

Desenvolvimento de geleia de ameixa seca contendo *Bacillus clausii*

Development of prune jelly containing *Bacillus clausii*

Desarrollo de jalea de ciruela que contiene *Bacillus clausii*

Recebido: 08/12/2022 | Revisado: 27/12/2022 | Aceitado: 29/12/2022 | Publicado: 01/01/2023

Thainá de Melo Carlos Dias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1201-726X>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Brasil

E-mail: thainamcarlos@hotmail.com

Renata Cristina de Almeida Bianchini Campos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9743-4141>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Brasil

E-mail: renata.campos@ifsudestemg.edu.br

Maurilio Lopes Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8494-0873>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Brasil

E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

Isabela Campelo de Queiroz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1270-6946>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Brasil

E-mail: isabela.queiroz@ifsudestemg.edu.br

Fabiana de Oliveira Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2424-6278>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Brasil

E-mail: fabiana.martins@ifsudestemg.edu.br

Diana Clara Nunes de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4960-1467>

Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, Brasil

E-mail: dianaclara.nunes@gmail.com

Roselir Ribeiro da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1275-3088>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Brasil

E-mail: roselir.silva@ifsudestemg.edu.br

Eliane Maurício Furtado Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7621-5575>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Brasil

E-mail: eliane.martins@ifsudestemg.edu.br

Resumo

Os produtos lácteos probióticos são amplamente consumidos, porém diante do crescente número de indivíduos veganos e intolerantes à lactose, a elaboração de alimentos probióticos de origem vegetal é uma opção. Assim, objetivou-se desenvolver geleia de ameixa seca contendo *Bacillus clausii* e avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e a resistência do probiótico à digestão *in vitro*. Foram elaboradas geleias de ameixa seca contendo 10^8 esporos/g de *B. clausii* e geleias controle, que foram armazenadas a 8°C por 45 dias. Análises físico-químicas de pH, acidez, aw, compostos fenólicos e cor e análises microbiológicas da viabilidade de *B. clausii* no produto, *Salmonella* spp., fungos filamentosos e leveduras, Enterobacteriaceae, além do ensaio *in vitro* de sobrevivência do microrganismo à digestão ao trato gastrointestinal foram realizadas. A presença da bactéria no produto não interferiu em suas características físico-químicas. *B. clausii* apresentou viabilidade de 7,64 Log UFC/g no início e no final da vida de prateleira das geleias, não havendo variação significativa entre os tempos estudados. O produto apresentou-se apto para consumo, com qualidade microbiológica dentro dos padrões da legislação. Ao final do ensaio de digestão *in vitro*, no tempo 0, *B. clausii* apresentou contagem média de 7,57 Log UFC/g e no tempo 45 dias 7,30 Log UFC/g, sendo a taxa de sobrevivência em ambos os tempos > 95%. A geleia de ameixa seca foi uma ótima matriz para veicular *B. clausii*, o qual apresentou excelente taxa de sobrevivência no produto que pode ser considerado um alimento potencialmente probiótico.

Palavras-chave: Bacilos probióticos; Ameixa seca; Geleia; Resistência gastrointestinal.

Abstract

Probiotic dairy products are widely consumed, but in view of the growing number of vegan and lactose-intolerant individuals, the elaboration of probiotic foods of plant origin is an option. Thus, the objective was to develop prune jelly containing *Bacillus clausii* and to evaluate the physical-chemical, microbiological characteristics and the

resistance of the probiotic to in vitro digestion. Prune jellies containing 10^8 spores/g of *B. clausii* and control jellies were prepared and stored at 8°C for 45 days. Physical-chemical analyzes of pH, acidity, aw, phenolic compounds and color and microbiological analyzes of the viability of *B. clausii* in the product, *Salmonella* spp., filamentous fungi and yeasts, Enterobacteriaceae, in addition to the in vitro test of survival of the microorganism to digestion by gastrointestinal tract were performed. The presence of bacteria in the product did not interfere with its physicochemical characteristics. *B. clausii* showed a viability of 7.64 Log CFU/g at the beginning and end of the shelf life of the jellies, with no significant variation between the times studied. The product was suitable for consumption, with microbiological quality within the standards of the legislation. At the end of the in vitro digestion test, at time 0, *B. clausii* presented an average count of 7.57 Log CFU/g and at 45 days 7.30 Log CFU/g, with a survival rate at both times > 95 %. The prune jelly was an excellent matrix to carry *B. clausii*, which showed an excellent survival rate in the product, which can be considered a potentially probiotic food.

Keywords: Probiotic bacilli; Prune; Jelly; Gastrointestinal resistance.

Resumen

Los lácteos probióticos son ampliamente consumidos, pero ante el creciente número de personas veganas e intolerantes a la lactosa, la elaboración de alimentos probióticos de origen vegetal es una opción. Así, el objetivo fue desarrollar mermelada de ciruela pasa conteniendo *Bacillus clausii* y evaluar las características físico-químicas, microbiológicas y la resistencia del probiótico a la digestión in vitro. Se prepararon jaleas de ciruela pasa que contenían 10^8 esporas/g de *B. clausii* y jaleas de control y se almacenaron a 8°C durante 45 días. Análisis físico-químicos de pH, acidez, aw, compuestos fenólicos y color y análisis microbiológicos de viabilidad de *B. clausii* en el producto, *Salmonella* spp., hongos filamentosos y levaduras, Enterobacteriaceae, además del ensayo in vitro de supervivencia de se realizó la digestión del microorganismo por vía gastrointestinal. La presencia de bacterias en el producto no interfirió con sus características físico-químicas. *B. clausii* mostró una viabilidad de 7,64 Log UFC/g al inicio y al final de la vida útil de las medusas, sin variación significativa entre los tiempos estudiados. El producto fue apto para el consumo, con calidad microbiológica dentro de los estándares de la legislación. Al final de la prueba de digestión in vitro, en el tiempo 0, *B. clausii* presentó un recuento promedio de 7,57 Log UFC/g y a los 45 días de 7,30 Log UFC/g, con una supervivencia en ambos tiempos > 95 %. La mermelada de ciruelas pasas fue una excelente matriz para portar *B. clausii*, que mostró una excelente tasa de supervivencia en el producto, por lo que puede considerarse un alimento potencialmente probiótico.

