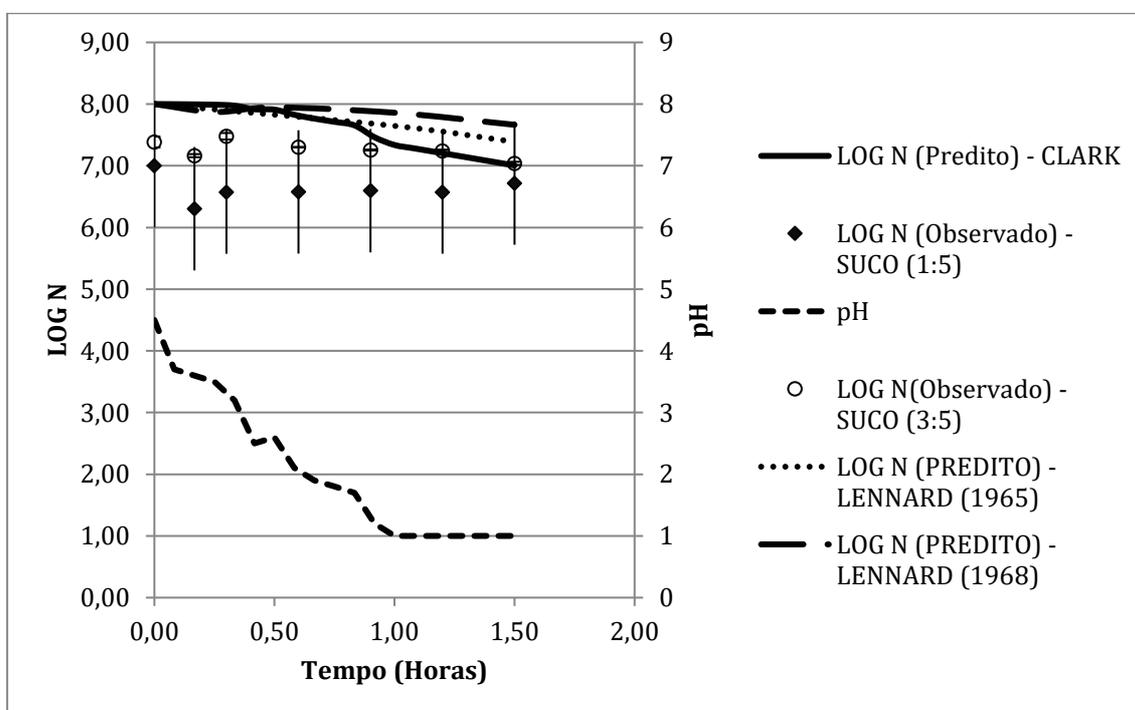


Figura 7. Avaliação do comportamento da cepa *L. paracasei* PXN 37 inoculadas em suco de laranja, na fase gástrica da digestão, comparada à dados da literatura, em sistema dinâmico simulado.

