



Avaliação da viabilidade de esporos de *Bacillus clausii* em simulação do trato gastrointestinal humano

Manoel Armando Delgado Junior*; Danielle Marques Vilela*; Kelly Cristina da Silva Brabes*.

* Universidade Federal da Grande Dourados - MS, Brasil.

*Autor para correspondência e-mail: manoel.junior067@academico.ufgd.edu.br

Palavras-chave

Microbiota Intestinal
Enterogermina
Probiótico
Hidrólise de sais biliares

Keywords

Intestinal Microbiota
Enterogermina
Probiotic
Bile salt hydrolysis

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

Evaluation of the viability of *Bacillus clausii* spores in a simulation of the human gastrointestinal tract

Abstract: The use of probiotic spore-forming bacteria, such as *Bacillus spp.*, has increased due to their ability to form spores resulting in greater resistance during production, storage and commercialization processes. *Bacillus clausii* has been on the market for over 55 years and is characterized by the presence of four probiotic strains (O/C, SIN, N/R and T). In this study, *Bacillus clausii*, from the commercial product Enterogermina®, was obtained from pharmacies and drugstores in the city of Dourados-MS. To characterize *Bacillus clausii* for use as a probiotic, pH 2 and 3 analysis, tolerance test and hydrolysis of bile salts at 0.3%, pepsin and pancreatin tolerance test, adhesion test and hemolysis activity were performed. In the analyzes of tolerance to acidic pH, bile salts, pepsin and pancreatin, there were no significant differences compared to the log CFU/mL-1 of initial cells. 67% of adherence to stainless steel sheet. It showed bile salt hydrolysis and γ -hemolytic activity in blood agar. Thus indicating great probiotic potential.

Recebido em: 14/08/2023

Aprovação final em: 18/12/2023



Introdução

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

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

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

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

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

Diante disso, esse trabalho tem como objetivo, caracterizar a capacidade de sobrevivência de esporos de *Bacillus clausii*, simulando as condições do trato gastrointestinal, seu aspecto de segurança, de acordo com as normas de vigilância existente.

Materiais e Métodos

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

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

Tolerância ao pH ácido

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

Teste de tolerância a pepsina e pancreatina

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



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

Teste de tolerância a sais biliares

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

Hidrólise de sais biliares (BSH)

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

Teste de Adesão

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

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

Teste de Hemólise

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

Resultados e Discussões

Tolerância ao pH ácido

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

Tabela 1 - Contagem de *Bacillus clausii* em log de UFC/mL⁻¹ após a exposição dos esporos ao pH 2 e 3, nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas.

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

Fonte: Elaborado pelos autores.



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

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

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

Teste de tolerância a pepsina e pancreatina

Para proporcionar os benefícios de saúde esperados os micro-organismos probióticos devem ter mecanismos de exclusão ou resistência a algumas condições impostas pelo trato gastrointestinal (TGI) (ÖZKAN; DEMIRCI; AKIN, 2021), dessa forma os esporos de *Bacillus clausii* não sofreram alterações significativas em log de UFC/mL⁻¹ quando exposto a pepsina e pancreatina nos tempos determinados de 0, 1, 2 e 3 horas para pepsina e 0, 1, 2, 3 e 4 horas para pancreatina, como demonstrado na Tabela 2.

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

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

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

Fonte: Elaborado pelos autores.

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

Teste de tolerância a sais biliares

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

A análise de tolerância aos sais biliares é essencial para que o probiótico sobreviva no intestino delgado humano, onde a concentração de bile varia de 0,1% a 0,3% (SALIBA, *et al.*, 2021). Diante disso, a variação de log de UFC/mL⁻¹ não apresentou alterações relevantes quando comparado com



o valor obtido na contagem de célula inicial, como apresentado na Tabela 3, podendo evidenciar que os esporos de *Bacillus clausii* são capazes de tolerar uma concentração de 0,3% de sais biliares por 4 horas.

Vecchione, *et al.*, (2018) ao averiguar a suspensão de Enterogermina® (*Bacillus clausii*) na concentração de 0,3% de sais biliares por 6 horas, as bactérias presentes foram capazes de se replicar, com um aumento significativo em seu número a partir de 240 min (4 horas) de incubação. Já no trabalho de Jeon *et al.*, (2017) os esporos de *Bacillus clausii* ATCC 700160 na presença de sais biliares artificiais por 24h, os números populacionais aumentaram mais do que no controle.

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

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

Fonte: Elaborado pelos autores.