Palabras clave: Bacilos probióticos; Ciruela pasa; Mermelada; Resistencia gastrointestinal.

1. Introdução

O interesse do consumidor por alimentos funcionais é crescente, pois são alimentos associados a diversos benefícios à saúde. Um importante representante desses produtos são os alimentos contendo probióticos, definidos como suplementos microbianos vivos (Arepally & Goswami, 2019), que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill et al., 2014).

Os alimentos probióticos disponíveis no mercado são predominantemente de base láctea, o que impede o consumo por consumidores intolerantes à lactose, alérgicos às proteínas do leite, hipercolesterolêmicos, veganos e que não apreciam o leite e seus derivados. Vale ressaltar que, ao longo dos anos, o mercado global de produtos não lácteo ou análogos do leite tornou-se um negócio multibilionário e corresponderá a, aproximadamente, 26 bilhões de dólares até 2023 (Tangyu et al., 2019). Dentre os produtos não lácteos existentes, a literatura evidencia que os vegetais e seus produtos podem ser uma boa matriz carreadora de probióticos (Martins et al., 2013; Martins et al., 2015; Shori, 2016; Bellis et al., 2021; Lillo-Pérez et al., 2021; Martins et al., 2022). Além disso, os vegetais apresentam benefícios pela sua composição nutricional com uma grande variedade de compostos capazes de diminuir o risco de várias doenças (Vivek et al., 2017; Silva et al., 2021).

O consumo de frutas e hortaliças possui um papel muito importante na diversificação da alimentação, além de fazer com que ela se torne mais nutritiva (WHO, 2003). Produtos de origem vegetal vêm sendo estudados como alternativa aos lácteos, e dentre os produtos vegetais, as geleias ganham destaque por serem um alimento comum na mesa do brasileiro e de importância para a economia do país, que possui em seu território várias frutas que podem ser empregadas para sua produção (Ministério da Educação, 2007). Formulações nutricionalmente equilibradas, com menores teores de açúcar e que atendam a forte tendência de conveniência podem ser produzidas. Nesse cenário, a incorporação de bactérias probióticas em geleias pode ser uma possibilidade de aumentar ainda mais a qualidade nutricional deste alimento. No entanto, o tratamento térmico

utilizado no processamento impede que os probióticos usuais sejam adicionados nesses produtos. Assim, esporos de bactérias probióticas podem ser uma opção no desenvolvimento de geleia por resistirem a altas temperaturas e a acidez (Silva et al., 2017), sendo *Bacillus clausii* uma alternativa.

B. clausii é uma bactéria formadora de esporos capaz de resistir à ação do trato gastrointestinal e germinar no intestino humano (Ghelardi et al., 2015), além de ser seguro para consumo como probiótico (Lakshmi, 2017). Estudos demonstraram sua capacidade de reduzir diarreia infantil; auxiliar no tratamento da osteoporose e diverticulite aguda; auxiliar na eliminação de *Helicobacter pylori*; inibir toxinas de bactérias patogênicas e melhorar efeitos colaterais oriundos do tratamento com antibióticos (Durán, 2015; Ripert et al., 2016; Dajani et al., 2017; Dar et al., 2018; Ianiro et al., 2018).

Assim, a fim de elaborar um produto de dupla funcionalidade, a adição de *B. clausii* à uma geleia de ameixa preta seca (*Prunus domestica*) é uma alternativa promissora, visto que as ameixas são ricas em fibras alimentares solúveis e insolúveis e são reconhecidas pela European Food Safety Authority (EFSA) como um alimento funcional, que auxilia na manutenção das funções normais do intestino, desde que consumidas 100 g diariamente (EFSA, 2012). Além disso, possuem sabor agradável e boas características, como cor, sabor e textura para produção de geleias. Portanto, o presente estudo visou desenvolver geleia de ameixa seca contendo *B. clausii* e avaliar características físico-químicas, microbiológicas e a resistência do probiótico à digestão *in vitro* quando veiculado na geleia.

2. Metodologia

O estudo foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba. A geleia foi desenvolvida na Unidade de Processamento de Frutas e Hortaliças, sendo que suas análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos e as análises microbiológicas e ensaio *in vitro* de digestão ao trato gastrointestinal no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Desenvolvimento da geleia de ameixa seca contendo B. clausii

As ameixas secas (*Prunus domestica*) e os flaconetes contendo *B. clausii* (Enterogermina plus - Sanofi) foram obtidos, respectivamente, no comércio local e em drogaria de Ubá, MG.

A geleia consistiu de 40% de ameixas secas, 25% de açúcar e 35% de água. As ameixas foram hidratadas em água e trituradas por, aproximadamente, 20 segundos, à temperatura ambiente em liquidificador doméstico (Facilic, Arno, Brasil). Após a obtenção da polpa, esta foi aquecida sob mistura manual em uma panela juntamente com açúcar e concentrada, aproximadamente, até 60 °Brix.

Após a concentração e resfriamento da geleia, um flaconete de *B. clausii* contendo 10^9 esporos da bactéria probiótica foi transferido para cada frasco estéril contendo o produto, a fim de se obter 10^8 esporos/g da bactéria probiótica. As geleias controle (não adicionadas de esporos de *B. clausii*) e contendo o probiótico após o envase foram armazenadas a 8 °C por até 45 dias para realização das análises. A geleia foi elaborada em 3 repetições.