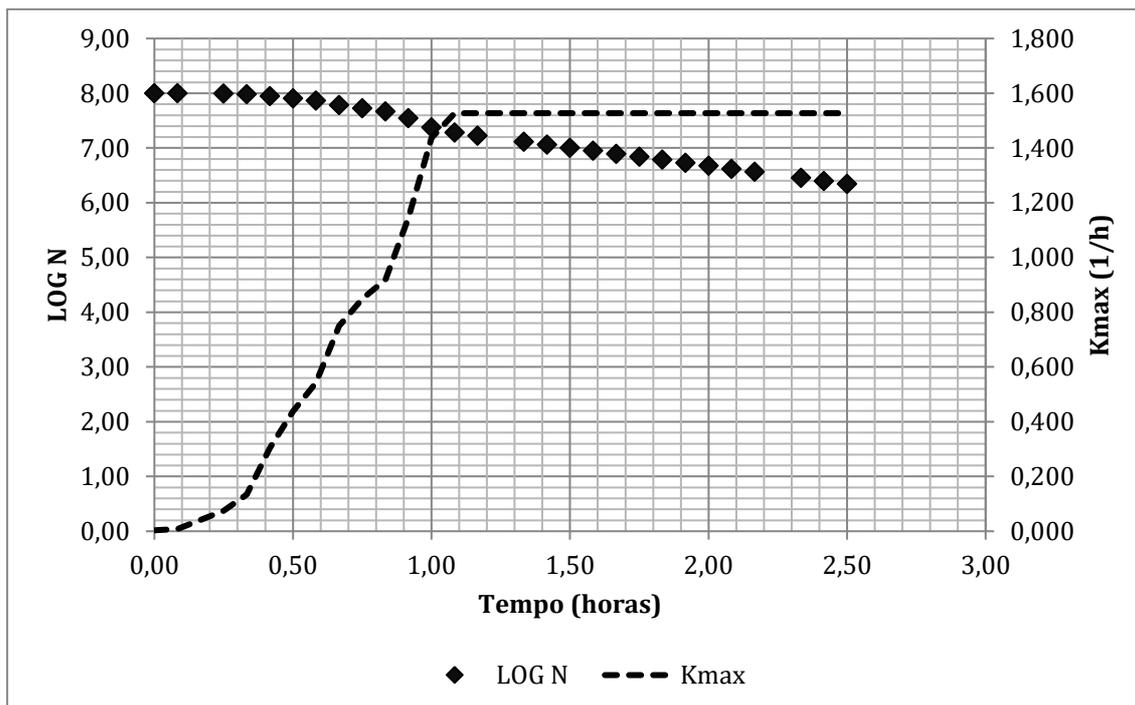


Figura 8. Número de sobreviventes ($\log_{10} N$) e taxa de inativação (hora elevado a -1) calculada utilizando dados da literatura no modelo secundário nas condições estáticas pelo tempo de exposição ao pH gástrico.

4. Conclusão

Os modelos preditivos para avaliação do comportamento de probióticos são ferramentas importantes para selecionar cepas mais resistentes aos processos fisiológicos e tecnológicos, em diferentes matrizes alimentares. Assim como avaliar melhor condição de sobrevivência no TGI. Os esporos dos *Bacillus* probióticos mantiveram-se estáveis durante toda a digestão, mostrando uma boa resistência às soluções do trato gastrointestinal, não gerando modelo preditivo. O *L.paracasei* PXN 37 apresentou cinética de inativação com bom ajuste do modelo ($R^2 > 0,90$) no pH 1 no suco de laranja, no requeijão cremoso e quando colocado puramente direto na solução gástrica, onde não manteve as concentrações de células viáveis acima de 6 log UFC/g em ambos alimentos estudados. Nas outras condições de pH avaliados (pH 2-4), as reduções nas populações da cepa probiótica não prejudicaram sua viabilidade ao final da digestão gástrica, apresentando contagens mais altas (> 6 log UFC/g ou mL). Os dados gerados por modelos matemáticos possibilitam a triagem de cepas adequadas ao melhor ajuste da dose, o emprego de diferentes cepas probióticas pela indústria de alimentos, identificação das condições que inibem/retardam o seu crescimento e averiguar os limitantes para a vida de

prateleira dos alimentos nos quais as cepas foram inseridas. Assim, os resultados advindos dos ensaios propiciam economia de tempo e redução da necessidade da realização de testes *in vitro*, que oneram a sua aplicação.

Agradecimentos

Financiamento: Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) mediante a concessão da bolsa de estudos à M. B. Soares (Processo nº 2013/21544-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) aos projetos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos da FEA/UNICAMP.

5. Referências bibliográficas

- Adouard, N., Magne, L., Cattenoz, T., Guillemin, H., Foligné, B., Picque, D., & Bonnarme, P. (2015). Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract. *Food Microbiology*, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.002>
- Alander, M., Mättö, J., Kneifel, W., Johansson, M., Kögler, B., Crittenden, R., ... Saarela, M. (2001). Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 11, 817–825. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00100-5](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00100-5)
- Altieri, C., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Del Nobile, M.A., and Sinigaglia, M. (2008). Modeling the survival of starter lactic acid bacteria and *Bifidobacterium bifidum* in single and simultaneous cultures. *Food Microbiol.* 25, 729–734
- Alvarenga, V.O. (2008). Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana de açúcar. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Anjos, L.D. (2013). Modelos de crescimento de psicotróficos em diferentes temperaturas e pH. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Lavras.
- Babouris, N., & Fletcher, J. (1964). Effect of varying the size and frequency of meals', 118–120.
- Bressan, J. (2009). Influência de alimentos líquidos e Influence of liquid and solid foods on appetite control, 22(4), 537–547. <http://doi.org/dx.doi.org/10.1590/S1415-52732009000400009>
- Clark, G. W. B., Jamieson, I. R., Hinder, R. a., Polishuk, P. V., Demeester, T. R., Gupta, N., & Cheng, S. C. (1993). The relationship between gastric pH and the emptying of solid, semisolid and

liquid meals. *Neurogastroenterology & Motility*. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2982.1993.tb00131.x>

Cruz, A. G., Walter, E. H. M., Cadena, R. S., Faria, J. a. F., Bolini, H. M. a., Pinheiro, H. P., & Sant'Ana, A. S. (2010). Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. *Food Research International*, 43(5), 1444–1448. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.028>

Devlieghere, F., van Belle, B., and Debevere, J. (1999). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 57–70

Dorota, Z., Danuta, K. K., Antoni, G., & Motyl, I. (2014). Predictive modelling of *Lactobacillus casei* KN291 survival in fermented soy beverage. *Journal of Microbiology*, 52(2), 169–178. <http://doi.org/10.1007/s12275-014-3045-0>

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report a Joint FAO/WHO Working Group. London, Ontario, Canada. FAO/WHO, April 30 and May 1, 1-11.

Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F. (2005). GInaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 95-105.

Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Raso, J., and Condón, S. (2005). A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *J. Food Engineer.* 70, 7–14.

Granato, D., Calado, V.M.A., Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137 – 149, 2014.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(August 2014), 9. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Janssen, M., A. H. Geeraerd, F. Logist, Y. De Visscher, K. M. Vereecken, J. Debevere, F. Devlieghere, And J. F. Van Impe. (2006). Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. *International Journal of Food Microbiology*. v. 111, p. 59–72.

Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 216–22. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020>

Kilimann, K., Hartmann, C., Delgado, A., Vogel, R., and Ganzle, M. (2005). A fuzzy logic-based model for the multistage high-pressure inactivation of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG 1363. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 89–105.

Klu, Y. A. K., & Chen, J. (2015). Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *LWT - Food Science and Technology*, 62(2), 983–988. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>

Koseki, S., Mizuno, Y., & Sotome, I. (2011). Modeling of pathogen survival during simulated gastric digestion. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1021–1032. <http://doi.org/10.1128/AEM.02139-10>

Lennard-Jones, J. E., & Babouris, N. (1965). Effect of Different Foods on the Acidity of the Gastric Contents in Patients With Duodenal Ulcer. I. a Comparison Between Two “Therapeutic” Diets and Freely-Chosen Meals. *Gut*, 6, 113–117. Retrieved from [http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=14279713&retmode=ref&cmd=prlinks&nfile:///Users/fingolfn/Dropbox/Papers2/Articles/1965/LENNARD-JONES/Gut 1965 LENNARD-JONES.pdf&npapers2://publication/uuid/09143AD5-B5CB-4309-BA0C-1A](http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=14279713&retmode=ref&cmd=prlinks&nfile:///Users/fingolfn/Dropbox/Papers2/Articles/1965/LENNARD-JONES/Gut%201965%20LENNARD-JONES.pdf&npapers2://publication/uuid/09143AD5-B5CB-4309-BA0C-1A)

Lesbros-Pantoflickova, D., Corthésy-Theulaz, I., & Blum, A. L. (2007). Helicobacter pylori and probiotics. *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), 812S–8S. <http://doi.org/10.1093/ajph/101.3.412S> [pii]

Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J. R., Faulks, R. M., & John Wickham, M. S. (2011). Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiology*, 28(7), 1359–1366. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.007>

Maathuis, a. J. H., Keller, D., & Farmer, S. (2010). Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of Bacillus coagulans in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. *Beneficial Microbes*, 1(1), 31–36. <http://doi.org/10.3920/BM2009.0009>

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2004). Microbiologia de Brock. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 608.

Martinez, R. C. R., Aynaou, A. E., Albrecht, S., Schols, H. a., De Martinis, E. C. P., Zoetendal, E. G., Smidt, H. (2011). In vitro evaluation of gastrointestinal survival of Lactobacillus amylovorus DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb-12. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 152–158. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.010>

McMeekin, T. A.; Olley, J. N.; Ratkowsky, D. A. R. T.(2002). Predictive Microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 395-407.

McMeekin, T.; Bowman, J.; McQuestin, O.; Mellefont, L.; Ross, T.; Tamplin, M. (2008). The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 2-9.

Nunes, C. A., Alvarenga, V. O., de Souza Sant’Ana, A., Santos, J. S., & Granato, D. (2015). The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. *Food Research International*, 75, 270–280. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.011>

Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>

Ratkowsky, D. A.; Olley, J.; McMeekin, T. A.; Ball, A.(1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149, 1-5.

Rodrigo, D., Ruíz, P., Barbosa-Cánovas, G., Martínez, A., and Rodrigo, M. 2003. Kinetic model for the inactivation of Lactobacillus plantarum by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 223–229

Roy, D., Laval, U., & City, Q. (2011). 4.49 Probiotics, Intergration of Biotechnologies, 591–602. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00317-2>

Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 423–431. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010>

Silva, P. D. L. Da, Bezerra, M. D. F., Santos, K. M. O. Dos, & Correia, R. T. P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 452–457. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.055>

Silva, F.A.S., Azevedo, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 4, 71–78, 2002.

Slačanac, V., Lučan, M., Hardi, J., Habschied, K., Krstanović, V., & Gagula, G. (2013). Predictive modeling of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 growth in cow's, goat's and soy milk, 63(4), 220–227.

Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Morelli, L., Visconti, A., & Lavermicocca, P. (2006). In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 3042–3045. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.4.3042-3045.2006>

Vardakou, M., Mercuri, A., Barker, S. a., Craig, D. Q. M., Faulks, R. M., & Wickham, M. S. J. (2011). Achieving Antral Grinding Forces in Biorelevant In Vitro Models: Comparing the USP Dissolution Apparatus II and the Dynamic Gastric Model with Human In Vivo Data. *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 620–626. <http://doi.org/10.1208/s12249-011-9616-z>

Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., & Reinheimer, J. (2011). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2(MAY), 1–6. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00070>

Zwietering, M. H. et al. (1991). Modeling of bacterial growth as fuction of temperature. *Applied and Enviromental Microbiology*, 57, 1094-1101.

DISCUSSÃO GERAL

O crescimento do mercado de alimentos funcionais tem como destaque os alimentos contendo probióticos, os quais podem promover benefícios à saúde (ANVISA, 2016; Fuller, 1989; Klingberg & Budde, 2006). A determinação da sua viabilidade na matriz alimentar e no TGI é uma característica fundamental para escolha de cepas a serem utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos (Wang et al., 2009; Ranadheera, Baines, & Adams, 2010; Martinez et al., 2011). São citadas na literatura concentração de 10^6 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama (g) ou mililitro (mL) do produto ou da porção do produto para que promovam seus efeitos desejados (Silva et al., 2015).

A avaliação do comportamento das diferentes cepas adicionadas às diferentes matrizes alimentícias foi realizada com o objetivo de demonstrar a influência da composição química, característica física e tipo de processamento do alimento na sobrevivência de diferentes micro-organismos probióticos. A avaliação do tipo de cepa, pertencente ao mesmo gênero ou espécie de micro-organismo probiótico também tem a intenção de evidenciar a variabilidade de respostas das diferentes cepas probióticas em matrizes alimentares (Donkor, Henriksson, Vasiljevic, & Shah, 2006). Os alimentos funcionam como ótimo carreadores de micro-organismos probióticos, protegendo-os dos efeitos agressivos dos fluidos do TGI devido à sua capacidade tamponante. Além disso, os alimentos fornecem nutrientes para a multiplicação e a manutenção da viabilidade dos micro-organismos probióticos, quando comparados àqueles consumidos na forma de suplementos alimentares (Rad et al., 2012; Shori, 2015).

Todas as matrizes selecionadas e testadas no presente estudo – suco de laranja, requeijão cremoso e pão estão presentes no hábito alimentar brasileiro, sendo promissoras para a adição de micro-organismos probióticos, permitindo adquirir efeitos positivos à saúde por facilitar sua ingestão contínua e conseqüentemente, melhor colonização da microbiota humana.

Na primeira etapa do trabalho, diferentes cepas probióticas dos gêneros *Bacillus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* foram testadas quanto a sua resistência as condições simuladas do TGI na vida de prateleira dos alimentos citados acima. A partir desses resultados, foram selecionadas as cepas com melhor sobrevivência (uma BAL – *L. paracasei* PXN 37 e uma do gênero *Bacillus*- *B. coagulans* GBI-30 6086) nessas condições para posteriores estudos. Os *Bacillus* obtiveram altas taxas de sobrevivência (>80%), principalmente no requeijão cremoso e no suco de laranja, em que conseguiram manter suas populações acima de 7 log esporos/g ou mL do alimento. A cepa probiótica *L. paracasei* PXN 37 foi a que obteve melhor resitência de

forma geral na bebida e no queijo testados, apesar de apresentar maior sensibilidade quando comparada aos esporos probióticos.

Devido ao frequente consumo e ser um alimento tipicamente brasileiro e promissor para introdução de esporos probióticos, além de apresentar manufatura com etapas agressiva às BAL probióticas, o comportamento dos probióticos esporulados no requeijão cremoso foi avaliado.

De uma maneira geral, a variação de ciclos logarítmicos nas populações de esporos probióticos nas etapas de processamento do requeijão cremoso (pasteurização, coagulação e fusão) não foi relevante do ponto de vista microbiológico. Portanto suas populações foram maiores do que as encontradas para micro-organismos probióticos tradicionalmente utilizados (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) em produtos lácteos (Granato et al., 2010; Shori, 2015), indicando sua maior tolerância a condições deletérias para as células vegetativas. Esses probióticos (BAL) são vulneráveis a diferentes fatores que podem causar injúrias às suas células, incluindo elevados teores de sal, presença de oxigênio, altas temperaturas, baixo pH e mesmo a interação com as culturas *starters* na produção de queijos. Portanto, é necessário que a exposição desses micro-organismos a tais condições seja minimizada a fim de que sua viabilidade no produto final não seja prejudicada e, conseqüentemente, seus possíveis efeitos benéficos à saúde (Mansouripour et al., 2013).

