



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

JULISE GONZALEZ COELHO

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS***

Porto Alegre

2013

JULISE GONZALEZ COELHO

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS***

Trabalho de conclusão de curso de Graduação apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre

2013

JULISE GONZALEZ COELHO

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS***

Trabalho de conclusão de curso de Graduação
apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para obtenção do Título de
Engenheiro de Alimentos.

Conceito final _____

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

M^a. Paula Mattanna. ICTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Paula Augusti. ICTA/UFRGS

Orientador – Prof. Dr. Adriano Brandelli. ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Leila e Coelho, pelo apoio, exemplo de vida, de caráter e de persistência. Pelas palavras sábias do meu pai, pelo colo da minha mãe, por toda a força que sempre me deram durante todos esses anos, e principalmente pelo amor que não tem fim e pela confiança que depositam em mim.

À minha irmã, Juliana, meu porto-seguro, minha amiga, meu exemplo de pessoa, de vida, de superação e de conquistas, que sempre esteve ao meu lado, acompanhando cada etapa, cada momento de felicidade e de dificuldade, agradeço por ser tão presente e especial na minha vida. Amor incondicional.

Ao meu cunhado, Bonelli, por sempre me dar força e por ser aquele que sempre está disposto a fazer o possível para me ajudar, obrigada Queri por tudo e por fazer parte da nossa família de forma tão especial.

A toda minha família, aos meus avós, dindos, tios e primos, pelo apoio, torcidas, companheirismo e amor que sempre me deram.

À Ana Paula Folmer Corrêa, sem dúvida, a pessoa mais presente nesse trabalho, sempre disposta a ajudar, a ensinar, a proporcionar momentos de muita gargalhada e diversão, a me dar força e tranquilidade, sou muito grata por tudo que fizestes por mim, tu és uma pessoa muito especial, tenho enorme carinho por ti e admiração pelo teu jeito simples e humilde de ser.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Brandelli, pela disponibilidade, atenção e principalmente pela liberdade que me deu no desenvolvimento desse estudo.

Às minhas amigas e colegas, Aline Oliveira, Anelise Possamai, Juliana Zapparoli, Samantha Zucatti e Gabriela Markus, que fizeram tudo ser mais fácil, mais animado, mais divertido e por mostrar que em seis anos se constrói sim amizades verdadeiras. Obrigada por cada momento, amo vocês.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela infraestrutura oferecida.

À Deus, por me abençoar e fazer com que eu siga o meu caminho com fé e esperança.

“ O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos”.

Elleanor Roosevelt

RESUMO

Os probióticos têm estabelecido a sua eficácia proporcionando benefícios para os consumidores. No entanto, a seleção de probióticos, antes da incorporação na dieta, como alimento funcional, requer um estudo detalhado, sob a forma de ensaios *in vitro*, bem como em testes *in vivo*. O presente estudo foi realizado a fim de avaliar o potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus*. Sete culturas de *Bacillus* sp., nomeadas, BL11, BL30, BL32, BL47, BL24, P7 e I3 previamente isoladas de solos e de peixes da região amazônica foram avaliadas em relação ao seu potencial probiótico através de testes *in vitro*. As culturas BL11, BL30, P7 e I3 apresentaram uma ótima tolerância ácida, e as culturas BL11, BL30, P7 e I3 mostraram resistência a sais biliares. Em relação a características de adesão bacteriana e propriedades de auto-agregação as culturas BL47 e P7 apresentaram as maiores atividades. Os valores mais elevados para o poder redutor foram observados para as culturas BL32, I3 e BL11. Todas as culturas foram sensíveis a todos os antibióticos testados. As culturas BL11, P7 e BL32 inibiram o crescimento de fungos, incluindo *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium citrinum*. No teste de atividade antibacteriana as culturas BL47, BL32 e I3 inibiram parcialmente *Bacillus cereus* ATCC 9634 e *Aeromonas* sp. As culturas BL11, BL32 e I3 produziram exopolissacarídeos (EPS), e nenhuma cultura apresentou reação hemolítica. Em estudos da atividade celulolítica todas as culturas, com exceção da I3, apresentaram resultados positivos. Em geral, as culturas testadas exibiram algumas características desejáveis para organismos probióticos, resultando em interessantes perspectivas para o trabalho. As culturas BL11, BL47 e P7 são promissoras como potenciais candidatas a aplicações probióticas.

Palavras-Chave: *Bacillus*. Probióticos. Alimento funcional. Tolerância ácida. Tolerância a sais biliares.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Inibição do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> pelas culturas BL11 (A), BL32 (B), P7 (C) e I3 (D)	34
Figura 2- Inibição da cultura BL11 pelos antibióticos Estreptomicina (10 mcg) (A), Gentamicina (10 mcg) (B), e Cloranfenicol (30 mcg) (C).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo dos compostos ativos, seus efeitos e alimentos que estão presentes	14
Tabela 2- Exemplos de cepas probióticas, marca e fabricante do produto	20
Tabela 3- Resultados da atividade antibacteriana	33
Tabela 4- Resultados da inibição dos fungos pelos <i>Bacillus</i>	34
Tabela 5- Resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos	35
Tabela 6- Resultados DPPH e poder redutor.....	36
Tabela 7- Resultados dos testes de BATH e de capacidade de auto-agregação	37
Tabela 8- Resultados da atividade celulolítica.....	38
Tabela 9- Resultado do teste de tolerância ácida	39
Tabela 10- Resultados dos testes de tolerância a sais biliares	40
Tabela 11- Resultados da produção de exopolissacarídeos	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	12
2.1 Objetivos Específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Alimentos Funcionais	13
3.2 Probióticos	15
3.4 O Gênero <i>Bacillus</i>	21
3.5 <i>Bacillus</i> como Probióticos	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Culturas Bacterianas	26
4.2 Obtenção dos Sobrenadantes Brutos	26
4.3 Atividade Antibacteriana	27
4.4 Atividade Antifúngica	27
4.5 Teste de Sensibilidade aos Antibióticos	28
4.6 Atividade Antioxidante: Captura do Radical 2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH) e Poder Redutor	28
4.7 Adesão Bacteriana aos Hidrocarbonetos (BATH) e Capacidade de Auto-agregação	29
4.8 Atividade de β-galactosidase (BGL)	29
4.9 Atividade de Fitase	30
4.10 Atividade Celulolítica	30
4.11 Atividade Hemolítica	31
4.12 Teste de Tolerância Ácida	31
4.13 Teste de Tolerância a Sais Biliares	31
4.14 Capacidade de Hidrólise de Sais Biliares (BSH)	32
4.15 Produção de Exopolissacárideos (EPS)	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Atividade Antibacteriana	32
5.2 Atividade Antifúngica	33
5.3 Teste de Sensibilidade aos Antibióticos	34
5.4 Atividade Antioxidante: Captura do Radical 2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH) e Poder Redutor	35
5.5 Adesão Bacteriana aos Hidrocarbonetos (BATH) e Capacidade de Auto-agregação	36

5.6 Atividade de β-galactosidase	37
5.7 Atividade de Fitase	37
5.8 Atividade Celulolítica	38
5.9 Atividade Hemolítica	38
5.10 Teste de Tolerância Ácida	39
5.11 Teste de Tolerância a Sais Biliares	40
5.12 Capacidade de Hidrólise de Sais Biliares (BSH)	40
5.13 Produção de Exopolissacárideos (EPS)	40
6 CONCLUSÃO	41
Referências	43

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores buscam uma alimentação mais saudável, assim estão procurando cada vez mais por produtos que aliem saúde ao prazer de um alimento palatável. As tendências por prazer, sensorialidade, confiabilidade, qualidade, conveniência e praticidade, podem ser explicadas pelo aumento do nível de educação, informação e renda da população, entre outros (MADI et al., 2011; SIRÓ et al., 2008).

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos sobre a saúde é conhecido há muito tempo. Apesar disso, o estudo desses alimentos, e de seus componentes responsáveis pelos benefícios, atualmente denominados alimentos funcionais, tornou-se intenso apenas na última década (OLIVEIRA et al., 2002).

Os alimentos funcionais são aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Possuem mecanismos não previstos pela nutrição convencional e com esse potencial proporcionam alguma alegação de saúde, no entanto, esses efeitos restringem-se à promoção da saúde e não à cura de doenças. O termo nutracêutico diz respeito a um alimento ou ingrediente alimentar que proporciona benefícios médicos e/ou de saúde, incluindo prevenção e tratamento de doenças (SANDERS, 1998).

O principal objetivo dos alimentos funcionais é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores por meio da alimentação. Os resultados científicos devem dar suporte às exigências para que um ingrediente ou alimento seja regulamentado como funcional. A avaliação do dossiê contendo todos os resultados científicos avaliados deve ser analisada por um comitê multidisciplinar. O comitê deve promover um diálogo entre representantes científicos e indústria visando definir as principais justificativas que dão suporte às atribuições (ROBERFROID, 2000).

A suplementação com cálcio e vitaminas, por exemplo, que são componentes com atividade reconhecidamente benéfica à saúde, constituíam os alimentos funcionais de primeira geração. Nos últimos anos, por outro lado, esse conceito voltou-se principalmente para aditivos alimentares, que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos e os probióticos são atualmente os aditivos alimentares que fazem parte dos alimentos funcionais (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Os probióticos são ingredientes não digeríveis, que se mantêm vivos e são incorporados aos alimentos no sentido de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, por meio de sua atuação como um substrato seletivo no nível do cólon. São denominados microrganismos probióticos aqueles tipos de bactérias que além de atuarem favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionadas, são capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro. Um microrganismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998; LEE et al., 1999).

A venda de alimentos funcionais no Brasil corresponde a quase 1% do total de alimentos, sendo que aproximadamente 65% são comercializados como produtos probióticos (GRANATO et al., 2010). Os probióticos se tornaram disponíveis, como novos alimentos ou suplementos alimentares para nutrição humana e como suplementos alimentares para animais e para uso na aquacultura (ROLFE, 2000; ROWLAND, 1999). Os probióticos podem servir como uma alternativa aos antibióticos na agricultura e aquacultura, e como profilaxia em seres humanos. Além disso, a terapia de probiótico é muito atraente, uma vez que é um método eficaz e não-invasivo, que tenta restaurar a flora natural do intestino. Microrganismos estudados e comercializados como probióticos são principalmente as bactérias Gram-positivas pertencentes aos gêneros de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (DE VECCHI; DRAGO, 2006; LEE et al., 1999; VIJAYENDRA; GUPTA, 2011), e *Bacillus* (HONG et al., 2008; SANDERS et al., 2003).