Avaliação físico-química das geleias

pH, Acidez e aw

As análises de pH e acidez de ambas as geleias foram realizadas nos tempos 0 (no dia do processamento) e após 15, 30 e 45 dias de armazenamento a 8 °C. Para análise do pH, 10 g das geleias foram diluídos em 100 mL de água destilada e o pH foi medido em um pHmetro digital (Instrutherm PH-5000, São Paulo, Brasil) (Ellis, 2016), calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

Para análise da acidez, em % de ácido cítrico, foram adicionados 10 g da geleia e 100 mL de água destilada em um

erlenmeyer e logo após a mistura foi titulada com uma solução padrão de NaOH 0,1 mol/L (Impex, Diadema, São Paulo, Brasil) por volumetria potenciométrica até o pH da solução atingir a faixa de 8,2 a 8,4, que corresponde ao ponto de viragem da fenolftaleína (Clark, 2016).

A aw foi medida em medidor de atividade de água portátil (Aqualab, Pawkit, São Paulo, Brasil), conforme instrução do fabricante, nos tempos 0 e 45 dias.

Análise de cor

As análises de cor foram realizadas nos tempos 0 e 45 dias de armazenamento das geleias a 8 °C, por meio de leitura direta de reflectância das coordenadas L*, a* e b* utilizando a escala CIELAB L*, com o emprego de colorímetro (Konica Minolta CR-10, Osaka, Japão). Amostras de 50 g da geleia foram colocadas em placa de vidro de borossilicato de cerca de 3,0 mm de espessura e foram realizadas cinco leituras em diferentes pontos do produto. O valor de L*, a* e b* foi fornecido através da média desses valores.

Análise de compostos fenólicos totais

As análises de compostos fenólicos das geleias foram realizadas nos tempos 0 e 45 dias de armazenamento a 8 °C.

Foi empregado o reagente de “Folin-Ciocalteu”, de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), com as modificações propostas por Pereira (2015). A leitura da absorbância da solução final foi realizada a 760 nm em espectrofotômetro (Kasuki – IL-593-BI) calibrado com água destilada após uma hora de estabilização da reação.

Uma alíquota de 0,6 mL das amostras diluídas em água destilada foi transferida para tubo de ensaio, no qual foram adicionados 3 mL do reagente “Folin-Ciocalteu”, também diluído em água destilada 1:10 (v/v). Agitou-se a mistura que permaneceu em repouso por 3 minutos e, em seguida, foram adicionados 2,4 mL de carbonato de sódio 7,5 % (m/v) e os tubos deixados em repouso por 1 hora, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro (Kasuki – IL-593-BI) devidamente calibrado com água destilada.

A quantificação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada utilizando curva analítica construída a partir da leitura em duplicata da absorbância de soluções com diferentes concentrações de ácido gálico (0, 10, 30, 50, 100 e 150 mg/mL) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (mg AGE/100 g).

Análises microbiológicas das geleias

Análise de fungos filamentosos e leveduras, *Salmonella* spp. e *Enterobacteriaceae*

As análises microbiológicas das geleias controle e contendo *B. clausii* foram conduzidas nos tempos 0 e 45 dias de armazenamento do produto a 8 °C. Para fungos filamentosos e leveduras, 25 g das geleias foram diluídas em 225 mL de solução salina peptonada [0,85% de NaCl (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e 0,1% de peptona (Acumedia, Michigan, EUA)] em um frasco reagente, obtendo a diluição 10⁻¹, seguindo-se as diluições seriadas até a diluição 10⁻⁴. As diluições foram plaqueadas em Petrifilm (3M Petrifilm 6407/6417/6445) para fungos filamentosos e leveduras, incubando-se as placas em estufa B.O.D (Nova Técnica, NT704, Piracicaba, SP, Brasil) a 25 °C ± 1 °C, por 5 dias. Após o período de incubação foi realizada a contagem e os resultados foram expressos em UFC/g de acordo com a recomendação do fabricante.

Para avaliação da presença ou ausência de *Salmonella* spp., 25 g das geleias foram homogeneizados em 225 mL de caldo lactosado e incubados a 36 °C por 24 horas. Posteriormente, 0,1 mL de cada amostra foi adicionado ao meio de enriquecimento seletivo caldo Rappaport Vassiliadis e 1 mL ao caldo Tetrationato de Sódio, sendo incubados a 42 °C ± 0,2 °C por 24 horas e 35 °C ± 0,2 °C por 24 horas, respectivamente. Após este processo, os meios foram estriados em placas contendo

Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, Ágar Bismuto Sulfito e Ágar Entérico Hektoen e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas (Andrews et al., 2001).

As análises de Enterobacteriaceae foram realizadas por plaqueamento em placas Petrifilm (3M Petrifilm 6420/6421) que foram incubadas a 36 °C por 24 horas, sendo a contagem realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Análise de viabilidade de *B. clausii* durante a vida de prateleira das geleias

As análises de viabilidade de *B. clausii* foram realizadas no dia do processamento (tempo 0) e aos 15, 30 e 45 dias da produção da geleia, armazenada a 8 °C.

Amostras de 25 g do produto foram diluídas em 225 mL de solução salina peptonada [0,85% de NaCl (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e 0,1% de peptona (Acumedia, Michigan, EUA)] em um frasco reagente, obtendo a diluição 10⁻¹. Após este procedimento foram realizadas diluições seriadas sendo estas plaqueadas pela técnica *pour plate*, adicionando-se 1 mL de cada diluição e cerca de 20 mL de Ágar Triptona de Soja (TSA, Ionlab, Índia) nas placas de Petri. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 72 horas. Após o período de incubação foi realizada a contagem das UFC e os resultados foram expressos em Log UFC/g (Logan & De Vos, 2009).

Ensaio *in vitro* da resistência gastrointestinal de *B. clausii* veiculado na geleia de ameixa seca

O ensaio de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* da geleia contendo *B. clausii* foi realizado no tempo 0 e aos 45 dias de armazenamento do produto a 8 °C, segundo Bedani, et al., (2013).

