

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**SELEÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BACTÉRIAS
ÁCIDO-LÁTICAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS
OBTIDAS DE FRUTOS DO BACUPARI (*Rheedia gardneriana*)**

GABRIELA FACHINE BRITO

PALMAS- TO
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**SELEÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BACTÉRIAS
ÁCIDO-LÁTICAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS
OBTIDAS DE FRUTOS DO BACUPARI (*Rheedia gardneriana*)**

GABRIELA FACHINE BRITO

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos.

Orientador: Dr. Raphael Sanzio Pimenta.

Co-Orientadora: Dra. Eskálath Morganna Silva Ferreira.

PALMAS- TO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

B862s Brito, Gabriela Fachine.

SELEÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS OBTIDAS DE FRUTOS DO BACUPARI (*Rheedia gardneriana*) . / Gabriela Fachine Brito. – Palmas, TO, 2022.

71 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2022.

Orientador: Raphael Sanzio Pimenta

Coorientadora : Eskálath Morganna Silva Ferreira

1. Probióticos. 2. Microencapsulação. 3. Microbiologia. 4. Bactérias ácido-láticas. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**SELEÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO DE BACTÉRIAS
ÁCIDO-LÁTICAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS
OBTIDAS DE FRUTOS DO BACUPARI (*Rheedia gardneriana*)**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 10 de dezembro de 2021, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Profa. Dra. Deisy Alessandra Drunkler
UTFPR



Profa. Dra. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos
UFT



Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta
Orientador / UFT

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas; a Ele, pois a glória eternamente (Romanos, 11:36).

Um agradecimento especial a minha mãe Lilian, meu pai Pascual (*in memoriam*), meu marido Thalisson, minha filha Amora e meus pets. Vocês foram e são o meu combustível. Amo todos vocês e obrigada por tanto.

Agradeço o meu orientador, professor doutor Raphael Sanzio Pimenta, pela paciência, incentivo e carinho... tornando a experiência do mestrado inesquecível.

Agradeço a professora doutora Juliana Fonseca Moreira pela amizade, apoio e compreensão durante toda essa jornada... com certeza se todos os professores fossem como você o mundo seria bem melhor.

Agradeço a professora doutora Eskálath Morganna Silva, que foi um grande presente que o mestrado me deu... pois com você tive muito aprendizado; entendi a importância da pesquisa e da ciência e senti o amor pela docência.

Agradeço a Universidade Federal do Tocantins (UFT) pelo apoio concedido, sendo minha morada nestes últimos dois anos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que me permitiu por quase 2 anos uma formação acadêmica diferenciada e de qualidade.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pela oportunidade de fazer parte de um curso que preza tanto pelo desenvolvimento da ciência em nossa região.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) que me forneceu todos os insumos e apoio metodológico necessários que me auxiliassem no desenvolvimento do projeto.

Agradeço as professoras doutoras Claudia Auler e Deisy Drunkler, que contribuíram de forma relevante para que esse projeto fosse mais bem estruturado e desenvolvido.

Um agradecimento especial aos colegas do mestrado e colegas do laboratório, aos quais fizeram essa vivência ser ainda mais satisfatória e agradável.

Eu acredito que durante a nossa trajetória a gente carrega um pedacinho do outro dentro de nós... e com certeza, levarei um pedacinho de cada um de vocês dentro de mim.

Gratidão!

RESUMO

Os frutos disponíveis na região amazônica, dentre eles o bacupari, ainda são pouco explorados e podem apresentar uma variável possibilidade de bioprospecção não somente de novas substâncias, mas também de novos microrganismos que possam ter potencial probiótico. No que se refere a ecologia microbiana autóctone do bacupari, existem poucos estudos até o momento, sendo que estas informações podem constituir uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos aplicados à alimentos. Bactérias ácido-láticas (BAL) são as mais comumente encontradas durante o processo fermentativo espontâneo de frutos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi explorar cepas de bactérias ácido-láticas isoladas a partir da fermentação espontânea do fruto amazônico bacupari (*Rheedia gardneriana*), bem como realizar a seleção, identificação molecular e microencapsulação dos microrganismos com potencial probiótico. Um total de 97 bactérias ácido-láticas foram isoladas e dessas, 75 foram submetidas ao teste de resistência a temperatura de 37°C (64% (n=48) das bactérias isoladas resistiram); antagonismo frente a bactérias patogênicas (31% (n=15) mostraram atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*); tolerância a diferentes valores de pH (100% (n=4) resistiram aos pHs 5, 3 e 2 por até 3 horas); resistência aos sais biliares (100% (n=4) resistiram a uma concentração de 0,3% de sais biliares por até 6 horas); suscetibilidade a antibióticos (50% (n=2) foram multirresistentes aos antibióticos testados - ampicilina, vancomicina, gentamicina, eritromicina, cloranfenicol, clindamicina, e kanamicina) e testes de virulência (50% (n=1) não demonstrou virulência em nenhum dos testes realizados - gelatinase, produção de lipase, DNase e atividade hemolítica). Portanto, 1 cepa (20) demonstrou ter potencial probiótico e foi identificada molecularmente como *Weissella jogaejeotgali*, sendo microencapsulada pela técnica de *spray drying*. Ressalta-se que este microrganismo (20) merece destaque na pesquisa, visto que, este foi o que apresentou aspectos positivos em todos os quesitos avaliados neste estudo.