Considerando o requeijão cremoso como matriz probiótica, a adição dos esporos probióticos no pré ou durante o tratamento térmico aplicado ao alimento se torna vantajoso, quando se pensa na vida útil do produto final. A fusão da massa é a etapa térmica mais agressiva do processamento do requeijão cremoso, porém não impactou negativamente na viabilidade do esporo probiótico, cujas populações foram altas e semelhantes àquelas adicionadas após a fusão da massa, na qual há a presença de condições estressantes mais brandas. O mesmo não foi observado para as populações de esporos adicionados no leite antes da sua pasteurização, as quais foram expostas a consecutivos tratamentos térmicos, e apresentaram contagens de células viáveis mais baixas que nos outros tratamentos. Portanto, a adição dos esporos na etapa de fusão do requeijão, melhora a homogeneização do inóculo, evita a recontaminação do produto final após passar pelos tratamentos térmicos e não prejudique sua viabilidade. De acordo com os nossos resultados, os esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 apresentaram maior resistência (térmica e ácida) em todas as etapas do processamento do requeijão cremoso avaliadas, sendo selecionado para a avaliação de seu comportamento durante a vida de prateleira (6°C por 45 dias) em diferentes formulações de requeijão cremoso.

As amostras de requeijão inoculadas com *B. coagulans* GBI-30 6086 na etapa de fusão da massa (RF) e após a etapa de fusão (RPF) apresentaram contagens de esporos mais elevadas e semelhantes entre si (7,33 log e 7,35 log UFC/g, respectivamente) ($p > 0,05$) até o final de seu período de armazenamento. O mesmo não foi observado para as populações de esporos da formulação RP as quais permaneceram em condições de estresse térmico por mais tempo, e apresentaram populações mais baixas. Ainda durante a vida de prateleira dos requeijões cremosos, análises para averiguar a qualidade química do alimento foram realizadas. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores correspondentes aos níveis de proteólise determinados entre as diferentes formulações do requeijão cremoso, no início e ao final da vida de prateleira do alimento. Esse dado reforça a semelhança entre as formulações quanto à composição e à boa estabilidade protéica, não havendo interferência do micro-organismo probiótico nesse parâmetro. Porém ao avaliar cada formulação separadamente, houve aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de proteólise observados nas formulações RP e RF ao final da estocagem, podendo indicar possível germinação dos esporos probióticos, os quais foram submetidos a um maior número de etapas de estresse (pasteurização, coagulação e fusão) em relação aos esporos inoculados no alimento à baixa temperatura (50°C), tal qual na formulação RPF. Quanto a composição dos ácidos graxos, todas as formulações apresentaram valores semelhantes entre elas.

No teste *in vivo*, utilizando *B. coagulans* GBI-30 6086 em requeijão cremoso e oferecido a ratos saudáveis, diferentes marcadores foram utilizados para averiguar a eficiência e segurança dessa cepa probiótica veiculada por esse alimento. O requeijão cremoso mostrou-se adequado como matriz carreadora de probióticos esporulados, uma vez que foram observadas populações elevadas e estáveis desses micro-organismos (grupo RPF e grupo RPAF), sem que prejudicasse a saúde dos animais. Na realidade, sabe-se que o queijo pode ser considerado um meio eficiente para a veiculação de bactérias probióticas uma vez que, além de possuírem teores relativamente elevados de lipídios, as suas proteínas podem proteger os micro-organismos de interesse contra a acidez do estômago, favorecendo sua sobrevivência ao longo do TGI (Cruz, Buriti, de Souza, Faria, & Isay Saad, 2009; Lollo et al., 2015).

Os resultados obtidos a partir da análise bioquímica, hematológica e imune encontram-se dentro dos valores de referência e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diversos grupos estudados. Os níveis de proteínas de estresse testadas (HSPs) mostraram-se conservadas nos tecidos animais, quando comparadas entre os animais do grupo controle e os animais que consumiram os diferentes tipos de amostras de requeijão probiótico, indicando a

existência de equilíbrio na homeostase do organismo dos animais. As HSPs podem ser úteis para avaliar o efeito de probióticos, os quais são conhecidos por estimularem o sistema imune e controlarem o processo inflamatório, conseqüentemente diminuindo o estresse oxidativo mediado por citocinas (Coppola & Turnes, 2004; Taverniti & Guglielmetti, 2011)

Mais recentemente, tem sido investigada a sobrevivência de cepas probióticas em alimentos, aplicando a microbiologia preditiva afim de se determinar o tempo de vida de prateleira dos mesmos (Dorota et al., 2014; Slačanac et al., 2013). Porém ainda não há relatos da literatura sobre o comportamento de micro-organismos probióticos quando submetidos a condições similares do TGI usando modelos preditivos. Os dados gerados por modelos matemáticos possibilitam a triagem de cepas adequadas ao melhor ajuste da dose, o emprego de diferentes cepas probióticas pela indústria de alimentos, identificação das condições que inibem/retardam o seu crescimento e averiguar os limitantes para a vida de prateleira dos alimentos nos quais as cepas foram inseridas. Assim, os resultados advindos dos ensaios propiciam economia de tempo e redução da necessidade da realização de testes *in vitro*, que oneram a sua aplicação.