Durante décadas, os *Bacillus* e os seus metabólitos têm encontrado várias aplicações biotecnológicas, incluindo enzimas, aminoácidos, a produção de antibióticos, a preparação de alimentos fermentados, e como agentes de controle de pragas. Recentemente, cepas selecionadas de *Bacillus* são cada vez mais introduzidas em vários produtos alimentares, porque elas apresentam características probióticas comuns, tais como viabilidade no intestino (TAM et al., 2006), resistência ácida e aos sais biliares (HONG et al., 2005), e capacidade de sintetizar diferentes compostos úteis para os seres humanos. Além disso, na forma de esporos, os *Bacillus* possuem várias vantagens sobre outras bactérias não-formadoras de esporos, como os *Lactobacillus*. Os *Bacillus* podem sobreviver em alimentos que requerem condições de processamento severas, tais como elevada temperatura e pressão, sobrevivem melhor sob condições do trato gastrointestinal (GIT), possuem

uma longa vida útil e continuam a ser viáveis durante todo o seu período de vida, tanto em temperatura ambiente como em condições de refrigeração (CUTTING, 2011). Devido à sua melhor capacidade de sobrevivência, a dose efetiva necessária para *Bacillus* como suplementos probióticos é menor (DURKEE, 2010). Apenas algumas espécies de *Bacillus* estão sendo usadas como probióticos para consumo humano, que incluem *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. pumilus* e *B. laterosporus* (SOROKULOVA et al., 2008; URDACI; PINCHUK, 2004). Produtos contendo endosporos de *Bacillus* são usadas comercialmente como probióticos contendo uma única dose de 10^9 esporos/g ou 10^9 esporos/mL (MAZZA, 1994). Além disso, os *Bacillus* pode também atuar como conservantes em alimentos (BEAUMONT, 2002).

Apesar de existir hoje um número razoável de culturas probióticas caracterizadas e disponíveis para uso comercial, poucas bactérias do gênero *Bacillus* são identificadas contendo potencial probiótico. É interessante que novas culturas sejam caracterizadas porque os benefícios de cada cultura são muito específicos e diferentes entre si. Assim, esse estudo serve como uma contribuição para a pesquisa nesta área, podendo resultar no desenvolvimento de novos alimentos probióticos.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo verificar o possível potencial probiótico de diferentes bactérias do gênero *Bacillus*, investigar e fazer a comparação através de diversos critérios para a seleção de uma cepa probiótica.

2.1 Objetivos Específicos

Com o objetivo de identificar características probióticas nos *Bacillus* estudados, foram realizados os testes *in vitro* a seguir: atividade antibacteriana, atividade antifúngica, teste de sensibilidade aos antibióticos, atividade antioxidante, adesão bacteriana aos hidrocarbonetos, capacidade de auto-agregação, atividade de β -galactosidase, atividade de fitase, atividade celulolítica, atividade hemolítica, teste de tolerância ácida, teste de tolerância a sais biliares, capacidade de hidrólise de sais biliares e produção de exopolissacarídeos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos Funcionais

O alimento funcional conta com as suas funções nutricionais, como fonte de energia e de substrato para a formação de células e tecidos, e também possui em sua composição uma ou mais substâncias que atuam modulando e ativando os processos metabólicos. Esses benefícios promovem o bem-estar das pessoas, melhora as condições de saúde pelo aumento da efetividade do sistema imune, e previne o aparecimento precoce de alterações patológicas e de doenças degenerativas, que conseqüentemente, levam a uma diminuição da longevidade (PARK et. al., 1997; SGARBIERI et.al., 1999).

Os principais responsáveis pela funcionalidade desses produtos são os ingredientes liderados pelas fibras dietéticas, óleos de peixe, esteróis de plantas, minerais, vitaminas, prebióticos e probióticos (FERREIRA, 2001). A indústria também tem utilizado outros ingredientes opcionais, como os substitutos de gorduras e de edulcorantes, mas dependem do produto que se deseja desenvolver e do público alvo que se quer atingir (BERTERRECHE, 2002; FERREIRA, 2002; TAMIME, 1997).

Levantamento feito pela Associação Brasileira da Indústria da Alimentação revela que o setor industrial tem explorado, de forma crescente, novos nichos de produtos, como os alimentos e bebidas funcionais e dietéticos. Em 2012, o segmento de produtos de saúde e bem-estar (diet, light, funcionais, fortificados, naturais e saudáveis) faturou R\$ 38,4 bilhões, ou 8,9% das vendas totais. A busca por alimentos funcionais - consumidos na forma de alimento comum, mas que trazem benefícios à saúde, como prevenção de doenças e melhora do bem-estar - cresce ao redor do mundo a uma taxa de 14% ao ano, enquanto as vendas de alimentos convencionais registram índices entre 3% e 4% (ABIA, 2012).

Na Tabela 1, encontra-se o resumo dos compostos ativos e suas alegações funcionais.

Tabela 1- Resumo dos compostos ativos e suas alegações funcionais

Composto Ativo	Alegação
Ácidos Graxos	
Ômega 3	“O consumo de ácidos graxos ômega 3 auxilia na manutenção de níveis saudáveis de triglicérides, desde que associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Carotenóides	
Licopeno	“O licopeno tem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Luteína	“A luteína tem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Zeaxantina	“A zeaxantina tem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Fibras Alimentares	
Fibras Alimentares	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Beta Glucana	“A beta glucana (fibra alimentar) auxilia na redução da absorção de colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Dextrina Resistente	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Frutooligossacarídeos – FOS	“Os frutooligossacarídeos – FOS contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Goma Guar Parcialmente Hidrolisada	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Inulina	“A inulina contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Lactulose	“A lactulose auxilia o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Polidextrose	“As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Psillium ou Psyllium	“O psillium (fibra alimentar) auxilia na redução da absorção de gordura. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Quitosana	“A quitosana auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.
Fitoesteróis	
Fitoesteróis	“Os fitoesteróis auxiliam na redução da absorção de colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.

Composto Ativo	Alegação
Polióis Manitol/ Xilitol/ Sorbitol	“Manitol / Xilitol / Sorbitol não produz ácidos que danificam os dentes. O consumo do produto não substitui hábitos adequados de higiene bucal e de alimentação”
Probióticos <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Lactobacillus casei shirota</i> ; <i>Lactobacillus casei variedade rhamnosus</i> ; <i>Lactobacillus casei variedade defensis</i> ; <i>Lactobacillus paracasei</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Bifidobacterium bifidum</i> ; <i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i>) <i>Bifidobacterium longum</i> ; <i>Enterococcus faecium</i> .	“O (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.

Fonte: ANVISA, (2008).

3.2 Probióticos

Frente à interferência dos alimentos funcionais com a flora intestinal, esses alimentos podem ser divididos em três grupos: prebióticos, probióticos e simbióticos.

O alimento que contém a combinação balanceada de prebióticos e de probióticos, com as características funcionais dos dois grupos, é chamado de alimento simbiótico.

Os prébióticos são carboidratos complexos resistentes às ações enzimáticas salivares e à flora intestinal, e são considerados fibras. No momento que atingem o cólon, produzem um ou mais efeitos benéficos à microflora colônica. Um alimento prebiótico tem como principais características não sofrer hidrólise e/ou absorção no intestino delgado e alterar a microflora colônica para uma microflora saudável, promovendo efeitos favoráveis à saúde (GIBSON, 1997). Já os probióticos são definidos como ‘microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do indivíduo’ (FAO/WHO, 2001). São denominados suplementos alimentares que contam com a presença de alguns tipos de bactérias benéficas que atuam na melhora do balanço intestinal através da colonização do intestino por outras espécies, do controle do colesterol, das diarreias e da redução do risco de desenvolver câncer. Têm como importantes funções, estimular o sistema imunológico e alterar o mecanismo microbiano (GIBSON, 1997).

Algumas características desejáveis dos probióticos são: reprodução rápida pelo fato de serem habitantes normais do organismo; produção de substâncias

antimicrobianas; resistência ao tempo entre a fabricação, a comercialização e a ingestão do produto, mantendo-se vivos após atingir o intestino (HUTCHENSON, 1987).

Os efeitos benéficos atribuídos aos probióticos são diversos, no entanto, alguns são bem documentados e estabelecidos, enquanto outros apresentam potencial promissor apenas em modelos animais, com necessidade de estudos em humanos para substanciar tais alegações (FAO/WHO; 2001).

Alguns benefícios conhecidos dos probióticos, segundo Mattila-Sandholm et al. (2002), Parvez et al. (2006), FAO/WHO (2001) e Vasiljevic e Shah (2008), são: manutenção e balanço da microbiota do cólon; redução do risco de distúrbios intestinais (constipação e infecções causadas por *Helicobacter pylori*, por exemplo); redução do risco e da duração de diarreias associadas à rotavírus, a antibióticos (geralmente causada por *Clostridium difficile*) e diarreia do viajante (particularmente causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica); suprimento e aumento da biodisponibilidade e digestibilidade de nutrientes da dieta; alívio dos sintomas de má absorção intestinal (como exemplo, aumento da atividade de lactase, importante em intolerantes à lactose); redução do risco de doenças atópicas e alergias (dermatite, rinite e alergias alimentares associadas à proteína do leite, por exemplo); efeitos sobre encefalopatia hepática, doenças do trato urogenital, síndrome do intestino irritado e doenças inflamatórias do intestino (colite ulcerativa e doença de Crohn); diminuição dos níveis de colesterol sérico e de triglicerídeos; controle da pressão sanguínea (liberação de peptídeos com atividade inibitória sobre a enzima angiotensinal); atividade anti-carcinogênica, especialmente sobre câncer de cólon; modulação do sistema imune, importante fator de contribuição aos efeitos anti-inflamatórios, anti-infecciosos e anti-tumorais.

Os benefícios dos probióticos à saúde são características específicas de cada cultura. Portanto, não existe nenhuma cultura que englobe todos os benefícios, nem mesmo culturas da mesma espécie somadas proporcionariam todos esses benefícios (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Ainda se desconhece os mecanismos responsáveis por os probióticos exercerem esses efeitos benéficos, no entanto, acredita-se que possam estar envolvidos: a modificação do pH pela produção de ácidos orgânicos; a atividade antagonista sobre patógenos por meio da produção de compostos antimicrobianos; a competição com patógenos por sítios de ligação; o efeito de barreira no intestino; a

produção de enzimas (β -galactosidase e sal biliar hidrolase); a síntese e aumento da disponibilidade de nutrientes através da hidrólise de proteínas e lipídios; o estímulo de células imunomodulatórias; a redução da atividade de enzimas que ativam a carcinogênese e a inibição do crescimento ou apoptose de células tumorais por meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta, como exemplo, butirato) (PARVEZ et al., 2006; VASILJEVIC; SHAH, 2008; VENTURA et al., 2009).