Palavras-Chave: *Weissella jogaejeotgali*, fermentação espontânea, probióticos, microcápsulas.

ABSTRACT

The fruits available in the Amazon region, including the bacupari, are still little explored and may present a variable possibility of bioprospecting not only new substances, but also new microorganisms that may have probiotic potential. With regard to the native microbial ecology of bacupari, there are few studies so far, and this information can be an important tool for the development of new biotechnological processes applied to food. Lactic acid bacteria (LAB) are the most commonly found during the spontaneous fermentation process of fruits. Thus, the objective of this work was to explore strains of lactic acid bacteria isolated from the spontaneous fermentation of the Amazonian fruit bacupari (*Rheedia gardneriana*), as well as to carry out the selection, molecular identification and microencapsulation of microorganisms with probiotic potential. A total of 97 lactic acid bacteria were isolated and of these, 75 were subjected to resistance test at a temperature of 37°C (64% (n=48) of the isolated bacteria resisted); antagonism against pathogenic bacteria (31% (n=15) showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* bacteria); tolerance to different pH values (100% (n=4) resisted to pH 5, 3 and 2 for up to 3 hours); bile salt resistance (100% (n=4) resisted a 0.3% bile salt concentration for up to 6 hours); antibiotic susceptibility (50% (n=2) were multiresistant to the antibiotics tested - ampicillin, vancomycin, gentamicin, erythromycin, chloramphenicol, clindamycin, and kanamycin) and virulence tests (50% (n=1) did not show virulence in any of the tests performed - gelatinase, lipase production, DNase and hemolytic activity). Therefore, 1 strain (20) showed probiotic potential and was molecularly identified as *Weissella jogaejeotgali*, being microencapsulated by the spray drying technique. It is noteworthy that this microorganism (20) deserves to be highlighted in the research, as this was the one that presented positive aspects in all the items evaluated in this study.

Key words: *Weissella jogaejeotgali*, spontaneous fermentation, probiotics, microcapsules.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1. O fruto bacupari	9
2.2. Microrganismos probióticos	10
2.3. Bactérias ácido-láticas (BAL)	11
2.4. Microencapsulação	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. Geral	15
3.2. Específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Coleta dos frutos	16
4.2. Fermentação espontânea	16
4.3. Isolamento e caracterização morfológica das bactérias ácido-láticas	16
4.4. Avaliação do potencial probiótico das bactérias ácido-láticas isoladas	17
4.4.1. Resistência a temperatura de 37°C	17
4.4.2. Antagonismo frente a bactérias patogênicas	17
4.4.2.1 Preparação dos microrganismos	18
4.4.2.2. Ágar <i>spot test</i>	18
4.4.2.3. Difusão em poço	18
4.4.3. Tolerância a diferentes valores de pH	19
4.4.4. Teste de resistência aos sais biliares	20
4.4.5. Análise de suscetibilidade a antibióticos	20
4.5. Avaliação da virulência das bactérias ácido-láticas	21
4.5.1. Teste da produção de Gelatinase	21
4.5.2. Teste de produção de Lipase	22
4.5.3. Teste de DNase	22