A primeira etapa do ensaio *in vitro* consistiu na simulação do estômago (fase gástrica). A partir da diluição 10⁻¹ da amostra em solução salina 0,85 %, foram transferidas alíquotas de 10 mL para frascos de diluição de 100 mL. O pH foi ajustado para 2,3 – 2,6 com HCl 1 mol/L (Impex, Diadema, São Paulo, Brasil), que corresponde ao pH do estômago, sendo adicionado aos frascos 3 g/L de pepsina (P7000-25G, isolada de mucosa gástrica de porco, Sigma-Aldrich) e 0,9 mg/L de lipase (534838-10G, Amano lipase G, isolada de *Penicillium camemberti*, Sigma Aldrich). Em seguida os frascos foram incubados a 37 °C por 2 horas em incubadora shaker SOLAB (Tecnal TE – 424, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com agitação a 150 rpm.

Após este período, foi realizada a simulação do intestino delgado (fase entérica I). Nesta fase, o pH foi ajustado para 5,4 – 5,7, que corresponde ao pH do intestino delgado, empregando-se solução de fosfato de sódio pH 12 [(150 mL de NaOH 1 mol/L (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil); 14 g de NaH₂PO₄ · 2H₂O (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)] contendo bile (B8381-25G, bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (P1625-100G, pancreatina isolada de pâncreas de suíno, Sigma-Aldrich), na proporção de 10,0 g/L e 1,0 g/L, respectivamente. Os frascos também foram incubados a 37 °C por 2 horas em incubadora com agitação a 150 rpm.

A simulação do intestino grosso (fase entérica II) foi realizada após a fase entérica I, ou seja, após 4 horas do início do ensaio *in vitro*. O pH foi ajustado para 6,8 – 7,2, referente ao pH do intestino grosso, utilizando a mesma solução empregada na fase entérica I. Os frascos também foram incubados a 37 °C por 2 horas em incubadora com agitação a 150 rpm, perfazendo um total de 6 horas de digestão.

Ao final de cada ciclo de incubação (2, 4 e 6 horas), correspondentes às simulações das fases gástrica e entéricas I e II, com o intuito de verificar a viabilidade de *B. clausii*, foram retirados 1 mL de cada fase, feitas as diluições seriadas em solução salina (0,85% de NaCl) e realizado o plaqueamento das amostras pela técnica *pour plate* em Ágar TSA. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas e os resultados das contagens foram expressos em log UFC/g.

A taxa de sobrevivência da bactéria ao final do ensaio *in vitro* foi analisada segundo Guo et al. (2009), empregando-se a seguinte equação: Taxa de sobrevivência (%) = Log UFC N1/Log UFC N0 x 100%, em que N1= contagem de células

probióticas ao final do ensaio *in vitro* e N0 = contagem de células probióticas antes do ensaio *in vitro*.

Delineamento experimental

O experimento para as variáveis pH, acidez e viabilidade foi conduzido em esquema fatorial 2x4, sendo duas geleias (com e sem probiótico) e quatro tempos (0, 15, 30 e 45 dias) e os resultados submetidos a ANOVA fatorial e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para as variáveis cor e compostos fenólicos o experimento foi conduzido em esquema fatorial 2x2, sendo duas geleias (com e sem probiótico) e dois tempos (0 e 45 dias) e os resultados submetidos a ANOVA fatorial e teste T.

No ensaio *in vitro* de digestão da geleia, o experimento foi conduzido em esquema fatorial será 2x2x3, com duas geleias (com e sem probiótico), dois tempos (0 e 45 dias) e três fases (Gástrica, Entérica I e Entérica II) e os resultados submetidos a ANOVA fatorial e teste de Tukey ($p < 0,05$).

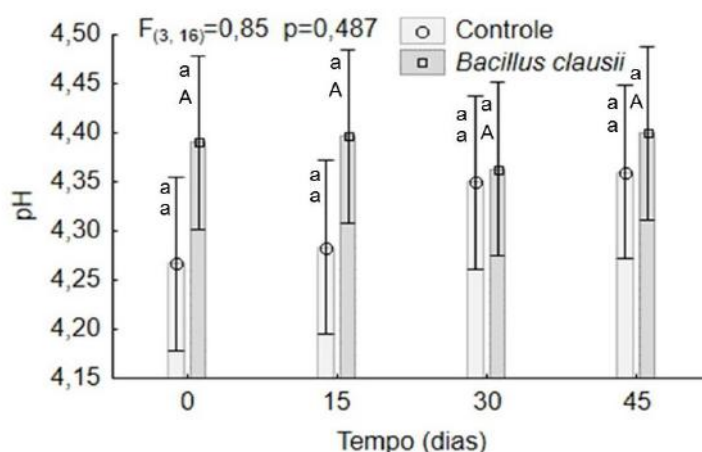
Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Teste de normalidade Shapiro), antes de serem submetidos à ANOVA.

3. Resultados e Discussão

Qualidade físico-química das geleias

Não houve alteração significativa no pH das geleias ao longo do tempo de armazenamento ($p > 0,05$), mas houve diferença entre os tratamentos (Figura 1). Essa diferença pode ser explicada pelo fato do probiótico ser adicionado na forma de uma suspensão de pH 7,0, o que pode ter alterado o pH das geleias. No entanto, verificou-se que *B. clausii* não alterou o pH da matriz ao longo do tempo, mantendo a estabilidade do produto ao longo da vida de prateleira. Diferente do presente estudo, Randazzo et al. (2013) inocularam estirpes selvagens de *Lactobacillus rhamnosus* em geleia de pêssego e verificaram alteração do pH durante o período de estocagem.