As culturas probióticas são extensivamente exploradas principalmente pela indústria de laticínios. Como se sabe que elas crescem lentamente no leite devido à sua baixa atividade proteolítica, as culturas *starters* tradicionais do iogurte são juntamente incorporadas aos leites fermentados contendo probióticos (DAVE; SHAH, 1998). Recentemente outros produtos receberam a adição de probióticos, como queijos e produtos não fermentados, como soro de leite e sorvete, e ainda produtos não lácteos, como maionese, sucos de frutas, produtos cárneos e produtos à base de aveia. Além disso, existe outra linha de produtos que contém probióticos, como suplementos na forma de tabletes, cápsulas ou preparações liofilizadas (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Existem determinações que os produtos probióticos devem cumprir para seus benefícios serem eficientes. É essencial que os produtos contenham um número satisfatório de células ativas no momento do consumo. Os valores mínimos das concentrações de probióticos para efeitos terapêuticos citados na literatura variam entre 10^5 e 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cada mililitro (mL) (DAVE; SHAH, 1998; BARRRETO et al., 2003; SANZ, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008; VÉLEZ et al., 2007). No Japão, o padrão estabelecido pela Associação dos Produtores de Leites e Bebidas Lácteas Fermentadas é de 10^5 células viáveis/mL nesse tipo de produto (ROBINSON, 1987; BARRRETO et al., 2003). Isso foi exigido em função da dose terapêutica mínima diária ser geralmente considerada 10^8 a 10^9 células viáveis, alcançada com o consumo de 100 gramas (g) de produto fermentado contendo 10^6 a 10^7 de células viáveis/mL ou g. Além disso, é necessário que haja o consumo regular para que se mantenham os efeitos desses microrganismos sobre a composição da microbiota intestinal, já que a colonização não é permanente e sim transiente (GOMES; MALCATA, 1999).

De acordo com as atualizações de julho de 2008 da lista de alegações de propriedade funcional aprovadas da ANVISA, a alegação para os probióticos é a seguinte: “O (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o

equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. A quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação. E as bactérias que atualmente possuem efeitos probióticos cientificamente comprovados são: *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus casei shirota*; *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*; *Lactobacillus casei* variedade *defensis*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactococcus lactis*; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*); *Bifidobacterium longum*; *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

As culturas com potencial probiótico devem atender a certos critérios de segurança, tais como, a cultura não deve ser patogênica (não deve ter associação com doenças como desordens gastrintestinais) e deve ser originada do trato gastrintestinal de humanos saudáveis (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Porém, em 2001, o grupo técnico da FAO/WHO alegou que em virtude da dificuldade de confirmação da origem do microrganismo, torna-se mais importante a especificidade da ação probiótica (DEL PIANO et al., 2006).

Alguns testes são realizados para a caracterização de culturas probióticas, dentre eles o teste de tolerância ácida e o teste de tolerância a sais biliares são pré-requisito para probióticos (HAVENAAR; HUIS, 1992). A determinação da atividade hemolítica é considerado um aspecto de segurança para a seleção de cepas probióticas (JOINT FAO/WHO, 2002). Outros testes realizados para avaliar o potencial probiótico de bactérias são:

- atividade antibacteriana, para prevenir a infecção ou invasão de bactérias patogênicas (ABRIOUEL et al., 2011);
- atividade antifúngica, pois alguns fungos causam doenças em humanos, plantas e alimentos (RHODES, 2006);
- sensibilidade aos antibióticos, o que indica não responsabilidade de transmissão dos genes de resistência a drogas para outros agentes patogênicos intestinais (NITHYA, HALAMI, 2013);

- atividade antioxidante, aumenta a atividade biológica, qualidade e o *shelf-life* do alimento (NEDELICHEVA et al., 2010);
- adesão bacteriana aos hidrocarbonetos e capacidade de auto-agregação, relacionados com a capacidade de adesão ao epitélio intestinal (GILBERT et al., 1991);
- atividade de β -galactosidase, enzima que aumenta a digestão da lactose, reduzindo os sintomas da intolerância (IBRAHIM; O'SULLIVAN, 2000);
- atividade de fitase, enzima que hidrolisa ácido fítico em inositol e fosfato inorgânico, ao hidrolisar os resíduos de fosfato diminui a afinidade deste fator antinutricional por alguns minerais (FENNEMA, 1993);
- atividade celulolítica, habilidade da cepa em degradar celulose e hemicelulose;
- capacidade de hidrólise de sais biliares, envolvidos no mecanismo de redução dos níveis de colesterol (BEGLEY et al., 2006);
- produção de exopolissacarídeos, contribui na formação de agregados celulares bacterianos e no reconhecimento e adesão à superfície do epitélio intestinal (DUBOC; MOLLET, 2001).

Quanto aos aspectos tecnológicos, as culturas com potencial probiótico devem possuir estabilidade genética, apresentar propriedades sensoriais agradáveis, apresentar viabilidade e manutenção das características desejáveis durante o processamento e estocagem do produto, possuir resistência a fagos e passíveis de serem produzidas em larga escala. A viabilidade do probiótico no alimento depende de fatores como temperatura de estocagem, nível de oxigênio, pH, atividade de água, presença de inibidores e microrganismos competitivos. A aplicação de microrganismos probióticos em produtos não lácteos representa um grande desafio, pois geralmente produtos de cereais, confeitaria e bebidas são estocados à temperatura ambiente, considerando que as culturas probióticas são incluídas como ingredientes nestes produtos, elas usualmente não se multiplicam, necessitando grandes demandas para a estabilidade do potencial probiótico (DAVE; SHAH, 1998; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; ROSS et al., 2005; VASILJEVIC; SHAH, 2008; GRANATO et al., 2010).

Algumas estratégias para aumentar a viabilidade das culturas probióticas em ambientes adversos estão sendo estudadas, como serem submetidas a condições de estresse subletal, serem utilizadas com células imobilizadas e ainda técnicas de microencapsulação (DEL PIANO et al., 2006; SANZ, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008; ISOLAURI et al., 2002).

As bactérias probióticas fornecidas por meio de sistemas alimentares devem primeiramente sobreviver durante a passagem ao trato gastrintestinal para, então, persistirem no intestino e promover efeitos benéficos ao hospedeiro. Para isso, devem apresentar critérios de funcionalidade como tolerância à acidez e a sais biliares e capacidade de adesão à mucosa intestinal. Adicionalmente, atividade antagonística é outro requisito fundamental para a sobrevivência no intestino (HUANG; ADAMS, 2004; VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; SCHILLINGER et al., 2005).

As formas mais comuns de apresentação dos probióticos são os produtos lácteos e os alimentos fortificados com probióticos, conforme exemplificados na Tabela 2.

Tabela 2- Exemplos de cepas probióticas, marca e fabricante do produto

Cepa	Marca	Fabricante
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter & Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Chr. Hansen	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods

Cepa	Marca	Fabricante
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	L. reuteri Protectis	BioGaia
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit and others	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardii) Iyo	DiarSafe, Ultralevure, etc.	Wren Laboratories, Biocodex, etc.
Analísados como mistura: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 e <i>L. casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ Internationa
Analísados como mistura: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 e <i>L. reuteri</i> RC-14	Fem Dophilus	Chr. Hansen
Analísados como mistura: VSL#3 (mistura de uma cepa <i>Streptococcus thermophilus</i> , quatro <i>Lactobacillus</i> spp., e três <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Sigma-Tau</i>)	VSL#3	Pharmaceuticals, Inc.
Analísados como mistura: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 e <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 2		
Analísados como mistura: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 e <i>L. rhamnosus</i> R0011	A'Biotica e outros	Institut Rosell
Analísados como mistura: <i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN e T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

Fonte: Adaptado de Tong et al. (2007)

3.4 O Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é compreendido por microrganismos Gram-positivos, com forma de bastão, formadores de esporos (endósporos), aeróbios ou anaeróbios facultativos, podem ser encontrados no solo, na água, na poeira e no ar. São considerados alóctones por não estarem presentes naturalmente na microbiota gastrointestinal. Poucas espécies são patogênicas. As bactérias deste gênero caracterizam-se por apresentar intensa atividade metabólica porque produzem enzimas que degradam muitos substratos orgânicos. Os *Bacillus* são encontrados

em uma diversidade de habitat, e incluem espécies com significância ambiental, industrial e clínica (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

A ocorrência de esporos ou células vegetativas de *Bacillus* spp. no intestino pode ser originada de alimentos contendo o microrganismo ou ingeridos como probióticos. Em humanos, espécies de *Bacillus* são frequentemente identificadas em grandes números no intestino, número superior do que seria esperado se essas espécies fossem derivadas de matéria vegetal ingerida, o que indica que espécies de *Bacillus* são membros transitórios da microbiota intestinal. Diversas espécies de *Bacillus* são isoladas de peixes e de crustáceos, assim como do camarão (GILLIAND, 1999). É importante lembrar que *Bacillus* spp. podem ser encontrados na superfície de piscinas, lagos e rios, e muitos peixes, crustáceos e moluscos ingerem *Bacillus* spp. desta matéria orgânica (FULLER et al., 1999; PENNA, 2003).

3.5 *Bacillus* como Probióticos

No universo dos produtos probióticos em uso atualmente, há as bactérias formadoras de esporos, a maioria do gênero *Bacillus*. Usados primariamente na forma de esporos, esses produtos têm sido úteis na prevenção de desordens intestinais, e a diversidade de espécies utilizadas e suas aplicações é surpreendente. As preparações contendo esporos da bactéria possuem a vantagem de que o esporo pode sobreviver intacto à passagem pelo estômago, além do aumento do tempo de vida útil do produto. Alguns *Bacillus* foram estudados e testados em ensaios clínicos. O mais conhecido é o *Bacillus cereus* comercializado com o nome Bactisubtil® (Merell) e contém uma cultura proveniente do Instituto Pasteur de Paris (IP 5832). O produto foi testado há bastante tempo em ensaios clínicos com recém-nascidos (GANCZARSKI et al., 1960; VANDEKERKOVE, 1979).

Mais recentemente, outras culturas de *Bacillus* foram utilizadas para reduzir os efeitos secundários dos tratamentos antimicrobianos contra *Helicobacter pylori* (NISTA et al., 2004) e para tratamento antitumoral (MALKOV et al., 2005). Além do *B. cereus*, outras espécies têm sido utilizadas como probióticos, como *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. thuringiensis*, dentre outras (HONG et al., 2005).

Os produtos nessa linha que são consumidos por humanos enquadram-se em dois grandes grupos: os comercializados como medicamentos e os comercializados como suplementos alimentares.

Os medicamentos são utilizados no tratamento das disfunções intestinais, particularmente diarreias em crianças (principalmente infecções por rotavírus) ou como complementos no uso de antimicrobianos. Além do Bactisubtil® (*B. cereus* IP5832), podemos citar Biosporin® (*B. subtilis* e *B. licheniformis*), Biosubtyl `Nha Trang´ (*B. pumilus*), Biosubtyl `Da Lat´ (*B. cereus*), Subtyl (*B. cereus*) e Bibactyl (*B. subtilis*) (ISHIBASHI et al., 2001). As espécies utilizadas como suplementos alimentares têm o objetivo de aumentar o bem-estar do usuário, restituir a microbiota natural intestinal, dentre outras funções.

O produto comercial Natto, um bom exemplo, é constituído a partir de soja fermentada pelo *B. subtilis var. natto*. Este produto tem propriedades probióticas, como estimulação do sistema imune, produção de vitamina K₂ e atividade anticancerígena (TSUKAMOTO et al., 2001; HOSOI et al., 1999; HONG et al., 2005).