4.5.4. Verificação da Atividade Hemolítica	22
4.6. Identificação molecular dos isolados	23
4.6.1. Extração do DNA genômico	23
4.6.2. Amplificação do DNA por PCR	23
4.6.3. Sequenciamento genético das amostras	24
4.7. Elaboração das microcápsulas probióticas	24
4.7.1. Curva de crescimento	24
4.7.2. Elaboração das microcápsulas e eficiência da microencapsulação	25
4.7.3. Avaliação da viabilidade celular dos isolados microencapsulados	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Isolamento e caracterização morfológica dos isolados	27
5.2. Avaliação do potencial probiótico das bactérias ácido-láticas	29
5.2.1. Resistência a temperatura de 37°C	29
5.2.2. Antagonismo frente a bactérias patogênicas	29
5.2.3. Tolerância a diferentes valores de pH	33
5.2.4. Teste de resistência aos sais biliares	36
5.2.5. Análise de suscetibilidade a antibióticos	38
5.3. Avaliação dos fatores de virulência dos isolados selecionados	39
5.4. Identificação molecular	41
5.5. Elaboração das microcápsulas probióticas	42
5.5.1. Curva de Crescimento	43
5.5.2. Obtenção das microcápsulas, eficiência da microencapsulação e viabilidade celular	44
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A região amazônica possui uma reserva nativa rica em uma diversidade de plantas frutíferas que apresentam grande potencial econômico, tecnológico e nutricional, no qual tem despertado interesse nas indústrias de alimentos, fármacos, cosméticos e aromatizantes (CUNHA JUNIOR et al., 2020). Esse interesse é devido a uma variável possibilidade de bioprospecção, tanto para o estudo de novas substâncias, como também para a obtenção de novos microrganismos que possam apresentar diversas aplicabilidades (CHANG et al., 2018).

Dentre essa biodiversidade, os frutos regionais ainda são pouco explorados, como é o caso do bacupari, um fruto oriundo da região amazônica, obtido da planta *Rheedia gardneriana*, que pertence à família das *Clusiaceae* (BARROSO et al., 2002). Diversos estudos apontam que os frutos do bacupari podem apresentar diversas ações medicinais, tais como: atividade antimicrobiana (NALDONI et al., 2009; MAHAMODO et al., 2014), antiparasitária (PEREIRA et al., 2010; GONTIJO et al., 2012), anti-inflamatória (CASTARDO et al., 2008; SANTA-CECILIA et al., 2013), antilipogênica (JENA et al., 2002), antioxidante (FIGUEIREDO et al., 2014), fotoprotetora (ALMEIDA et al., 2008), anti-anafilática (NEVES et al., 2007), anti-HIV (REUTRAKUL, 2007), antitumoral (CUNHA, 2014), efeito antiproliferativo em células de câncer humano, agente anticárie e antiplaca bacteriana (MURATA et al., 2010), atividade leishmanicida (PEREIRA et al., 2011) e esquistossomicida (CASTRO et al., 2015). Dessa forma, sendo importante a realização de estudos que envolvam a sua utilização e o potencial desses frutos.

No que se refere a ecologia microbiana autóctone do bacupari, poucos estudos foram realizados até o momento, sendo que estas informações podem apresentar uma variável possibilidade de descobertas de novos microrganismos que possam apresentar potencial probiótico (CHANG et al., 2018). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados regularmente e em quantidades adequadas, fornecem benefícios à saúde de quem os consome (FAO/OMS, 2002), incluindo aumento da imunidade (KAJI et al., 2018), redução da população de bactérias patogênicas intestinais (WEHKAMP et al., 2004), melhoria da função intestinal (BOGSAN et al., 2014), melhoria no tratamento de alergias alimentares e redução do colesterol sérico (WANG et al., 2016; KANG et al., 2017). Além de apresentarem funções anti-inflamatórias (VAGHEF-MEHRABANY et al., 2014), antioxidantes e antidiabéticas (EJTAHED et al., 2012; DAS et al., 2015) e são utilizados para

prevenção e tratamento de alergias, alívio da constipação (SAAD et al., 2011), entre outras aplicabilidades.

Os microrganismos comumente utilizados comercialmente como probióticos, são os gêneros de bactérias *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei* e *L. paracasei*), *Enterococcus* e *Bacillus*, assim como algumas leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. (COOK et al., 2012; SAAD et al., 2011). As bactérias ácido-láticas (BAL) são produtoras de ácido lático como o principal produto metabólico da fermentação de açúcares (DELGADO et al., 2015; MONTET et al., 2014; VIJAYA-KUMARENDRA et al., 2015) e são comumente encontradas durante o processo fermentativo espontâneo de frutos, podendo apresentar potencial probiótico (SILVA et al., 2015; CHANG et al., 2018).