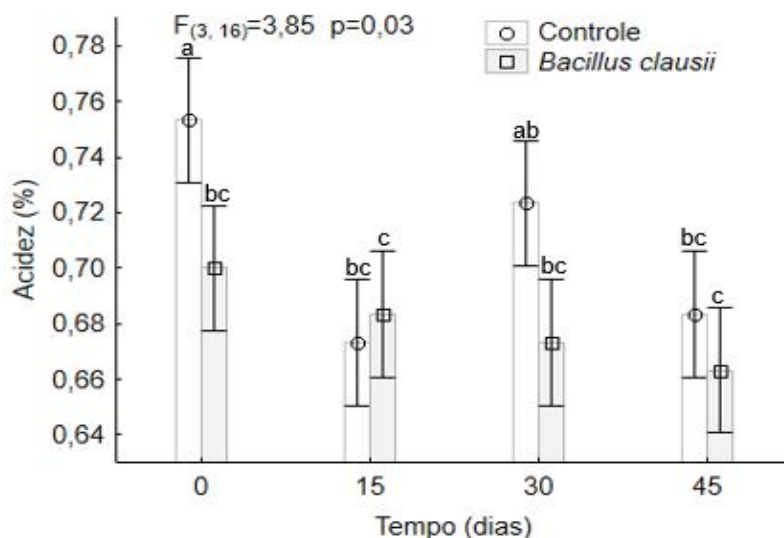
Figura 1 – Resultados médios de pH da geleia controle e contendo *B. clausii* durante 45 dias de vida de prateleira a 8 °C.



Fonte: Dados da pesquisa.

Verificou-se variação de acidez das geleias entre os tempos e entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 2). Comparando o início da vida de prateleira (tempo 0) e o tempo 45 dias, observou-se diferença entre as geleias controle, mas o mesmo não foi evidenciado para as geleias contendo *B. clausii*, indicando que a bactéria também não alterou a acidez do produto durante a estocagem.

Figura 2 – Resultados médios de acidez da geleia controle e contendo *B. clausii* durante 45 dias de vida de prateleira a 8 °C. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



Fonte: Dados da pesquisa.

A atividade de água (a_w) média das geleias de ambos os tratamentos foi de 0,85, estando o valor adequado (Ergun et al., 2010), por evitar a multiplicação de bactérias patogênicas.

Não houve alteração de compostos fenólicos e cor ($p > 0,05$) das geleias ao longo do tempo e nem entre os tratamentos (Tabela 1).

As ameixas possuem elevado valor nutritivo, sendo ricas em compostos fenólicos (Walkowiak-Tomczak, 2008). Kim e Padilla-Zakour (2004) ao avaliarem o teor de compostos fenólicos de geleias de dois cultivares de ameixas frescas com 50% da fruta, encontraram 144,3 +/- 9,4 e 141,0 +/- 6,8 mg AGE/100 g, concentração bem menor do que o encontrado na presente pesquisa. De acordo com Gil et al. (2002) a casca das frutas contém maiores quantidades de compostos fenólicos que a polpa e, além disso, a secagem remove parte da água presente nas frutas, concentrando os nutrientes, o que pode explicar a diferença de teores de compostos fenólicos totais da geleia de ameixa fresca supracitada para a geleia de ameixa seca da presente pesquisa.

Tabela 1 - Resultados médios de compostos fenólicos (em mg AGE/100g) e cor da geleia de ameixa seca controle e inoculada com *B. clausii*

Tratamentos	Tempo (dias)	Característica físico química			
		Compostos fenólicos	Cor		
			L*	a*	b*
Controle	0	2001,43 ± 59,15 a	20,50 ± 0,70 a	5,36 ± 2,45 a	2,56 ± 0,85 a
	45	2011,03 ± 110,35 a	21,00 ± 2,53 a	3,10 ± 0,45 a	3,30 ± 0,65 a
Geleia probiótica	0	2004,30 ± 154,30 a	21,90 ± 2,22 a	4,33 ± 1,70 a	3,10 ± 1,45 a
	45	1952,43 ± 195,95 a	20,23 ± 0,55 a	3,96 ± 1,25 a	3,60 ± 0,26 a

Fonte: Dados da pesquisa.

As ameixas contêm quantidades significativas de compostos fenólicos (184 mg/100 g), como ácidos clorogênico e neoclorogênico (Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001), e existem fortes evidências de que os polifenóis são capazes de exercer efeito prebiótico (Alves-Santos et al., 2020), como foi observado no estudo de Baenas et al. (2020) com framboesas. Assim, a elevada concentração de fenólicos totais pode ter auxiliado na sobrevivência *B. clausii* ao longo da vida de prateleira da geleia de ameixa seca.

Os resultados de L^* , a^* e b^* de ambas as geleias tenderam para cor escura, com valores de L^* menores e valores de a^* e b^* positivos, em direção ao vermelho amarronzado, típico de geleia de ameixa seca. No estudo de Randazzo et al. (2013), *L. rhamnosus* não alterou os parâmetros de cor da geleia de pêssego, semelhante ao presente estudo. Esse resultado é muito positivo, pois é desejável que os probióticos não alterem as características físico-químicas da matriz alimentar em que estão inseridos.

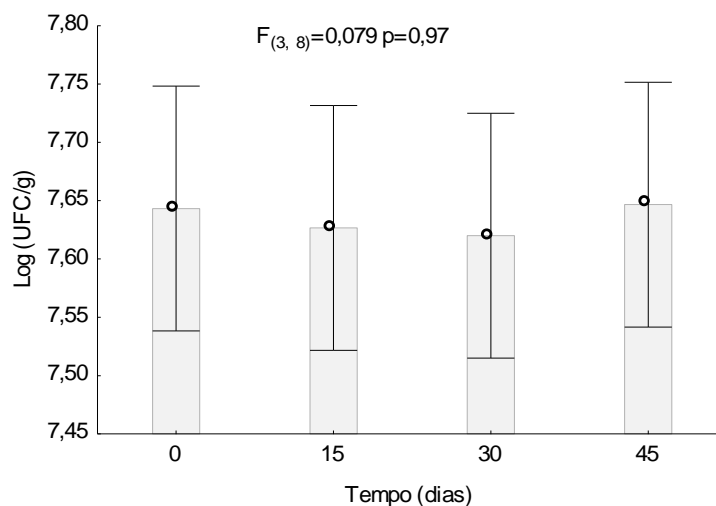
Qualidade microbiológica das geleias

As amostras das geleias controle e contendo *B. clausii* armazenadas a 8 °C por 45 dias apresentaram ausência de *Salmonella* em 25 g do produto e contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras e Enterobacteriaceae $< 1,0 \times 10^1$ UFC/g do produto. Os resultados demonstram que a geleia esteve apta para consumo humano de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2019a; Brasil, 2019b).