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

Hidrólise de sais biliares (BSH)

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

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

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

Teste de Adesão

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

Por meio da mesma metodologia utilizada nesse estudo, Harnentis, *et al.*, (2020) verificaram a capacidade de adesão de bactérias probióticas de ácido láctico isoladas de alimentos fermentados indígenas do oeste de Sumatra, utilizando chapa de aço inoxidável, obteve a capacidade de adesão maiores que 84%, Mulaw *et al.*, (2019), estudaram a capacidade de adesão de bactérias probióticas de bactérias de ácido láctico isoladas de alguns produtos alimentares encontrando 32,75 e 36,30% de adesão.



Teste de Hemólise

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

Lakshmi, et al., (2017), ao verificar a segurança de *Bacillus clausii* UBBC07, Jeon, et al., (2017) de *B. clausii* ATCC 700160 e Nighat, et al., (2020) de *Bacillus clausii* KP10 ambos obtiveram os mesmos resultados verificando as atividades hemolíticas das cepas, os mesmos também não apresentaram atividade hemolítica (γ -hemolítica).

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

Conclusão

O presente estudo indica que *Bacillus clausii* pode ser considerado um potencial agente probiótico pois os esporos foram capazes de sobreviver as condições semelhantes às do TGI sem alterações significativas nas análises. Apresentou a capacidade de hidrolisar sais biliares o que indica a possibilidade de auxiliar o manejo da hipercolesterolemia, além de possuir um potencial de 67% de aderência indicando capacidade de aderir a substratos como a parede intestinal. Não apresentou potencial hemolítico, sendo considerado um probiótico seguro.

Agradecimentos

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

Referências

AHIRE, J. J.; KASHIKAR, M. S.; MADEMPUDI, R. S. Survival and Germination of *Bacillus clausii* UBBC07 Spores in *in vitro* Human Gastrointestinal Tract Simulation Model and Evaluation of Clausin Production. **Frontiers in Microbiology**, v.11, n.1010, p. 1-09, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01010>. Acesso em: 07 de jun. 2023.

ASPRI, M; PAPADEMAS, P; TSALTAS, D. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. **Fermentation**, v.6, n. 30, p. 1-20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation6010030>. Acesso em: 07 de jun de 2023.

BORICHA, A. A; SHEKH, S. L; PITHVA, S. P; AMBALAM, P. S; MANUEL, B. J. In vitro evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin. **LWT**, v.106, p.201-208, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.021>. Acesso em 09 de jun. de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019**. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Brasília: ANVISA, 2019. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301>. Acesso em: 15 de jun de 2023.

CELANDRONI, F. Vecchione, A; CARA, A; Mazzantini, D; Lupetti, A; Ghelardi, E. 2019. Identification of



Bacillus species: Implaction on the quality of probiotics formulations. **Plos one**, v.14, n. 5, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217021>. Acesso em: 07 de jun. de 2023.

FAO/WHO (2001). **Report Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf> >. Acesso em 21 de jun. de 2023.

Harntentis H, Marlida Y, Nur YS, Wizna W, Santi MA, Septiani N, Adzitey F, Huda N. Novel probiotic lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented foods from West Sumatera, Indonesia. **Veterinary World**, v. 13, n. 9, p.1922-1927, 2020. Disponível em: www.doi.org/10.14202/vetworld.2020.1922-1927. Acesso em: 07 de jun. de 2023.

JEON, H. L; LEE, N. K; YANG, S. J; KIM, W. S; PAIK, H, D. Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1641–1648, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0148-5>. Acesso em 10 de jun. de 2023.

KUEBUTORNYE, F. K. A; ABARIKE, E. D; LU, Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p. 820-828, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>. Acesso em: 08 de jun de 2023.

LAKSHMI, S. G; JAYANTHI N; SARAVANAN M; RATNA M.S. Safety assesment of *Bacillus clausii* UBBC07, a spore forming probiotic. **Toxicology Reports**, v.4, p.62-71, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.12.004>. Acesso em: 09 de jun de 2023.

LI, M; WANG, Y; CUI, H; LI, Y; YUAN, S. QIU, H. J. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gastrointestinal Tract of a Wild Boar as Potential Probiotics. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. 49. p.1-10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00049>. Acesso em: 11 de jun. de 2023.

MANTZOURANI, I; CHONDROU, P; BONTSIDIS, C; KAROLIDOU, K; TERPOU, A; ALEXOPOULOS, A; BEZIRTZOGLU, E; GALANIS, A; PLESSAS, S. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in in vitro xperimental systems. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 751–763, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01467-6>. Acesso em: 12 de jun. de 2023.