Para que um microrganismo seja considerado probiótico ele precisa possuir algumas características específicas, tais como: resistir a temperatura corporal de 37°C e resistir as alterações de pH, suco gástrico, pancreático e enzimas ao passar pelo trato gastrointestinal do hospedeiro. Além disso, é importante que o probiótico seja resistente também aos metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos da microbiota autóctone do indivíduo (OLIVEIRA et al., 2017). Neste caso, a sobrevivência é, evidentemente, essencial para que esses microrganismos consigam atingir e colonizar o intestino humano, sendo um dos fatores mais importantes para que as bactérias probióticas promovam os benefícios desejados (SHEU; MARSHALL, 1993).

A microencapsulação é um método que utiliza um agente encapsulante, visando proteger os microrganismos do ambiente ostensivo aos quais eles não são ou estão completamente adaptados. Entre as diversificadas técnicas de microencapsulação de probióticos disponíveis, tem-se o método físico por *spray drying*, que é indicada para microrganismos que apresentam sensibilidade ao calor, devido a sua versatilidade e ao pequeno tempo de permanência destes na câmara de secagem (ROKKA; RANTAMAKI, 2010; YING et al., 2010). A utilização da microencapsulação em probióticos é uma alternativa promissora para solucionar os problemas encontrados no decorrer do processamento de alimentos, já que o agente encapsulante forma uma cápsula que se desfaz através de um estímulo específico, liberando as substâncias ativas no local ideal (SOHAIL et al., 2011).

Desta forma, a busca por novos microrganismos com potencial probiótico gera interesse por causa da ampla possibilidade de uso no desenvolvimento de novos produtos alimentícios que forneçam benefícios além dos nutricionais básicos (ILHA et al., 2015) e o uso da microencapsulação é importante pois protege as bactérias probióticas das condições externas (YING et al., 2010). Portanto, o objetivo desse trabalho consistiu no isolamento, seleção e

caracterização de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico obtidas da fermentação espontânea de frutos do bacupari. Além disso, foi realizada a identificação molecular e a microencapsulação das bactérias selecionadas por meio da técnica de *spray drying*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O fruto bacupari

O bacupari (*Rheedia gardneriana*) é uma planta de origem amazônica e pertence à família das *Clusiaceae*, sendo representada por 21 gêneros e 182 espécies (BARROSO et al., 2002). Sua floração ocorre de julho a setembro, seus frutos são tipo baga, de coloração alaranjada, redondos ou piriformes, com cerca de 2,5 a 3,5 cm de diâmetro, contendo de 1 a 3 sementes (ALMEIDA et al., 1998; DURIGAN et al., 2004). Os frutos são arredondados, indeiscentes e doces (Figura 1). Ao chegar na fase de maturação, devem ser colhidos e armazenados a 10°C para conservação e normalmente são consumidos principalmente *in natura* (ROCHA, 2015; PINTO, 2013; CORREIA et al., 2013).

Figura 1 - Frutos do bacupari.



Fonte: autores (2021).

Segundo Schneider et al. (2020), ao realizarem um estudo pioneiro onde foram feitas análises nutricionais da farinha da polpa de frutos do bacupari, os resultados demonstraram alto valor nutricional, apresentando elevados teores de açúcares (solúveis totais $24,19 \pm 0,34\%$; redutores $8,97 \pm 0,00 \%$; não redutores $15,21 \pm 0,34\%$) e amido ($19,72 \pm 0,02\%$); conteúdo de proteínas de $5,32 \pm 0,37 \text{ g}/100\text{g}$; carboidratos $85,00 \pm 0,01 \text{ g}/100\text{g}$; e de lipídeos ($0,62 \pm 0,03 \text{ g}/100\text{g}$). Apresentou ainda teor de fibras consideráveis ($16,79 \pm 10,36 \text{ g}/100\text{g}$) e elevado valor energético ($366,8 \text{ kcal}/100\text{g}$) devido a concentração dos nutrientes, principalmente de carboidratos. Dessa forma, é importante a realização de estudos que envolvam a utilização e o potencial desses frutos, visto a riqueza nutricional observada.

A comercialização dos frutos do bacupari ainda é feita por populações regionais de forma extrativista, sendo ainda pouco explorada tanto no mercado interno brasileiro quanto no

exterior (MARQUES, 2014). Por outro lado, esta espécie apresenta variada composição química com atividades biológicas distintas, e vem ganhando bastante destaque devido ao seu potencial medicinal (SANTA-CECÍLIA et al., 2013). Algumas partes da planta do bacupari são utilizadas na medicina popular para tratar algumas enfermidades, como por exemplo, as sementes maceradas e a resina liberada pelo tronco, que são utilizadas no tratamento de ferimentos e contusões (POTT; POTT, 1994).