Viabilidade de *B. clausii* nas geleias

A viabilidade do probiótico se manteve constante durante a vida de prateleira da geleia de ameixa ($p > 0,05$) (Figura 3) e a contagem permaneceu acima de 7,6 Log UFC/g, o que é ideal para produtos probióticos. Essa contagem sugere que a geleia de ameixa é uma ótima matriz para *B. clausii*, o que pode estar relacionado a constituição da fruta, como seu conteúdo de fibras. De acordo com Szlufman e Shemesh (2021), certas fibras alimentares podem preservar a eficácia do probiótico, atuando como suporte para a colonização dos bacilos probióticos por meio da formação de interações simbióticas. Assim, as fibras podem essencialmente promover proteção dos esporos de bacilos contra vários estresses ambientais e físicos.

Figura 3 - Viabilidade média de *B. clausii* em geleia de ameixa seca durante 45 dias de vida de prateleira.



Fonte: Dados da pesquisa.

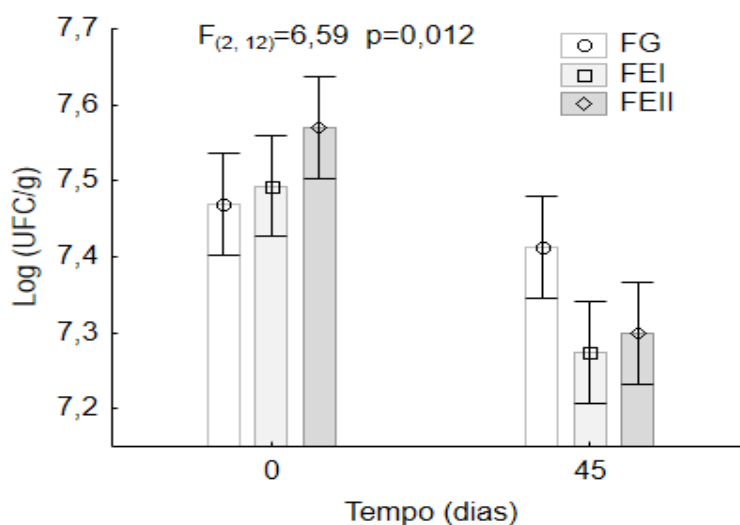
Miranda et al. (2020) elaboraram bala de gelatina sabor juçara e maracujá adicionada de *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 e obtiveram contagens acima de 6,4 Log UFC/g ao longo de 90 dias de vida de prateleira do produto, contagem menor do que a do presente estudo. Além desse estudo, Soto-Caballero et al. (2021) enriqueceram maçãs fatiadas com *B. coagulans* e obtiveram contagens de 4×10^7 UFC g⁻¹, encorajando ainda mais as pesquisas relacionadas à adição de bactérias probióticas do gênero *Bacillus* em alimentos.

A legislação brasileira regulamenta que para um alimento ser considerado probiótico, sua contagem deve estar entre 10^8 a 10^9 UFC/g na recomendação diária do produto (BRASIL, 2018), portanto o consumo de 10 gramas da geleia é capaz de fornecer a quantidade mínima exigida. Por outro lado, literaturas internacionais sugerem que contagens de 10^6 a 10^7 UFC/g já são capazes de exercer um efeito probiótico (Martins et al., 2022), estando a contagem na geleia elaborada de acordo também com as diretrizes internacionais.

Sobrevivência de *B. clausii* veiculado na geleia de ameixa seca à simulação *in vitro* do trato gastrointestinal

Constatou-se redução de, aproximadamente, 0,3 ciclos Log da contagem de *B. clausii* ao longo do tempo, e diferença significativa entre as fases no tempo 45 dias ($p < 0,05$), entretanto não se verificou interação entre as fases ($p > 0,05$) do estudo *in vitro* no tempo 0 (Figura 4). Apesar da ligeira redução de viabilidade no final da vida de prateleira da geleia, a contagem do probiótico na fase entérica II, que simula a digestão na porção final do intestino, esteve acima de 7,0 Log UFC/g. Para que um alimento seja considerado probiótico, é requisito da FAO que o microrganismo sobreviva à passagem pelo trato gastrointestinal. A princípio, segundo Fioravanti e Morgano (2021), os modelos de digestão *in vitro* são uma alternativa aos modelos *in vivo* para o estudo de ingredientes alimentares, fornecendo resultados precisos em pouco tempo. Portanto, a geleia de ameixa seca é uma ótima matriz para veicular esporos de *B. clausii* e pode ser considerada potencialmente probiótica.

Figura 4 – Viabilidade média de *B. clausii* em geleia de ameixa após ensaio *in vitro* de resistência gastrointestinal após processamento (T0) e após 45 dias de estocagem. FG (fase gástrica), FEI (fase entérica I) e FEII (fase entérica II).



Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com Guelardi et al. (2015), *B. clausii* é capaz de sobreviver à ação do trato gastrointestinal e germinar no intestino humano. Ahire, Kashikar e Madempudi (2020) não constataram redução significativa na contagem total de células viáveis de *B. clausii* UBBC07 comercial após simulação *in vitro* da bactéria no trato gastrointestinal, confirmando a capacidade desse probiótico em resistir a situações de estresse. Marcial-Coba et al. (2019) avaliando outra espécie de bacilos, *Bacillus coagulans* BC4, em pasta de tâmara seca, obtiveram contagem inicial entre 7,87 e 8,12 log UFC/g, não havendo perda significativa da contagem da bactéria ao longo da simulação *in vitro* do alimento no trato gastrointestinal.