A contagem dos esporos dos *Bacillus* probióticos inoculados no pão, requeijão cremoso e suco de laranja, permaneceu estável durante o tempo de exposição à solução gástrica simulada em diferentes valores de pH e dessa maneira, não permitiu gerar modelos cinéticos de sua sobrevivência. Esse comportamento indica a grande resistência dos esporos às condições do TGI e no intervalo de tempo estudado, não havendo redução significativa que pudesse indicar inativação ou germinação dos esporos.

Por outro lado, o *L. paracasei* PXN 37, quando inoculado em suco de laranja e no requeijão cremoso, não sobreviveu nas condições gástricas (pH=1), tendo suas contagens menores que o limite de quantificação do método. O primeiro fato pode ter ocorrido devido à alta acidez do meio em que o micro-organismo foi exposto, prejudicando assim, sua sobrevivência. Porém, a cepa foi capaz de se manter viável quando exposta a valores mais altos de pH.

Mesmo que as contagens da cepa probiótica em estudo apresentaram bom ajuste para os modelos de inativação Log Linear com cauda para as condições de pH 3 (suco de laranja) e pH 4 (requeijão cremoso), essas obtiveram pequena redução das suas populações (aproximadamente 1 log UFC), encontrando-se no final da digestão gástrica com concentrações acima de 7 log UFC/mL como indicado para conseguir seus efeitos benéficos à saúde ao colonizar o intestino

Tais ensaios, onde as cepas são expostas a diferentes valores de pH são de extrema valia, uma vez que o pH do estômago pode variar de acordo com a matriz que se ingere. A digestão dos alimentos também é influenciada pelos componentes dos alimentos, permitindo maior ou menor velocidade de esvaziamento gástrico (Mourão e Bressan, 2009), afetando diretamente o tempo de permanência das células probióticas em contato com os fluidos gástricos. Dessa maneira, a passagem intacta de micro-organismos probióticos pelo estômago é de extrema importância, visto que sua viabilidade ao chegar no intestino é pré-requisito para promoção dos benefícios à saúde.

Dessa maneira, a utilização de esporos com propriedades probióticas apresenta-se, portanto, como alternativa promissora em diversos alimentos, dada sua resistência a processos subletais e letais, como desidratação, pasteurização, cocção, meio ácido, irradiação, entre outros, além de serem mais tolerantes às condições do TGI, em relação aos micro-organismos probióticos tradicionais (Cutting, 2011).

CONCLUSÃO GERAL

A partir dessa pesquisa foram obtidas as seguintes conclusões:

- ❖ Os probióticos esporulados possuem um grande potencial de aplicação na indústria alimentícia, visto que apresentam elevada resistência a processos tecnológicos e mecanismos fisiológicos do organismo, os quais seriam letais para as BAL.
- ❖ A sobrevivência das cepas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estudadas, frente aos fluidos do TGI, apresentou maiores reduções de suas contagens ao final do período de armazenamento do suco de laranja, requeijão cremoso e pão, quando comparadas às reduções dos esporos de *Bacillus*.
- ❖ Os esporos probióticos de *Bacillus* exibiram percentual de sobrevivência acima de 80% quando expostos as condições do TGI ao final da vida de prateleira dos alimentos testados, obtendo contagens acima de 6 log UFC/g ou mL do produto).
- ❖ Os esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 apresentaram boa resistência térmica durante todas as etapas do processamento do requeijão cremoso, exibindo populações acima de 6 log esporos/g ao longo da vida de prateleira do produto (45 dias a 6°C) e sem alterações de indicadores químicos de deterioração.
- ❖ A adição dos esporos de *Bacillus* probióticos na etapa de fusão do requeijão cremoso (90°/5min) mostrou-se a mais apropriada, facilitando o processo tecnológico, mantendo boa viabilidade das cepas probióticas e evitando a recontaminação do produto final.
- ❖ O consumo por 14 dias de requeijão cremoso adicionados de esporos de *B. coagulans* GBI-30 6086 por ratos Wistar não afetou a homeostase metabólica dos animais estudados, sem alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e moleculares (estresse e antioxidante), indicando que esporos probióticos em estudos são seguros.
- ❖ Ao utilizar a modelagem preditiva como ferramenta para analisar o comportamento das cepas probióticas mais resistentes (*B. coagulans* GBI-30 6086, *B. coagulans* MTCC 5856 e *L. paracasei* PXN 37) da primeira etapa desse estudo, nas condições estáticas de TGI, os esporos dos *Bacillus* probióticos mantiveram-se estáveis durante toda a digestão, mostrando uma boa resistência às soluções do trato gastrointestinal, não gerando modelo matemático.
- ❖ O uso de modelos preditivos se mostrou eficiente para a avaliação dos parâmetros de inativação para *L.paracasei* PXN 37 significativa no pH 1, onde apresentou populações de células viáveis abaixo de 1 log UFC/mL ou g no suco de laranja e no requeijão cremoso.