MAZKOUR, S; SHEKARFOROUSH, S. S; BASIRI, S; NAZIFI, S; YEKTASERESHT, A; HONARMAND, M. Effects of two probiotic spores of *Bacillus* species on hematological, biochemical, and inflammatory parameters in *Salmonella Typhimurium* infected rats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 8035, p.1-11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64559-3>. Acesso em: 07 de jun. de 2023.

MULAW, G; TESSEMA, T. S; MULETA, D; TEFAYE, A. In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, n.1, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/7179514>. Acesso em: 11 de jun. de 2023.

NIGHAT, F; MUSHTAQ, Z; MAQSOOD, M; SHAHID, M; HANIF, M. A; JAMIL, A. Cytotoxic, α -amylase inhibitory and thrombolytic activities of organic and aqueous extracts of *Bacillus clausii* KP10. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 1, p. 135-139, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.36721/PJPS.2020.33.1.REG.135-139.1>. Acesso em: 09 de jun. de 2023.

ÖZKAN, E. R; DEMIRCI, T; AKIN, N. In vitro assessment of probiotic and virulence potential of *Enterococcus faecium* strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. **LWT**, v. 141, n. 110908, p.1-9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110908>. Acesso em 10 de jun. 2023.



PATEL, C; PATEL, P; ACHARYA, S. Therapeutic Prospective of a Spore – Forming Probiotic – *Bacillus clausii* UBBC07 Against Acetaminophen – Induced Uremia in Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 253-258, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09540-x>. Acesso em: 13 de jun. de 2023.

PLOMER, M; PEREZ, M; GREIFENBERG, D. M. Effect of *Bacillus clausii* Capsules in Reducing Adverse Effects Associated with *Helicobacter pylori* Eradication Therapy: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 9, p. 867-878, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00333-2>. Acesso em: 14 de jun. de 2023.

PRADHAN, D; MALLAPPA, R. H; GROVER, S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control**, v.108, n. 106872, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106872>. Acesso em: 12 de jun. de 2023.

PRAKASH, V; VEEDU, A. P. V. P; BABU, P; JOTHISH, A; NAIR, S. S; SUHAIL, A; PRABHAKAR, M; RAJAN, R; PRIYANKA, S; G-NAIR, B; AMIGO, S.2020. *Lactobacillus fermentum* strains from rice water and lemon pickle with potential probiotic properties and wastewater treatment applications. **Research Square**, v. 1, p.1-29, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-37101/v1>. Acesso em: 15 de jun. de 2023.

SABO, S. S; MENDES, M. A; ARAÚJO, E. S; MURADIAN, L. B. A; MAKIYAMA, E. N; BLANC, J. G; BORELLI, P; FOCK, R. A; KNÖBL, T; OLIVEIRA, R. P. S. Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. **Scientific Reports**, v.10, n. 7235, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64038-9>. Acesso em: 11 de jun. 2023.

SALIBA, L; ZOUMPOPOULOU, G; ANASTASIOU, R; HASSOUN, G; KARAYIANNIS, Y; SGOURAS, D; TSAKALIDOU, E; DEIANA, P; MONTANARI, L; MANGIA, N. Probiotic and safety assessment of *Lactobacillus* strains isolated from Lebanese Baladi goat milk. **International Dairy Journal**, v.120, n.105092, p.1-10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105092>. Acesso em 16 de jun de 2023.

SHARMA, A; LAVANIA, C; SINGH, R; LAL, B. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n.3. p. 1622-1632, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.062>. Acesso em: 14 de jun de 2023.

TOPÇU, K. C; KAYA, M; KABAN, G. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma. **LWT**, v. 134, n. 110216, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110216>. Acesso em: 11 de jun. de 2023.

VECCHIONE, A; CELANDRONI, F; MAZZANTINI, D; SENESI, S; LUPETTI, A; GHELARDI, E. 2018. Compositional Quality and Potential Gastrointestinal Behavior of Probiotic Products Commercialized in Italy. **Frontiers in medicine**, v. 5, n. 59, p. 1-19. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00059>. Acesso em: 08 de jun. de 2023.

ZHU, Y; WANG, Z; BAI, L; DENG, J; ZHOU, Q. Biomaterial-based encapsulated probiotics for biomedical applications: Current status and future perspectives. **Materials & Design**, v. 210, n. 110018, p. 1-19, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110018>. Acesso em: 08 de jun. de 2023.