Quando os esporos da bactéria chegam ao estômago, sofrem diversas transformações, assim como os alimentos. Precisam ser ativados no estômago e no intestino através da ação de enzimas para promover posterior benefício (HONG et al., 2005).

Experimentalmente, é possível examinar o destino dos esporos através da ingestão. Em seres humanos esse estudo foi realizado com quatro voluntários, todos ingeriram uma dose fixa de 10⁵ esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Nos primeiros quatro dias após a ingestão, o número de *B. stearothermophilus* por UFC/g nas fezes foi mantido em nível constante, após oito dias as contagens diminuíram significativamente. Em um estudo preliminar, *B. stearothermophilus* foi encontrado presente nas fezes por dias seguidos após a dose inicial (VESA et al., 2000; HONG et al., 2005). De maneira interessante, neste estudo a cinética de trânsito de *B. stearothermophilus* foi similar ao probiótico *Lactobacillus plantarum*, o qual mostrou evidência de colonização ou, pelo menos, retenção no trato gastrointestinal. Esses estudos revelaram que o tempo de trânsito (ou longevidade) do *B. stearothermophilus* no trato gastrointestinal humano foi de 8 a 10 dias, algo maior que o tempo de trânsito calculado experimentalmente de um marcador sólido no intestino (GRAFF et al., 2001; HONG et al., 2005).

Outro estudo foi realizado com humanos, no qual 10 voluntários receberam duas pastilhas contendo $1,67 \times 10^{10}$ esporos de *Bacillus polyfermenticus* SCD uma vez por dia durante 14 dias (KYU-YONG et al., 2002; HONG et al., 2005). Neste teste contagens de *B. polyfermenticus* SCD eram detectadas por 4 semanas seguintes a última dose. Esses resultados diferem substancialmente daqueles de *B. stearotheophilus*, uma vez que se os esporos não têm interação com o trato gastrointestinal e simplesmente passam através dele, era de se esperar que não fossem observadas contagens de *B. polyfermenticus* SCD após 22 a 24 dias. Embora o modo como a dose foi administrada seja diferente, duas explicações podem ser propostas. Primeiro, a diferença pode ser espécie-específica e talvez os esporos de *B. polyfermenticus* SCD sejam capazes de aderir ao epitélio intestinal retardando seu trânsito. Alternativamente, os esporos podem estar se proliferando dentro do trato gastrointestinal e aptos a colonização temporária. Para ocorrer proliferação, os esporos devem estar capacitados de germinação e multiplicação.

A passagem do produto probiótico Paciflor®C10 (*B. cereus* CIP 5832) foi também determinada em cães recebendo 10^6 esporos por grama na refeição. Esporos e células vegetativas foram primariamente detectados em fezes 24 horas após ingestão e poderia não ser detectada após 3 dias, mostrando nenhuma evidência de colonização (HONG et al., 2005).

Os primeiros estudos indicando que os esporos podem germinar no trato gastrointestinal vieram de experimentos usando alças ilíacas de coelhos. Estudos mais completos *in vivo* têm usado modelos murinos. Diferentes doses de esporos (de 10^8 a 10^{10}) de *B. subtilis* PY79, foram administradas a grupos de camundongos (cultura Balb/c). Em cada caso, os camundongos foram abrigados individualmente e, usando gaiolas com grades no fundo, as fezes totais puderam ser coletadas em intervalos de 1 a 2 dias. Estes estudos mostraram que as primeiras contagens de esporos foram detectadas 3 horas pós-dose e ainda, mais importante, após 18 horas o número de esporos excretados foi maior do que administrado. Por volta de 5 a 7 dias nenhuma contagem significativa de esporos pode ser detectada, ainda que contagens cumulativas mostrassem um aumento no total de UFC. Uma vez que as contagens totais foram maiores que a dose administrada, a única explicação é de que os esporos germinaram, se multiplicaram e novamente esporularam. Primeiramente, o esporo é uma forma de vida dormente e, presumivelmente, a região superior do intestino delgado seria rica em nutrientes que poderiam induzir a

germinação, um processo que não requer a síntese de proteínas de novo. Além disso, como já foi mencionado, sabe-se que esporos de algumas espécies de *Bacillus* são reconhecidos como sendo capazes de germinarem e se multiplicarem no trato gastrointestinal, mais notavelmente *B. cereus*. Estudos recentes em aves domésticas e suínos têm demonstrado a capacidade germinativa de *B. cereus var toyoi*, a cultura comercial presente no produto Toyocerin®. Nestes estudos uma rápida germinação no intestino superior dos animais foi observada, atingindo níveis de 90% da dose de esporos administrada. Interessantemente, nestes estudos nem sempre foi possível observar um aumento no número de esporos excretados nas fezes, indicando que as condições fisiológicas do hospedeiro (por exemplo, qual a dieta) podem afetar a germinação e/ou a multiplicação dos esporos (HONG et al., 2005).

Em estudos *in vitro* foi determinado que os esporos apresentam certa resistência aos fluidos intestinais, mostrando que nem todos os esporos conseguem sobreviver à simulação do suco gástrico e aos sais biliares. Especificamente, esporos de uma cultura de *B. cereus* utilizada no produto Biosubtyl®, mostraram-se extremamente sensíveis ao suco gástrico simulado e aos sais biliares, considerando que esporos de outras culturas de *B. cereus* apresentaram-se completamente resistentes (DUC et al., 2004). Uma possível explicação para esses resultados distintos entre si é que os esporos podem estar sujeitos à ativação da germinação induzida por ácido (FAILLE et al., 2002; HONG et al., 2005). Sabe-se que a germinação dos esporos é um processo de extrema rapidez, deste modo a germinação ácido-induzida poderia ocasionar a produção de grande quantidade de células vegetativas, que, posteriormente, podem ser mortas pelo suco gástrico. Muitos estudos revelaram que as células vegetativas do gênero *Bacillus* são sensíveis às condições do trato gastrointestinal e do estômago, este fato representa uma grande barreira para as células, enquanto que os esporos demonstraram grande resistência a tais condições. No momento que os esporos germinarem, sobreviverem e se multiplicarem, a bactéria precisa encontrar uma maneira de sobreviver à toxicidade dos fluidos presentes no lúmen do trato gastrointestinal. A passagem através do trato gastrointestinal até o intestino delgado poderia diminuir os efeitos tóxicos dos sais biliares, mas em contrapartida, poderia liberar as células num ambiente anaeróbio do cólon. Provavelmente, o alimento seja suficiente para conferir alguma proteção. A adesão das bactérias à mucosa intestinal e a formação

de biofilmes com a microbiota intestinal poderia proporcionar um nicho temporário (HONG et al., 2005).

Estudos mostraram que em relação à colonização das bactérias do gênero *Bacillus* no intestino, todos os probióticos compostos de espécies de *Bacillus* apresentaram grande retenção no intestino de camundongos, sugerindo que eles poderiam persistir por um longo período. O motivo exato de tal fato ainda não está muito claro, mas pode ser resultado da adesão das células vegetativas ao epitélio da mucosa, assim como em culturas patogênicas de *B. cereus*. Especificamente no caso de *B. cereus*, alguns fatos poderiam estar envolvidos na adesão da bactéria ao epitélio intestinal. Na célula vegetativa, a camada mais externa da célula, tem sido implicada na adesão, assim como na resistência à fagocitose (KOTIRANTA et al., 2000; HONG et al., 2005). No esporo, estruturas como exosporium e pilus são responsáveis pela adesão ao epitélio intestinal. No caso de *B. cereus*, esporos de diferentes culturas demonstraram aderir-se a diversos tipos de superfícies. Além disso, culturas desta espécie mostraram-se mais hidrofóbicas que outras espécies de *Bacillus* testadas. Quanto maior a hidrofobicidade do esporo, maior sua aderência ao epitélio (HONG et al., 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Culturas Bacterianas

As bactérias utilizadas do gênero *Bacillus* foram isoladas de solos e de peixes da região amazônica, cedidas pelo Prof. Spartaco Astolfi-Filho (UFAM, Manaus). Foram utilizadas sete culturas de *Bacillus* spp. nomeadas como: BL11, BL30, BL32, BL47, BL24, P7 e I3. Culturas estoque desses microrganismos foram mantidas a -20 °C em caldo infusão cérebro-coração (BHI) contendo glicerol (20%, v/v). A reativação dos microrganismos foi realizada em placas de ágar cérebro-coração (BHA) e incubadas a 30 °C por 24 horas. As culturas reativadas foram mantidas a 4 °C em placas de BHA, com repiques periódicos em placas de BHA.

4.2 Obtenção dos Sobrenadantes Brutos

Uma alíquota de 1 mL dos pré-inóculos foi transferida para frascos

Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI), e foram incubados por 48 horas em equipamento incubador com agitação (125 rpm) a 30 °C. Posteriormente, as culturas de *Bacillus* foram centrifugadas por 15 min a 10.000 g. Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração através de filtros de celulose com poros de 0,22 µm. Os filtrados foram mantidos em geladeira a 4 °C até utilização.

4.3 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada segundo Motta e Brandelli (2002), com modificações. As culturas bacterianas utilizadas como indicadoras foram *Listeria monocytogenes* ATCC 15131, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, *Pseudomas* sp., *Aeromonas* sp., *Yersinia* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, e *Escherichia coli* ATCC 8739. Os microrganismos indicadores, a uma concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ em solução salina (0,85% NaCl, p/v), foram inoculados com um swab em placas de BHA. Após, alíquotas de 15 µL do sobrenadante bruto foram gotejadas sobre as placas, que foram incubadas nas temperaturas ótimas de cada indicador. Após 24 horas, zonas de inibição (representadas por halos claros) foram mensuradas, e apresentadas em mm (CORRÊA, 2011).

4.4 Atividade Antifúngica

Para determinar a atividade antifúngica dos sobrenadantes, os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium citrinum* foram utilizados como indicadores. Os fungos foram cultivados em placas com ágar batata dextrose (PDA) por 5 dias a 30 °C. A suspensão de células da levedura foi preparada utilizando o mesmo método descrito no item 4.3. As suspensões de conídios dos fungos filamentosos foram preparadas, e então adicionadas ao PDA liquefeito (temperatura de 50 °C) no volume necessário para a obtenção de uma concentração final de 10⁶ conídios mL⁻¹. O meio foi vertido em placas e, após a solidificação, 15 µL dos extratos brutos foram gotejados. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas e zonas de inibição (representadas por halos claros) foram medidas, e apresentadas em mm.

4.5 Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

Os antibiogramas para as cepas foram caracterizados utilizando o método de difusão em disco de acordo com as recomendações da Comissão Europeia em testes de susceptibilidade antimicrobiana (EUCAST, 2011). Os antibióticos testados foram Gentamicina (10 mcg), Cloranfenicol (30 mcg), Estreptomicina (10 mcg), Tetraciclina (30 mcg), Ciprofloxacina (5 mcg), Levofloxacina (5 mcg), Eritromicina (15 mcg), Penicilina (10 UI), Ampicilina (10 mcg). O procedimento consistiu no preparo de uma suspensão de bactérias de cultivo recente, inoculação desta suspensão na superfície de uma placa de Ágar Mueller Hinton, e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. Após a incubação em estufa por 24 horas, foi analisada a inibição ao redor de cada disco. Os resultados foram registados como sensíveis (S) e resistentes (R), com base no diâmetro da zona de inibição.