REFERÊNCIAS GERAIS

- Abriouel, H., Franz, C.M. a P., Ben Omar, N., Gálvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 201–32. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA (2016). Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.-FAO/WHO (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 34. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf
- Fuller, A.R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378. doi:10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x
- Collado, M.C., Sanz, Y., 2006. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *J. Microbiol. Methods* 66, 560–3. doi:10.1016/j.mimet.2006.01.007
- Coppola, M.D.M., Turnes, C.G., 2004. Probióticos e resposta imune 1297–1303.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214–20. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Donkor ON, Henriksson a., Vasiljevic T, Shah NP (2006) Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int Dairy J* 16:1181–1189. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.008
- Dorota, Z., Danuta, K.K., Antoni, G., Motyl, I., 2014. Predictive modelling of *Lactobacillus casei* KN291 survival in fermented soy beverage. *J. Microbiol.* 52, 169–178. doi:10.1007/s12275-014-3045-0
- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM (2004) Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. 70:2161–2171. doi: 10.1128/AEM.70.4.2161
- Durkee, D.L. (2010). Coming out of the dairy case: New developments in shelf stable probiotic foods. <http://www.foodmaster.com>
- Foligné, B., Peys, E., Vandenkerckhove, J., Van Hemel, J., Dewulf, J., Breton, J., Pot, B., 2012. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. *Clin. Nutr.* 31, 987–94. doi:10.1016/j.clnu.2012.05.016
- Gomes da Cruz, A., Alonso Buriti, F.C., Batista de Souza, C.H., Fonseca Faria, J.A., Isay Saad, S.M., 2009. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 344–354. doi:10.1016/j.tifs.2009.05.001
- Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J.D.A.F., Shah, N.P., 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 455–470. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 9. doi:10.1038/nrgastro.2014.66
- Homayoni Rad A, Mehrabany EV, Alipoor B, Mehrabany LV, Javadi M (2012) Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition* 28:733–6. doi: 10.1016/j.nut.2012.01.012
- Hong, H. a, Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 813–35. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.001
- Jafari M, Mortazavian AM, Hosseini H, Safaei F, Mousavi Khaneghah A, Sant'Ana AS (2017) Probiotic *Bacillus*: Fate during sausage processing and storage and influence of different culturing conditions on recovery of their spores. *Food Res Int* 95:46–51. doi: 10.1016/j.foodres.2017.03.001
- Klingberg, T., Budde, B., 2006. The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 157–159. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.014
- Lollo, P.C.B., Morato, P.N., Moura, C.S., Almada, C.N., Felicio, T.L., Esmerino, E. a., Barros, M.E., Amaya-Farfan, J., Sant'Ana, A.S., Raices, R.R.S., Silva, M.C., Cruz, A.G., 2015. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Res. Int.* 76, 611–617. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.015
- McMeekin, T. A.; Olley, J. N.; Ratkoswsky, D. A. R. T., 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International journal of food microbiology*, 73, 395-407.
- McMeekin, T.A.; Bowman, J.; McQuestin, O.; Mellefont, I.; Ross, T.; Tamplin, M., 2008. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 2-9.
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., Ananta, E., 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J. Biotechnol.* 162, 356–65. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.07.006
- Mansouripour, S., Esfandiari, Z., Nateghi, L., 2013. The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotic by microencapsulation : A review. *Ann. Biol. Res.* 4, 83–87.
- Martinez, R.C.R., Aynaou, A.E., Albrecht, S., Schols, H. a., De Martinis, E.C.P., Zoetendal, E.G., Venema, K., Saad, S.M.I., Smidt, H., 2011. In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 152–158. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.010
- Mourão, D.M.; Bressan, J., 2009. Influência de alimentos líquidos e Influence of liquid and solid foods on appetite control 22, 537–547. doi:dx.doi.org/10.1590/S1415-52732009000400009
- Nithya, V., Halami, P.M., 2012. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Ann. Microbiol.* 63, 129–137. doi:10.1007/s13213-012-0453-4