Os ensaios *in vitro* que simulam os processos digestórios tem sido amplamente empregados para avaliar o comportamento dos alimentos no trato gastrointestinal e, em comparação aos ensaios *in vivo*, os métodos *in vitro* apresentam

vantagens por serem mais baratos, mais práticos, menos onerosos e trabalhosos, além de permitirem que um número elevado de amostras seja testado.

A taxa de sobrevivência de *B. clausii* foi avaliada para estimar a resistência relativa desse probiótico após o processamento e passagem pelo trato gastrointestinal simulado e verificou-se que tanto no início quanto no final da vida de prateleira da geleia, houve taxa de sobrevivência superior a 95% (Tabela 2), evidenciando seu excelente comportamento na geleia de ameixa seca.

Tabela 2 – Taxa de sobrevivência de *B. clausii* em geleia de ameixa seca armazenada a 8 °C no início e no final da vida de prateleira após ensaio *in vitro* de resistência gastrointestinal.

Tempos	Taxa de sobrevivência (%)
0 (após processamento)	99,04
45 dias	95,46

Fonte: Dados da pesquisa.

Soares et al. (2019) avaliaram a sobrevivência de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Bacillus* com propriedades probióticas em requeijão cremoso, suco de laranja pasteurizado e em pão e, independente do alimento estudado, as bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram maior viabilidade, sendo que a taxa de sobrevivência após simulação do trato gastrointestinal esteve acima de 83% para todas as bactérias deste gênero, valor significativo, porém abaixo do constatado no presente estudo. Esse resultado indica que bactérias probióticas do gênero *Bacillus* são uma ótima alternativa para serem incorporadas em alimentos, devido a sua excelente sobrevivência, tanto em produtos alimentícios, quanto na passagem pelo trato gastrointestinal, reforçando ainda que as características inerentes à bactéria a tornam uma forte candidata a fazer parte de vários alimentos de origem vegetal.

4. Conclusão

B. clausii não alterou as características físico-químicas da geleia de ameixa seca entre o início e o final da vida de prateleira e o produto atendeu os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira, sendo considerado apto para consumo.

B. clausii apresentou excelente comportamento na geleia elaborada, resistindo à simulação *in vitro* do trato gastrointestinal, na porção final do intestino, com contagens acima de 7,0 Log UFC/g no final da vida de prateleira e taxa de sobrevivência superior a 95%, sugerindo que o produto é potencialmente probiótico.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, sugere-se que *B. clausii* e outras bactérias probióticas formadoras de esporos sejam estudadas em novos alimentos de base vegetal, uma vez que são escassos na literatura trabalhos que avaliem a viabilidade destas bactérias em alimentos. Além disso, é importante que sejam realizados testes de aceitação destes produtos desenvolvidos e viabilidade das bactérias probióticas presentes neles *in vivo*.

Referências

- Ahire, J. J., Kashikar, M. S., & Madempudi, R. S. (2020). Survival and Germination of *Bacillus clausii* UBBC07 Spores in in vitro Human Gastrointestinal Tract Simulation Model and Evaluation of Clausin Production. *Frontiers in Microbiology*, 11 (1010).
- Alves-Santos, A. M., Sugizaki, C. S. A., Lima, G. C., & Naves, M. M. V. (2020). Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. *Journal of Functional Foods*, 74, (104169).
- Andrews, W. H., Flower, R. S., Silliker, J., & Bailey, J. S. (2001). *Salmonella*. In: Downes, F. P & Ito, K. (ed.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. (4a. ed.): American Public Health Association – APHA, p.357-380.

- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT- Food Science and Technology*, 99:583-593.
- Baenas, N., Nunez-Gómez, V., Navarro-González, I., Sanchez-Martínez, L., García-Alonso, J., Periago, M. J., & González-Barrio, R. (2020). Raspberry dietary fibre: Chemical properties, functional evaluation and prebiotic in vitro effect. *LWT – Food Science and Technology*, 134 (110140).
- Bedani, R., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 34:382-389.
- Bellis, P., Sisto, A., & Lavermicocca, P. (2021). Probiotic bacteria and plant-based matrices: An association with improved health-promoting features. *Journal of Functional Foods*, 87 (104821).
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2018). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 241, de 26 de julho De 2018: Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo. Brasília-DF.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2019a). Resolução RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019: Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo. Brasília-DF.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2019b). Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019: Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo. Brasília-DF.
- Clark, D. H. (2016). Fruits and Fruit Products. In: Latimer Jr., G. W. (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*. 20. ed. Rockville, USA: AOAC International, ch. 37, p. 1-39.
- Dajani, A. I., Nounou, M. A., Fayadh, M. H., Sabih, S. A., Kassim, L., & Abu, H. A. A. (2017). Modified Sequential Regimen of *Helicobacter pylori* Treatment Enforced by *Bacillus clausii* and Zinc Carnosine Complex Yields High Eradication Rates. *Advanced Research in Gastroenterology & Hepatology*, 5(3).
- Dar, H. Y., Pal, S., Shukla, P., Mishra, P. K., & Tomar, G. B., Chattopadhyay, N., & Srivastava, R. K. (2018). *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice. *Nutrition*, 54:118-128.
- Durán, J. C. G. (2015). Prevención de la Diverticulitis Aguda Recurrente con *Bacillus clausii*. *Revista Gen*, 69(1):2-6.
- Ellis, C. (2016). Vegetable Products, Processed. In: Jatimer Jr., G. W. (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international*. (20a. ed.): AOAC International. Chapter 42, p. 1-14.
- Ergun, R., Lietha, R., & Hartel, R. W. (2010). Moisture and Shelf Life in Sugar Confections. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(2):162-192.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to dried plums of ‘prune’ cultivars (*Prunus domestica* L.) and maintenance of normal bowel function (ID 1164, further assessment) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *European Food Safety Authority Journal*, 10(6).
- Food And Agriculture Organization Of United Nations (FAO), & World Health Organization (WHO) (2001/2022). *Evaluation of Health and Lactic Acid Bacteria*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina.
- Fioravanti, M. I. A., & Morgano, M. A. (2021). Uma abordagem dos ensaios *in vitro* para estimar a absorção dos minerais em fórmulas infantis. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, 24(2020098).
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Lupetti, A., & Senesi, S. (2015). Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation. *Journal of Applied Microbiology*, 119:552-559.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2002). Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:4976–4982.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11:506–514.
- Ianiro, G., Rizzatti, G., Plomer, M., Lopetuso, L., Scalfaferrì, F., Franceschi, F., Cammarota, G., & Gasbarrini, A. (2018). *Bacillus clausii* for the Treatment of Acute Diarrhea in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 10(1074).
- Kim, D. O., & Padilla-Zakour, O. I. (2004). Jam Processing Effect on Phenolics and Antioxidant Capacity in Anthocyanin-rich Fruits: Cherry, Plum, and Raspberry. *Journal Of Food Science*, 69(9).
- Lakshmi, S. G., Jayanthi, N., Saravanan, M., & Ratna, M. S. (2017). Safety assesment of *Bacillus clausii* UBBC07, a spore forming probiotic. *Toxicology Reports*, 4:62–71.
- Lillo-Pérez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., & Petzold, G. (2021). Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. *LWT- Food Science and Technology*, 151(112106).
- Logan, N. A., & De Vos, P. (2009). *Genus I. Bacillus Cohn 1872*. In: De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (ed.). *Bergey’s Manual Of Systematic Bacteriology*. 2. ed. Nova Iorque: Springer. v. 3, The firmicutes. p. 97.