4.6 Atividade Antioxidante: Captura do Radical 2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH) e Poder Redutor

O método da captura do radical DPPH por antioxidantes, realizado como descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), baseia-se na diminuição da absorbância a 517 nm. O DPPH, dissolvido em metanol, foi utilizado em uma concentração de 60 µM. A solução foi homogeneizada e transferida para frascos escuros. A solução preparada foi utilizada somente no dia da análise. Alíquotas de 0,1 mL dos sobrenadantes brutos foram transferidas para tubos de ensaios com 3,9 mL do radical DPPH (solução de DPPH 60 µM) e homogeneizadas. Após 45 min, a atividade sequestrante foi medida espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorbância a 517 nm. Da mesma forma, essas mesmas proporções (0,1 mL de água destilada e 3,9 mL de radical DPPH) foram usadas como controle. Metanol foi usado como branco. Os resultados são expressos como: taxa de radicais sequestrados (%) = $[1 - (A / A_0)] \times 100$, onde A é a absorbância do ensaio e A₀ é a absorbância do branco.

O poder redutor foi avaliado como descrito anteriormente por Zhu, Zhou e Qian (2006). Amostras de 2,5 mL diluídas em tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) foram misturadas a 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1% e incubadas a 50 °C por 20 minutos. Após, 2,5 mL (10%) de ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado e

centrifugado (3000 x g por 10 minutos). O sobrenadante (1 mL) foi misturado com 2,5 mL de água destilada e 0,2 mL FeCl₃ 0,1% e feita a leitura em espectrofotômetro a 700 nm. A maior absorvância da reação indica um maior poder redutor. Butil hidroxil tolueno (BHT) nas mesmas concentrações das amostras são usadas como controle positivo.

4.7 Adesão Bacteriana aos Hidrocarbonetos (BATH) e Capacidade de Auto-agregação

A BATH e a capacidade de auto-agregação das culturas foram avaliadas de acordo com o procedimento descrito por Canzi et al. (2005). O teste de BATH foi realizado utilizando xileno. A cultura foi crescida por 16 ± 2 h depois centrifugada a 8.000 rpm durante 15 min a 4 °C. O *pellet* recolhido foi lavado com tampão fosfato (PBS: NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,2) e novamente suspenso no mesmo tampão a uma absorvância de 0,5 (A₆₀₀). Para isso, um volume igual de xileno foi adicionado. O sistema de duas fases foi misturado por vórtex durante 3 minutos. A fase aquosa foi removida após 1 h de incubação à temperatura de 27 ± 2 °C e a sua absorvância foi medida A₆₀₀. A porcentagem de aderência foi calculada usando a fórmula $[(A_0 - A) / A_0] \times 100$, onde A₀ e A são absorvância (A₆₀₀) antes e após a extração com solventes orgânicos, respectivamente.

Para o teste de auto-agregação, 10 mL de cultura na fase estacionária foi mantida a 15 °C durante 3 horas. Após incubação, uma alíquota de 1 mL da suspensão superior foi transferida para outro tubo de ensaio e a densidade ótica (OD) foi medida A₆₀₀. A porcentagem de auto-agregação foi calculada usando a fórmula: $[1 - (OD \text{ da suspensão superior} / OD \text{ total da cultura})] \times 100$.

4.8 Atividade de β-galactosidase (BGL)

A avaliação da BGL foi realizada segundo Mcilvaine (1921) com modificações, utilizando os substratos p-nitrofenil-β-D-glicopiranosideo e o-nitrofenil-β-D-galactopiranosideo. A reação (200 μL) consistiu de 90 μL de tampão citrato de sódio (250 mM, pH 4,5), 10 μL de substrato e 100 μL de amostra. Após a incubação desta mistura a 37 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de

tampão carbonato de sódio (500 mM, pH 10). A estimativa da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro, através da leitura da absorbância (405 nm) dos substratos liberados.

Uma unidade (U) de BGL foi considerada como a quantidade de enzima necessária para hidrólise de 1 μmol do substrato por minuto, sob as respectivas condições a cima descritas.

4.9 Atividade de Fitase

A degradação do fitato foi realizada como descrito por Raghavendra e Halami (2009), usando um meio Luria-Bertani (LB) modificado, contendo 6,25 g/L de fitato de sódio. A suspensão de células (3 μL de 10^7 - 10^8 UFC/mL) foram colocadas na superfície de placas de LB ágar modificada e incubadas durante 16 ± 2 horas a 37 °C. Após a incubação, as colônias foram lavadas da superfície do ágar utilizando água bidestilada e após a lavagem adicionou-se 2% (p/v) de solução aquosa de cloreto de cobalto (BAE et al. 1999). Após 5 minutos de incubação à temperatura de 27 ± 2 °C, a solução de cloreto de cobalto, foi substituída por uma solução recentemente preparada com volumes iguais de 6,25% (p/v) de solução aquosa de molibdato de amônio e 0,42% (p/v) de solução de meta vanadato de amônio. Após 5 minutos de incubação, a solução de molibdato de amônio - vanadato de amônio foi removida e as placas foram examinadas quanto a zonas de hidrólise de fitato.

4.10 Atividade Celulolítica

A avaliação da atividade celulolítica foi realizada segundo Nogueira e Cavalcanti (1996), usando o meio Luria-Bertani (LB) modificado, contendo 0,5% de carboximetilcelulose (CMC). Após o crescimento dos microrganismos, a atividade foi realizada adicionando-se a cada placa 10 mL de solução vermelho congo (0,25%) preparada em tampão Tris-HCl (0,1M, pH 8,0). Após 30 minutos, as placas foram lavadas durante 5 minutos com 5 mL de NaCl (0,5 M) preparada em tampão Tris-HCl (0,1M, pH 8,0). Após esse período as placas foram examinadas quanto a zonas claras ao redor das colônias.

4.11 Atividade Hemolítica

As cepas de *Bacillus* foram semeadas em placas de ágar sangue, contendo 5% (v/v) de sangue humano e incubadas durante 24 horas a 30 °C (MARAGKOUDAKIS et al., 2006). A reação hemolítica foi analisada pela observação de zonas de hidrólise ao redor das colônias em tons de marrom (β -hemólise), por zonas de hidrólise parcial ao redor das colônias em tons de verdes (α -hemólise), ou nenhuma reação (γ -hemólise).

4.12 Teste de Tolerância Ácida

A tolerância ao pH ácido foi testada para as culturas bacterianas, tal como descrito por Conway et al. (1987). Para este efeito, foram usadas culturas ativas (incubadas durante 16 ± 2 horas). As células foram colhidas por centrifugação durante 15 minutos a 8.000 rpm e 4°C. O *pellet* foi lavado três vezes em tampão fosfato (PBS, pH 7,2), após as lavagens foram ressuspensos em tampão PBS (pH 3 e pH 2) e foram incubados a 37°C. Os microrganismos sobreviventes foram avaliados quanto a sua resistência em pH ácido nos tempos 0 e 2 horas em plaqueamento no meio Luria-Bertani (LB) ágar e a contagem foi expressa em unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

4.13 Teste de Tolerância a Sais Biliares

O crescimento na presença de 0,3% (p/v) de ox bile foi analisado conforme descrito por Gilliland et al. (1984). As culturas foram incubadas durante (16 ± 2 horas a 37 °C), e centrifugados a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, o *pellet* foi ressuspensionado em solução salina (0,85% de NaCl). Um volume de 5mL de caldo Luria-Bertani (LB), sem ox bile (controle), e 5 mL de caldo LB contendo 0,3% (p/v) de ox bile, foram inoculados com 250 μ L (5%) de células em suspensão. O crescimento foi monitorado por tempos através da medição da densidade ótica (OD) a 650 nm utilizando espectrofotômetro (Shimadzu, Japão). As culturas foram divididas em quatro grupos de acordo com o crescimento observado (d) na presença de ox bile: cepas resistentes ($d \leq 15$ min), cepas tolerantes ($15 < d \leq 40$ min), cepas fracamente tolerantes ($40 < d < 60$ min), e cepas sensíveis ($d \geq 60$ min).

4.14 Capacidade de Hidrólise de Sais Biliares (BSH)

Atividade BSH das culturas foi avaliada utilizando o procedimento descrito por Pereira et al. (2003). As culturas foram crescidas por 16 ± 2 h e semeadas em placas com o meio Luria-Bertani (LB) ágar suplementadas com 0,5% (p/v) de ácido taurodesoxicólico (TDCA) e incubadas a 37 °C durante 72 h. Placas de LB ágar sem suplementação de TDCA foram utilizadas como controle. Após a incubação, as culturas exibindo precipitado branco ao redor das colônias foram classificadas como positivas.

4.15 Produção de Exopolissacárideos (EPS)

A produção de EPS foi determinada como relatado anteriormente por Mora et al. (2002). Resumidamente, culturas de *Bacillus* foram cultivadas por 16 ± 2 h e semeadas sobre a superfície de placas contendo (10% de leite em pó desnatado (p/v) , 1% de sacarose (p/v), 0,08 g/L vermelho rutênio, e 1,5% de ágar (p/v)) . Após incubação a 37°C durante 24 h, colônias brancas viscosas foram denominadas como cepas produtoras de EPS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade Antibacteriana

Atividades antagônicas de cepas probióticas são essenciais para prevenir a infecção ou invasão de bactérias patogênicas. As cepas do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzir uma ampla gama de substâncias antimicrobianas, incluindo antibióticos peptídicos e lipopeptídicos (ABRIOUEL et al., 2011). Nesse estudo os halos de inibição formados não puderam ser medidos porque não houve um halo claro e bem definido, foram observados halos que continham microrganismos patogênicos, mas em um número bem menor do que o inicial, sendo assim, foram identificados por apresentar inibição parcial. As culturas BL47, BL32 e I3 mostraram atividade parcialmente inibitória contra os microrganismos patogênicos, *Bacillus cereus* ATCC 9634 e *Aeromonas* sp. (Tabela 3). A capacidade do probiótico para inibir o microrganismo patogênico no trato gastrointestinal é um aspecto importante.

As bactérias inibidas, particularmente *B. cereus*, são importantes causas de intoxicação alimentar e deterioração, podendo também atuar como patógenos oportunistas em humanos (BOTTONNE, 2010). Os resultados indicam que após estudos mais precisos esses *Bacillus* podem vir a serem potenciais para uso em culturas de bioproteção.