- Nithya, V., Muthukumar, S.P., Halami, P.M., 2012. Safety assessment of *Bacillus licheniformis* Me1 isolated from milk for probiotic application. *Int. J. Toxicol.* 31, 228–37. doi:10.1177/1091581812443388
- Okamoto, K., Fujiya, M., Nata, T., Ueno, N., Inaba, Y., Ishikawa, C., Ito, T., Moriichi, K., Tanabe, H., Mizukami, Y., Chang, E.B., Kohgo, Y., 2012. Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 1039–46. doi:10.1007/s00384-012-1416-8
- Permpoonpattana, P., Hong, H. a., Khaneja, R., Cutting, S.M., 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. *Benef. Microbes* 3, 127–135. doi:10.3920/BM2012.0002
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., Adams, M.C., 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 43, 1–7. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.009
- Ranadheera, C.S., Evans, C. a., Adams, M.C., Baines, S.K., 2013. Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. *Small Rumin. Res.* 112, 174–180. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.12.020
- Saad, S. M. I., 2006. Probióticos e prebióticos : o estado da arte 42, 1–16.
- Salminen, S., von Wright, a, Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93–106.
- Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA (2003) Sporeformers as Human Probiotics : *Bacillus* , and *Brevibacillus*. 2:101–110. Shori, A.B., 2015. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 423–431. doi:10.1016/j.bcab.2015.09.010
- Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 423–431. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010>
- Silva, P.D.L. Da, Bezerra, M.D.F., Santos, K.M.O. Dos, Correia, R.T.P., 2015. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Sci. Technol.* 62, 452–457. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.055
- Slačanac, V., Lučan, M., Hardi, J., Habschied, K., Krstanović, V., Gagula, G., 2013. Predictive modeling of *Bifidobacterium animalis* subsp . *lactis* Bb-12 growth in cow ' s , goat ' s and soy milk 63, 220–227.
- Sorokulova I (2013) Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics. *J Probiotics Heal* 1:1–5. doi: 10.4172/2329-8901.1000e106
- Taverniti, V., Guglielmetti, S., 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 6, 261–274. doi:10.1007/s12263-011-0218-x
- Van Dender, A.G.F. 2008. Prebióticos e Probióticos em Queijos. I Simpósio Internacional: Prebióticos e Probióticos em Produtos Lactéos. Campinas, São Paulo, Brasil.

Zwietering, M. H. et al. (1991). Modeling of bacterial growth as function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1094-1101.

Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, W., Liu, X.-M., Zhang, H.-P., 2009. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *J. Dairy Sci.* 92, 2468–2476. doi:10.3168/jds.2008-1849

APÊNDICES

APÊNDICE 1

MEIOS DE CULTURA FORMULADOS:

1. Ágar glicose extrato de levedura (BC):
 - Extrato de levedura (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (5g.L⁻¹),
 - D-glicose (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (5g.L⁻¹),
 - Peptona (Acumedia, Lansing, USA) (5g.L⁻¹);
 - Fosfato de potássio monobásico (Dinâmica, Diadema, (São Paulo, Brasil),
 - Fosfato de potássio dibásico (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (0,5g.L⁻¹),
 - Sulfato de magnésio (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (0,3g.L⁻¹);
 - Sulfato de manganês (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (0,01g.L⁻¹);
 - NaCl (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (0,01g.L⁻¹);
 - Ágar bacteriológico (Inlab, São Luis, Maranhão, Brasil) (15g.L⁻¹);
 - Sulfato de zinco (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (1,6mg.L⁻¹);
 - Sulfato de cobalto 7H₂O (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (1,6mg.L⁻¹);
 - Sulfato de cobre 5H₂O (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (1,6mg.L⁻¹)

2. Ágar glicose extrato de levedura (GYEA):
 - Extrato de levedura (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (5g.L⁻¹),
 - D-glicose (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (5g.L⁻¹),
 - Peptona (Acumedia-VWR, Lansing, USA) (5g.L⁻¹);
 - Fosfato de potássio monobásico (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (0,5g.L⁻¹),
 - Fosfato de potássio dibásico (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (0,5g.L⁻¹),
 - Sulfato de magnésio (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (0,3g.L⁻¹);
 - Ágar bacteriológico (Inlab, São Luis, Maranhão, Brasil) (15g.L⁻¹);
 - Solução de minerais (1mL.L⁻¹ - sulfato de manganês (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (16mg.mL⁻¹); NaCl (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (10mg.mL⁻¹); sulfato de zinco (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (1,6mg.mL⁻¹); sulfato de

cobalto 7H₂O (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (1,6mg.mL⁻¹); sulfato de cobre 5H₂O (1,6mg.mL⁻¹); sulfato de ferro 7H₂O (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (18mg.mL⁻¹)

3. Ágar LB

- Triptona (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (10g.L⁻¹)
- Extrato de levedura (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (5g.L⁻¹)
- NaCl (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) (10g.L⁻¹)
- Ágar bacteriológico (Inlab, São Luis, Maranhão, Brasil) (15g.L⁻¹);

4. Ágar TSAYE

- Ágar Triptona de Soja (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (40g.L⁻¹)
- Extrato de levedura (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (6g.L⁻¹)

ANEXOS

ANEXO 1



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "**Estudo dos efeitos à saúde associados ao consumo de requeijão cremoso adicionado de Bacillus probióticos**" (protocolo nº **3444-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana / Mariana Batista Soares**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **13 de junho de 2014**.

Handwritten signature of Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Campinas, 13 de junho de 2014.

Handwritten signature of Fátima Alonso.

Fátima Alonso
Secretária Executiva