- Marcial-Coba, M. S., Pjaca, A. S., Andersen, C. J., Knøchel, S., & Nielsen, D. S. (2019). Dried date paste as carrier of the proposed probiotic *Bacillus coagulans* BC4 and viability assessment during storage and simulated gastric passage. *LWT - Food Science and Technology*, 99:197-201.
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., Pinto, C. L. O., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51:764–770.
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Martins, M. L., & Rodrigues, M. Z. (2015). *Research and Development of Probiotic Products from Vegetable Bases: A New Alternative for Consuming Functional Food*. In: Rai, V. R., & Bai, J. A. (ed.). *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*. Boca Raton: CRC press, cap. 11, p. 207-222.
- Martins, E. M. F., Benevenuto, W. C. A. N., Martins, A. D. O., Benevenuto Júnior, A. A., Queiroz, I. C., Dias, T. M. C., Souza, D. A. F., Paula, D. A., & Martins, M. L. (2022). *New and trends in the development of functional foods: Probiotic dairy and non-dairy products*. In: Gopi, S., & Balakrishnan, P. (ed.). *Advances in Nutraceuticals and Functional Foods*. Boca Raton: CRC press, 2022, cap. 8, p. 199-237.
- Ministério Da Educação – Secretaria De Educação Profissional E Tecnológica. (2007). *Doces e Geleias*. Cartilhas Temáticas. Brasília. http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf3/publica_setec_doces_geleias.pdf.
- Miranda, J. S., Costa, B. V., Oliveira, I. V., Lima, D. C. N., Martins, E. M. F., Leite Júnior, B. R. C., Benevenuto, W. C. A. N., Queiroz, I. C., Silva, R. R., & Martins, M. L. (2020). Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. *LWT - Food Science and Technology*, 126(109275).
- Pereira, D. C. S. (2015). *Características físico-químicas, microbiológicas, colorimétricas e compostos bioativos de frutos da juçara armazenados em diferentes temperaturas*. 2015. 107f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, Rio Pomba.
- Randazzo, C. L., Pitino, I., Licciardello, F., Muratore, G., & Caggia, C. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Science and Technology*, 33(4):652-659.
- Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13:1–8.
- Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., & Okazaki, M. M. (2017). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. (5ª. Ed): Bluncher.
- Silva, M. M., Lemos, T. O., Rodrigues, M. C. P., Araújo, A. M. S., Gomes, A. M. M., Pereira, A. L. F., & Andrade, D. S. (2021). Sweet-and-sour sauce of assai and unconventional food plants with functional properties: An innovation in fruit sauces. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 25:100372.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152–178.
- Soares, M. B., Martinez, R. C. R., Pereira, E. P. R., Balthazar, C. F., Cruz, A. G. C., Ranadheera, S., & Sant'ana, A. S. (2019). The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Research International*, 125(108542).
- Soto-Caballero, M. C., Acosta-Muñiz, C. H., Chávez-Leal, V., González-Aguilar, G., Soria-Hernández, C. G., & Avila-Quezada, G. D. (2021). Enrichment of sliced apple fruit with *Bacillus coagulans*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 33(1):12-19.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E., Hussain, E. A., Damayanti-Wood, B. I., & Farnsworth, N. R. (2001). Chemical Composition and Potential Health Effects of Prunes: A Functional Food? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(4):251–286.
- Szlufman, C., & Shemesh, M. (2021). Role of Probiotic Bacilli in Developing Synbiotic Food: Challenges and Opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 12(638830).
- Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C. J., & Wittmann, C. (2019). Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:9263-9275.
- Vivek, K., Mishra, S., & Pradhan, R. C. (2017). Physicochemical characterization and mass modelling of Sohiong (*Prunus nepalensis* L.) fruit. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(2):923-936.
- Walkowiak-Tomczak, D. (2008). Characteristics of plums as a raw material with valuable nutritive and dietary properties – a review. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 58(4):401-405.
- World Health Organization (WHO). (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation*. Geneva: WHO. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;jsessionid=9944838929D2A7BBDOCE612382341760?sequence=1.