Tabela 3- Resultados da Atividade Antibacteriana

Bactérias Patogênicas	BL11	BL30	BL47	BL24	BL32	P7	I3
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1513	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	-	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas</i> sp.	-	-	+	-	+	-	+
<i>Yersina</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-

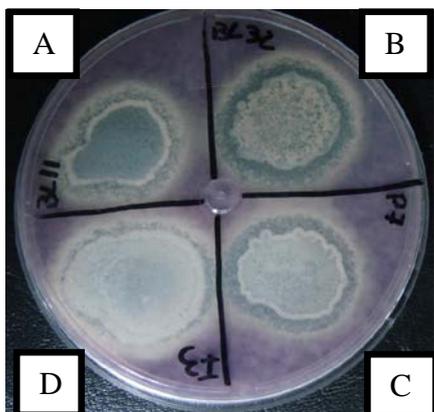
- sem inibição + inibição parcial

5.2 Atividade Antifúngica

Bactérias que inibem fungos são importantes, pois alguns fungos podem causar doenças em seres humanos, plantas e alimentos (RHODES, 2006). Portanto a inibição de fungos pode representar uma aplicação adicional de diferentes gêneros de bactérias como agentes antifúngicos. Há um crescente interesse na utilização de novas culturas como bioconservantes de alimentos (HAQUE; CHAND, 2008; BENKERROUM, 2010). As culturas BL11, BL30 e BL47 apresentaram boa inibição [halo maior ou igual a 5 milímetros (mm)] ao *Penicillium citrinum*, a P7 boa inibição ao *Aspergillus carbonarius* e as P7, BL32 e BL47 boa inibição as *Fusarium oxysporum* (Tabela 4). A Figura 1 exemplifica a inibição do fungo *Fusarium oxysporum* pelas culturas BL11, BL32, P7 e I3. Esses resultados estão de acordo com Junior et. al (2002) onde *Bacillus thuringiensis* e outra linhagem de *Bacillus* sp. isolada de rizosfera de *Drosera villosa* var. *villosa*, inibiram *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* f. sp. *glycines*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* sp.

Tabela 4- Resultados da inibição dos fungos pelos *Bacillus*

Fungos	Diâmetro do halo de inibição (mm)						
	P7	BL11	I3	BL32	BL30	BL47	BL24
<i>Aspergillus flavus</i>	2,33	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<i>Aspergillus Níger</i>	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Aspergillus carbonarius</i>	6,00	3,67	1,00	2,00	3,67	2,67	1,00
<i>Fusarium oxysporum</i>	5,00	3,00	1,67	5,67	0,00	6,00	1,00
<i>Penicillium citrinum</i>	2,67	6,33	0,00	4,00	5,33	5,67	4,00

Figura 1- Inibição do fungo *Fusarium oxysporum* pelas culturas BL11 (A), BL32 (B), P7 (C) e I3 (D)

5.3 Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

Entre os *Bacillus sp.*, todas culturas (BL11, BL30, BL32, BL47, BL24, P7 e I3) foram sensíveis a todos os antibióticos testados (Tabela 5). A Figura 2 exemplica a inibição da cultura BL11 pelos antibióticos Gentamicina (10 mcg), Estreptomicina (10 mcg) e Cloranfenicol (30 mcg). Apesar de muitas cepas de bactérias, particularmente as de *Lactobacillus spp.*, serem resistentes a determinados antibióticos, essa resistência normalmente não é mediada por plasmídios, não sendo transmissível. Cepas com plasmídios de resistência não devem ser empregadas como probióticos humanos ou animais, por serem, possivelmente, capazes de transmitir os fatores de resistência para bactérias patogênicas, dificultando a cura de infecções (SAARELA et al., 2000). Uma vez que todas as culturas foram sensíveis a qualquer um dos antibióticos testados, elas não seriam responsáveis pela transmissão dos genes de resistência a drogas para outros agentes patogênicos intestinais e/ou de origem alimentar, ou, mais importante ainda, no trato gastrointestinal, se forem ingeridas como probióticos. Esse resultado está de acordo com o descrito para *Bacillus*

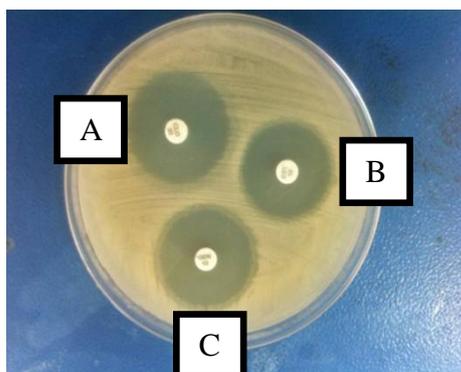
licheniformis Me1, que apresentou sensibilidade a diferentes antibióticos testados (NITHYA; HALAMI, 2013)

Tabela 5- Resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos

Antibióticos	BL11	BL30	BL32	BL47	BL24	P7	I3
Gentamicina (10 mcg)	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺
Cloranfenicol (30 mcg)	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺⁺
Estreptomicina (10 mcg)	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺
Tetraciclina (30 mcg)	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺
Ciprofloxacina (5 mcg)	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺⁺
Levofloxacina (5 mcg)	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺⁺
Eritromicina (15 mcg)	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺⁺
Penicilina (10 UI)	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺
Ampicilina (10 mcg)	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺

-: resistente 0-5 mm +: sensível 6-15 mm ++: sensível 16-25 mm +++: sensível 26-35 mm

Figura 2- Inibição da cultura BL11 pelos antibióticos Estreptomicina (10 mcg) (A), Gentamicina (10 mcg) (B), e Cloranfenicol (30 mcg) (C)



5.4 Atividade Antioxidante: Captura do Radical 2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH) e Poder Redutor

A aplicação de bactérias probióticas com atividade antioxidante nos alimentos aumenta a sua atividade biológica e sua qualidade, bem como o seu *shelf-life* (NEDELICHEVA et al., 2010). O DPPH tem sido amplamente utilizado como um gerador de radical livre (COTELLE et al., 1996) sendo um reagente útil para investigar a atividade de captura de radicais livres dos compostos (DUAN et al. 2006). As culturas que conseguem fazer tal captura desses radicais podem, eventualmente, serem usadas em formulações de alimentos ou ração animal como suplemento para aliviar o estresse oxidativo. No entanto nenhuma bactéria testada apresentou atividade para captura do DPPH (Tabela 6).

O ensaio do poder redutor é baseado na capacidade de um composto para

reduzir o Fe^{3+} para a forma Fe^{2+} (POWNALL et al., 2010). Assim, a capacidade redutora dos *Bacillus* indica que estes podem atuar como doadores de elétrons, reduzindo os intermediários oxidados nos processos de peroxidação lipídica (ZHU et al., 2006). No presente estudo a BL32 apresentou o maior valor (0,397), seguida da I3 (0,345) e BL11 (0,302), como visto na Tabela 6. Esses valores foram semelhantes quando comparados ao estudo de Meira et. al (2012), onde obtiveram uma variação 0,131 a 0,428 em queijos com *Lactobcillus* sp. probióticos.

Tabela 6- Resultados DPPH e Poder Redutor

Extrato bruto	DPPH atividade (%)	Poder Redutor (Abs. at 700 nm)
BL11	0	0.302 ± 0.021
BL30	0	0.234 ± 0.014
BL32	0	0.397 ± 0.017
BL47	0	0.124 ± 0.034
BL24	0	0.209 ± 0.012
P7	0	0.287 ± 0.021
I3	0	0.345 ± 0.009

5.5 Adesão Bacteriana aos Hidrocarbonetos (BATH) e Capacidade de Auto-agregação

Os testes de BATH e de auto-agregação foram estudados como um índice para a propriedade de adesão. Características da superfície das bactérias são uma das propriedades *in vitro* que estão sendo estudadas para o conhecimento de uma possível natureza probiótica. Propriedades da superfície das bactérias têm sido associadas a uma variedade de substratos, que por sua vez estão relacionados com características hidrofóbicas da bactéria (GILBERT et al., 1991).

A BATH variou entre 0 a 42,31% de adesão. A bactéria que apresentou melhor resultado, conforme observado na Tabela 7, foi a P7 (42,31%), seguida da BL47 (32,87). Valor encontrado em outro estudo para *B. coagulans* com propriedades probióticas, foi de 49% de adesão e 82% de auto-agregação (NITHYA; HALAMI, 2013). Esta diferença no nível de aderência entre as culturas testadas pode ser atribuída a vários fatores, tais como a reação não específica pela carga e pela hidrofobicidade (OTERO et al., 2004).

Semelhante a hidrofobicidade da superfície da célula, a atividade de auto-agregação variou entre 3,25 e 42,94%. A cultura BL47 mostrou a atividade mais

elevada de auto-agregação (42,94%), seguida da P7 (38,78%) e a BL24 teve a menor (3,25%). Collado et al. (2007) afirmam que a agregação é útil para o rastreamento preliminar para identificar as cepas probióticas potenciais em alimentos ou em rações animais, pode representar uma característica de interação com os organismos patogênicos, o que é importante do ponto de vista da preservação dos alimentos e dos benefícios dos alimentos sobre a microbiota intestinal.

Tabela 7- Resultados dos testes de BATH e de capacidade de auto-agregação

	BL11	BL30	BL47	BL24	BL32	P7	I3
Adesão (BATH)	12,87%	7,45%	32,87%	-	9,54%	42,31%	11,78%
Auto-agregação	28,55%	20,92%	42,94%	3,25%	19,58%	38,78%	28,14%

5.6 Atividade de β -galactosidase

A enzima β -galactosidase é produzida por *Lactobacillus* e outros gêneros de bactérias. A descoberta de novas culturas com níveis elevados de produção desta enzima é importante para aplicação de culturas com potencial probiótico em produtos lácteos ou como produtoras do ingrediente prebiótico galacto-oligosacarídeo, é vantajosa do ponto de vista tecnológico e de saúde devido a ação da beta-galactosidase, que aumenta a digestão da lactose e, assim, reduz os sintomas da intolerância (IBRAHIM; O'SULLIVAN, 2000; USTOK et al., 2010).

Entretanto nenhuma bactéria apresentou esta atividade para os dois substratos utilizados: p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo e o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo.

5.7 Atividade de Fitase

A fitase (hexafosfato de mio-inositol) está amplamente distribuída nos tecidos animais e vegetais, em várias espécies de fungos e em algumas bactérias. Essa enzima hidrolisa o ácido fítico em inositol e fosfato inorgânico (SILVA; TRUGO, 1996). Ao hidrolisar os resíduos de fosfato do ácido fítico diminui a forte afinidade deste fator antinutricional por certos minerais (FENNEMA, 1993). Sendo assim, as fitases além de contribuírem para uma melhor digestão de certos componentes nos animais monogástricos (aproveitamento do fósforo), também contribuem para a

diminuição nos níveis de fósforo excretado pelo animal, com conseqüente diminuição da poluição provocada pelo excesso de fósforo no meio ambiente. A síntese de fitase efetuada pela membrana celular de microrganismos é comercialmente a forma mais promissora de produção da enzima, e apesar da habilidade de produção das bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados (PANDEY et al., 2001). No entanto nenhuma bactéria estudada apresentou atividade de fitase.

5.8 Atividade Celulolítica

Investigações quanto à habilidade de cepas de diferentes microrganismos hidrolisarem celulose e hemicelulose utilizando substrato disponível e a preços acessíveis têm sido realizadas (ESTERBAUER et al., 1991). A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentação celulolítica pelo homem (LINCHY et al., 1981). Pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) descobriram microrganismos no intestino de peixes capazes de degradar a celulose no bagaço da cana-de-açúcar, além disso, eles também tentam encontrar esse tipo de bactérias no intestino de ruminantes, já que estes animais precisam digerir a celulose que ingerem (CANABRASIL, 2008). A Tabela 8 mostra que, com exceção do I3, todos os *Bacillus* sp. apresentaram atividade celulolítica. Estes resultados estão de acordo com Peixoto et al. (2011) onde relatam que *Bacillus subtilis* P6 e *Bacillus velesensis* apresentaram halos de degradação da celulase.

Tabela 8- Resultados da atividade celulolítica

BL11	BL30	BL32	BL47	BL24	P7	I3
+	+	+	+	+	+	-

+ halo de degradação das celulasas - não degradação das celulasas

5.9 Atividade Hemolítica

A determinação da atividade hemolítica é considerado um aspecto de segurança para a seleção de cepas probióticas (JOINT FAO/WHO, 2002). Ruiz-Moyano et al. (2009) encontraram cepas de *Lactobacillus casei* isoladas a partir de fezes humanas com α -hemólise e, em seguida, descartaram a possibilidade de

serem potenciais probióticos. Da mesma forma, Marakgoudakis et al. (2009) consideram cepas que produziram zonas em tons de verde em torno das colônias (α -hemólise) e ausência de zonas (γ -hemólise) como não hemolítica. Neste estudo, nenhum dos *Bacillus* utilizados apresentou reação hemolítica (todos γ -hemolítica), indicando a possível não patogenicidade (MARAGKOUDAKIS et al., 2006).

5.10 Teste de Tolerância Ácida

Antes das culturas probióticas serem capazes de exercer benefícios no intestino, elas devem permanecer vivas durante a ingestão em ambientes agressivos do trato gastrointestinal, que incluem condições ácidas do estômago e sais biliares. A sobrevivência de *Bacillus* sp. no suco gástrico depende da sua capacidade de tolerar o pH ácido, o que é uma importante característica probiótica. Dentre as culturas testadas a BL11, a BL47 e a P7 mostraram resultados iguais ou superiores a 79% de sobrevivência a pH 2 (Tabela 9). A cultura BL47 foi mais ácido tolerante exibindo 89% da capacidade de sobrevivência após 2 h de incubação a pH 3, ao passo que o as culturas P7 e BL11 exibiram 83 e 77% de sobrevivência, respectivamente. Isto indica que todas essas culturas foram capazes de suportar condições ácidas. A existência de *Bacillus* sp. tolerantes a ambientes ácidos foi sugerida previamente por Hyronimus et al. (2000) utilizando para os testes *Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus laevolacticus* e *Bacillus racemilacticus*, como resultado obteve que somente *Bacillus laevolacticus* apresentou uma taxa de sobrevivência significativa a pH 2,5. Os resultados estão de acordo ao encontrado no estudo de Nithya e Halami (2013) onde *B. coagulans* serviu de controle e apresentou 80% de sobrevivência em pH 2,5 após 2 h de incubação.

Tabela 9- Resultado do teste de tolerância ácida

	T0 pH2 (%)	T2 pH2 (%)	T0 pH3 (%)	T2 pH3 (%)
BL11	100	79	100	77
BL30	100	21	100	19
BL32	100	12	100	23
BL47	100	85	100	89
BL24	100	17	100	15
P7	100	81	100	83
I3	100	24	100	18

5.11 Teste de Tolerância a Sais Biliares

A resistência aos sais biliares é de grande importância na sobrevivência e crescimento de bactérias no trato intestinal e, assim, é um pré-requisito para probióticos (HAVENAAR; HUIS, 1992). Os estudos de tolerância à sais biliares são principalmente realizadas utilizando solução ox bile 0,3% pela sua semelhança ao suco biliar humano (BRASHEARS et al., 2003; CHOU; WEIMER, 1999) e também porque 0,3% é considerada uma concentração crucial para avaliar um probiótico tolerante a sais biliares (GILLILAND et al., 1984). Observou-se que, na presença de oxbile (0,3%), as culturas BL11, BL30, P7 e I3 foram resistentes, enquanto que as culturas BL32, BL47, BL24 foram consideradas sensíveis (Tabela 10). Assim, no presente estudo, *Bacillus* spp. foram encontradas em ambos os grupos de "resistente" e "sensível". Estes resultados estão de acordo com aqueles observados com outras culturas, como *B. subtilis* e *B. toyoi* (COSSON; DESCHAMPS, 1994) e culturas de *B. coagulans* (HYRONIMUS et al., 2000).

Tabela 10- Resultados dos testes de tolerância a sais biliares

BL11	BL30	BL32	BL47	BL24	P7	I3
resistente	resistente	sensível	sensível	sensível	resistente	resistente

5.12 Capacidade de Hidrólise de Sais Biliares (BSH)

A formação de um precipitado branco em torno das colônias demonstra que as cepas foram capazes de hidrolisar enzimaticamente os sais biliares, que por sua vez estão envolvidos no mecanismo da redução do nível de colesterol (BEGLEY et al., 2006). Assim, quando ingeridas como probióticos, estas culturas podem exercer efeitos benéficos para a saúde através da redução do nível de colesterol. No entanto no presente estudo nenhuma bactéria apresentou a atividade BSH.

5.13 Produção de Exopolissacárideos (EPS)

A produção de EPS é economicamente importante, pois pode dar efeitos funcionais para alimentos e conferir efeitos benéficos à saúde. Entre os componentes alimentares que parecem mostrar os melhores efeitos prebióticos

- no poder redutor, as culturas BL32, I3 e BL11 apresentaram os maiores valores;
- nos testes de BATH e auto-agregação, as culturas BL47 e P7 apresentaram os maiores valores para os dois testes;
- nenhum dos *Bacillus* estudados apresentaram atividade para os testes de β -galactosidase, de fitase, de hidrólise de sais biliares e de captura do radical DPPH;
- todas as culturas, com exceção da I3, apresentaram atividade celulolítica;
- nenhum dos *Bacillus* apresentou reação hemolítica, o que representa um fator de segurança;
- no teste de tolerância ácida, as culturas BL11, BL47 e P7 foram as mais ácido tolerantes, esse teste é um pré-requisito para probióticos;
- no teste de tolerância a sais biliares, as culturas BL11, BL30, P7, I3 foram resistentes, este também é um pré-requisito para probióticos;
- as culturas BL11, BL32 e I3 produziram EPS.

Os testes *in vitro* de tolerância ácida, de tolerância a sais biliares e de atividade hemolítica foram decisivos na escolha dos *Bacillus* com potencial probiótico, além desses, outros testes com bons resultados, conforme descritos acima, também foram válidos para complementar essa escolha. Duas culturas se destacaram como potenciais candidatas a aplicações probióticas, a BL11 e a P7.

Entretanto é necessária a continuidade das pesquisas para substanciar os resultados iniciais obtidos e para o futuro desenvolvimento de novos produtos alimentares probióticos seguros.

REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX -Lista de alegações de propriedade funcional aprovada. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> Acesso em: 12 set. 2013.

ABIA – Associação Brasileira da Indústria da Alimentação. A força do setor de alimentos funcionais no Brasil. Disponível em: <<http://abia.org.br/vst/AForcadoSetordeAlimentos.pdf.htm>> Acessado em: 19 jul. 2013.

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M. A. P.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, p.201-232, 2011.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L.; YIM, D.K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobactérias* e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119-126, 2003.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p.1729–1738, 2006.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, p.320-338, 2010.

BERTERRECHE, J. Prebióticos e probióticos em produtos lácteos. 2º simpósio de tecnologia de Produtos lácteos – Germinal, 2002.

BORGES, V.C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: Waitzberg DL. **Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. São Paulo: Atheneu, 2001.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, p.382-298, 2010.

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

BRASHEARS, M. M.; GALYEAN, M. L.; LONERAGAN, G. H.; KILLINGER-MANN, K. Prevalence of *Escherichia coli* O157, H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. **Journal of Food Protection**, v.66, p.748–754, 2003.

BEAUMONT, M. Flavouring composition prepared by fermentation with *Bacillus* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v.75, p.189–196, 2002.

CANABRASIL. Produção de etanol ser mais eficiente. Disponível em: <<http://www.canabrasil.com.br/content/view/369/78>> Acesso em: 29 set. 2008

CANZI, E.; GUGLIELMETTI, S.; MORA, D.; TAMAGNINI, I.; PARINI, C. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal *Bifidobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.88, p.207–219, 2005.

CHOU, L.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.23–31, 1999.

COLLADO, M. C.; GRZEŚKOWIAK, L.; SALMINEN, S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. **Current**

Microbiology, v.55, p.260–265, 2007.

CONWAY, P. L.; GORBACH, S. L.; GOLDIN, B. R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**. v.70, p.1–12, 1987.

CORRÊA, A.P.F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J.G.; MEIRA, S.M.M.; LOPES, F.C.; SEGALIN, J.; RISSO, P.H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.2247-2254, 2011.

COSSON, C.; DESCHAMPS, A. M. Behavior of probiotic strains in the presence of bile and bile salts. **Nutrition Food Microbiology**, v.12, p.93–98, 1994.

COTELLE, N.; BEMIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant properties of hydroxyl flavones. **Free Radical Biology Medicine** v.20, p.35–43, 1996.

CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214–220, 2011.

DE VECCHI, E.; DRAGO, L. Lactobacillus sporogenes or Bacillus coagulans: misidentification or mislabelling? **International Journal of Probiotic and Prebiotic**, v.1, p.3–10, 2006.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n.11, p. 2804 – 2816, 1998.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, GP.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.153-177, 1999.

DUAN, X. J.; ZHANG, W. W.; LI, X. M.; WANG, B. G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry** v.95, p.37–43, 2006.

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v.11, p.759-768, 2001.

DUC, L.H; HONG, H.A.; BARBOSA, T.M.; HENRIQUES, A.O.; CUTTING, S.M. Characterisation of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2161-2171, 2004.

DURKEE, D. L. Coming out of the dairy case: New developments in shelf stable probiotic foods, 2010. Disponível em: <http://www.foodmaster.com> Acesso em 4 jun 2013.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLINER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonemal malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology Medicine**, New York, v.11, p.81-128, 1991.

EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011. Disponível em: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ Acesso em: 18 ago. 2013.

FAGUNDES, R.L.M; COSTA, Y.R. Uso de alimentos funcionais na alimentação. **Higiene Alimentar**, v.3, p.17-47, 2003.

FAILLE, C.; MEMBRE, J.; KUBACZKA, M.; GAVINI, F. Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavourable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation. **Journal of Food Protection**, v.65, p.245-256, 2002.

FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria –Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina. Disponível em:

<http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html.

> Acesso em: 9 jun. 2013

FENNEMA, Owen. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, v.11, p. 123-137, 1993.

FERREIRA, A. C. Breve história e perspectivas para a indústria de laticínios no Brasil. 2º simpósio de tecnologia de Produtos lácteos – Germinal, 2002.

FERREIRA, C. L. L. F. Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos. In: PORTUGAL, J.A.B.; CAS-TRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F. o agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais. Juiz de Fora: EPAMIG – Centro Tecnológico – ILCT, 2001. p.183-203, 2001.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, Atheneu, p.182, 2002.

FULLER, R. Probiotics: the scientific basis. London: Chapman & Hall, p.398, 1999.

GANCZARSKI A, SROCZINSKI K, BROZIK H, GOLSTEIN L, KOWALSKA D, LIPINSKA I, NAREMBSKA E, MIKUCKI J, RADZIKOWSKA H. Modifications de la flore intestinale par le *Bacillus subtilis*(Sp 5832). **Gazette Médicale de France**, v. 67, p. 2115-2125, 1960.

GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, suppl. 2, p. S248–S255, 2006.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of human gum microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **Journal of Nutrition**, v.7, p.38-41, 1999.

GILBERT, P.; EVANS, D. J.; EVANS, E.; DUGUID, I. G.; BROWN, M. R. W. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.71, p.72–77, 1991.

GILLILAND, S. E.; SPECK, M.L. Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 760-762, 1999.

GILLILAND, S. E.; STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance in bile tolerance of *LactoBacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**. v.67, p.3045–3051, 1984

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *LactoBacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GRANATO, D.;BRANCO, G. F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A. G.;FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p. 292-302, 2010.

GRAFF, J.; BRINCH, K.; MADSEN, J.L. Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects. **Clinical Physiology**, v.21, p.253-259, 2001.

HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Resesearch and Technology**, v.227, p.7-15, 2008.

HAVENAAR, R.; HUIS, J. H. J. Probiotics: a general view. The lactic acid bacteria. In: Wood BJB (ed) *The lactic acid bacteria in health and disease*, Elsevier, London, v.1,

p.151–71, 1992.

HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; HAD, J.; SASSI, A.; DESCHAMPS, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.193–197, 2000.

HONG H. A.; DUC, L. H. CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.813–835, 2005.

HONG, H. A.; HUANG, J. M.; KHANEJA, R.; HIEP, L. V.; URDACI, M. C.; CUTTING, S. M. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* food probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.510–520, 2008.

HOSOI, T.; AMETANI, A.; KIUCHI, K.; KAMINOGAWA, S. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (natto) spores are dependent upon dietary components. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.59-66, 1999.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253–260, 2004.

HUTCHENSON, D. Researcher lists characteristics of probiotics. *Feddstuffs*, v.14, p.8-10, 1987;

IBRAHIM, S. A.; O’SULLIVAN, D. J. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade β -galactosidase overproducing mutants of bifidobacteria, lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.923–930, 2000.

ISHIBASHI, N.; YAMASAKI, S. Probiotics and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.465-470, 2001.

ISOLAURI, E.; KIRJAVAINEN, P.V.; SALMINEN, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*, v. 50,p. 54-59, 2002.

JOINT FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

JUNIOR, C. B. B.; ALBINO, U. B.; MARTINES, A. M.; SARIDAKIS, D. P.; MATSUMOTO, L. S.; AVANZI, M. A.; ANDRADE, G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.8, 2002.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**,v.2, p.189-198, 2000.

KYU-YONG, P.; JUNG, H.-Y.; WOO, K.-I.; JUN, K.-D.; KANG, J.-S.; PAIK, H.-Y. Impact of *Bacillus polyfermenticus* SCD administration on fecal microflora and putrefactive metabolites in healthy adults. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.657-663, 2002.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. Handbook of probiotics. New York: Wiley, p. 211, 1999.

LYNCH, J. M.; SLATER, J. H.; BENNETTI, J. A.; HARPER, S. H. T. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, Berlin, v.127, p.231-236, 1981.

MADI, L. *et al.* **Brasil food trends 2020**. São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP). 2011.

MALKOV SV, MARKELOV VV, POLOZOV GY, SOBCHUK LI, ZAKHAROVA NG, BARABANSCHIKOV BI, KOZHEVNIKOV AY, VAPHIN RA, TRUSHIN MV. Antitumor features of *Bacillus oligonitrophilus* KU-1 strain. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 38, p. 96-104, 2005.

MARAGKOUDAKIS, P. A., MOUNTZOURIS K. C., PSYRRAS, D., CREMONESE, S., FISCHER, J., CANTOR, M. D., TSAKALIDOU, E. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology** v.130, p.219-226, 2009.

MARAGKOUDAKIS, P. A., ZOUMPOPOULOU, G., MIARIS, C., KALANTZOPOULOS, G., POT, B., TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal** v.16, p.189-199, 2006.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Boll Chim Farm**, v.133, p.3–18, 1994.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921.

MEIRA, S. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; LOPES, F. C.; BRANDELLI, A. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**, v.79, n.1, p.119-27, 2012.

MORA, D.; FORTINA, M.G.; PARINI, C.; RICCI, G.; GATTI, M.; GIRAFFA, G.; MANACHINI, P. L. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus*

thermophilusstrains isolated from dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 278–287, 2002.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p.63-70, 2002.

NEDELICHEVA, P.; DENKOVA, Z.; DENEV, P.; SLAVCHEV, A.; KRASTANOV, A. Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NBIMCC 2415 with, antioxidant activity as a starter culture in the production of dried fermented meat products. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.24, p.1624–1630, 2010.

NISTA, E.C.; CANDELLI, M.; CREMONINI, F.; CAZZATO I.A.; ZOCCO M.A.; FRANCESCHI F.; CAMMAROTA G.; GASBARRINI G.; GASBARRINI A. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, p.1181-1188, 2004.

NITHYA, V.; HALAMI P. M. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. **Annals of Microbiology**, v.63, p.129–137, 2013.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALARCON, J. H.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v.38, n.1, 2002.

OTERO, M. C.; OCANA, V. S.; NADER-MACIAS, E. M. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. **Methods in Molecular Biology**, v.268, p.435–440, 2004.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.; SOCCOL, V. T. Production purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v.77, p.203 – 214, 2001.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, n. 31, p. 200-206, 1997.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, S. Ah; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171–1185, 2006.

PEIXOTO, S. B.; OLIVERA, F. C.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Cellulase-producing *Bacillus* strains isolated from the intestine of Amazon basin fish. **Aquaculture Research**, v.42, p.887-89, 2011.

PENNA, F.J.; PÉRET FILHO, L.A.; CALÇADO, A.C.; RIBEIRO, JR. H., NICOLI, J.R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, v.76, p.209-217, 2003.

PEREIRA, M. C.; CARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile salt hydrolysing *LactoBacillus fermentum* strain and determination of its cholesterol lowering properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.4743–4752, 2003.

POWNALL, T. L.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4712-4718, 2010.

RAGHAVENDRA, P.; HALAMI, P. M. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p.129–134, 2009.

RHODES, J. C. *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. **Medical Mycology**, v.44, p.577-581, 2006.

ROBERFROID, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.71, suppl.6, p.1660-1664, 2000.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.406-409, 2001.

ROBINSON, R.K. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. **Suid Afrikaanse Tydskrif Vir Suiwelkunde**, v. 19, p. 25-27, 1987.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition** v.130, p.396–402, 2000.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1410–1417, 2005.

ROWLAND, I. Probiotics and benefits to human health-the evidence in favour. **Environmental Microbiology**, v.1, p.375–382, 1999.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M. J.; CASQUETE, R.; SERRADILLA, M. J.; CÓRDOBA, M. G. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. **Meat Science**, v.83, p.460-467, 2009.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R.; MALTTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197–215, 2000.

SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2:101–110, 2003.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: A way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1284–1289, 2007.

SCHIAVÃO-SOUZA, T. D.; YUHARA, T. T.; CASTRO-GOMÉZ, R. J. H.; GARCIA, S. Produção de Exopolissacarídeos por Bactérias Probióticas: Otimização do Meio de Cultura. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 27-34, 2007.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1289–1297, 2005.

SGARBIERI, V. C., PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 2, p. 7-19, 1999.

SILVA, L. G.; TRUGO, L. C. Characterization of fitase activity in lupin seed. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p. 329-340, 1996.

SIRÓ, I. A. *et al.* Functional food: product development, marketing and consumer acceptance – a review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

SOROKULOVA, I. B.; PINCHUK, I. V.; DENAYROLLES, M.; OSIPOVA, I. G.; HUANG, J. M.; CUTTING, S. M.; URDACI, M. C. The safety of two Bacillus probiotic strains for human use. **Digestive Diseases and Sciences**, v.53, p.954–963, 2008.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v.28, p.116-124, 2008.

TAM, N. K. M.; UYEN, N. Q.; HONG, H. A.; DUC, L. H.; HOA, T. T.; SERRA, C. R.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.2692–700, 2006.

TAMIME, A. Culturas “starter” lácticas e probióticas. In: LERAYER, A. L. S., SALVA, T. J. G., coords. leites fermentados e bebidas lácticas. Campinas: ITAL, v.2, p.11-25, 1997.

TONG, J. L.; RAN, Z. H.; SHEN, J.; ZHANG, C. X.; XIAO, S.D. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.25, p.68-125, 2007.

TSUKAMOTO, Y.; KASAI, M.; KAKUDA, H. Construction of a *Bacillus subtilis* (natto) with high productivity of vitamin K2 (menaquinone-7) by analog resistance. *Bioscience*, **Biotechnology and Biochemistry**, v.65, p.2007-2015, 2001.

URDACI, M.C.; PINCHUK, I. Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics In: RICCA, E.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. (eds) Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications. **Horizon Bioscience**, Norfolk, p.171–182, 2004.

USTOK, F. I.; TARI, C., HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry** 119, 1114-1120, 2010.

VANDEKERKOVE M. Étude des effets de l'administration du *Bacillus* souche IP 5832 sur la flore intestinale des nourissons soumis aux traitements antibiotiques. **Annales de Pédiatrie**, v. 26, p. 503-506, 1979.

VESA, T.; POCHART, P.; MARTEAU, P. Pharmacokinetics of Lacto*Bacillus* plantarum NCIMB 8826, Lacto*Bacillus* fermentum KLD and Lactococcus lactis MG

1363 in the human gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.14, p.823-828, 2000.

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

VÉLEZ, M. P.; DE KEERSMAECKER, S. C.J.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of Lacto*Bacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p. 140–148, 2007.

VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAEISSON, M. J.; TURRONI, F.; KLAENHAMMER, T. R.; SINDEREN, D. V.; O'TOOLE, P.W. Genome-scale analyses of health promoting bacteria: probiogenomics. **Nature Reviews -Microbiology**, v. 7, p. 61-73, 2009.

VIJAYENDRA, S. V. N.; GUPTA, R. C. Assessment of probiotic and sensory properties of dahi and yoghurt prepared using bulk freeze-dried cultures in buffalo milk. **Annals of Microbiology**. doi:10.1007/s13213-011-0331-5, 2011.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895–904, 2003.

ZIEMER, C.J., GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, p.473-479, 1998.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v.41, p.1296-1302, 2006.