Os frutos além disso, destacam-se por apresentarem compostos com várias atividades biológicas, tais como: atividade antimicrobiana (NALDONI et al., 2009; MAHAMODO et al., 2014), antiparasitária (PEREIRA et al., 2010; GONTIJO et al., 2012), anti-inflamatória (CASTARDO et al., 2008; SANTA-CECILIA et al., 2013), antilipogênica (JENA et al., 2002), antioxidante (FIGUEIREDO et al., 2014), fotoprotetora (ALMEIDA et al., 2008), anti-anafilática (NEVES et al., 2007), anti-HIV (REUTRAKUL, 2007), antitumoral (CUNHA, 2014), efeito antiproliferativo em células de câncer humano, agente anticárie e antiplaca bacteriana (MURATA et al., 2010), atividade leishmanicida (PEREIRA et al., 2011) e esquistossomicida (CASTRO et al., 2015).

2.2. Microrganismos probióticos

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde e bem-estar ao hospedeiro (FAO, 2002). Sabe-se que, universalmente, os probióticos são consumidos para manter ou promover o balanceamento da microbiota intestinal (SANDERS et al., 2019). E a sua utilização promove uma melhora a imunidade do hospedeiro, uma vez que ocasiona a proliferação de microrganismos benéficos em contrapartida dos microrganismos patogênicos, enfraquecendo a microbiota maléfica (FARIA, 2017).

Vários efeitos benéficos a saúde já foram relatados em estudos que avaliaram a utilização dos probióticos no organismo humano, como: fortalecimento e aumento da imunidade (PALOMAR et al., 2017); capacidade de decomposição dos ácidos biliares (RAMASAMY et al., 2010); diminuição nos níveis de colesterol sérico (JONES et al., 2012); diminuição da pressão sanguínea (MAHBOOBI et al., 2014); melhora na absorção de minerais como o ferro e o cálcio (DUBEY; PATEL, 2018); produção de vitaminas (LEBLANC et al., 2015); melhora da digestão e redução da intolerância à lactose (ALMEIDA et al., 2012); atividade anticarcinogênica (ZENE et al., 2017); entre outros.

Todavia, para que esses microrganismos possam alcançar os sítios intestinais específicos e exercer essas funções, esses devem apresentar características próprias que possam

causar efeito benéfico ao hospedeiro, como: não ser patogênico, não produzir toxicidade ou efeitos adversos; ter a capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal em número de células viáveis adequadas, desde o processo de fabricação e armazenamento até sua administração, para produzir os efeitos desejáveis (SANCHEZ et al., 2015; SANDERS et al., 2019; FONTANA et al., 2013).

Dentre os microrganismos comumente utilizados comercialmente como probióticos, as bactérias que pertencem aos gêneros *Lactobacillus* - com destaque para as espécies: *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. paracasei*, e outros gêneros como *Enterococcus* e *Bacillus* também são utilizados, assim como algumas leveduras (COOK et al., 2012; SAAD et al., 2011). Além destes, as espécies de *Weissella* sp. têm grande potencial em sua aplicação em alimentos e por isso vem sendo cada vez mais estudadas (LEE et al., 2015).

A avaliação do potencial de cepas probióticas está sujeita a alguns critérios para sua utilização, tais como: tolerância ao estresse relacionado com as condições gastrointestinais desfavoráveis; capacidade de adesão no trato gastrointestinal; atividade antimicrobiana associada à produção de metabólitos e competição com agentes patogênicos; avaliação do perfil de segurança como a produção de enterotoxinas e o risco de transferência de genes de resistência a antibióticos (PAPADIMITRIOU et al., 2015; PEREIRA et al., 2018).

Vários fatores podem afetar a viabilidade dos probióticos e neste caso, a sobrevivência é, evidentemente, essencial para que esses microrganismos consigam atingir e colonizar o intestino humano, sendo um dos fatores mais importantes para que as bactérias probióticas promovam os benefícios para a saúde do hospedeiro (FERREIRA et al., 2018). Para tanto, diferentes técnicas podem aumentar a resistência desses microrganismos, dentre estas, destaca-se a microencapsulação. No qual se caracteriza como uma alternativa promissora para aumentar a viabilidade e sobrevivência destes microrganismos durante a passagem pelo trato digestório do indivíduo (VANISKI et al., 2017).

2.3. Bactérias ácido-láticas (BAL)

As bactérias ácido-láticas são um grupo de bactérias caracterizadas como cocos ou bastonetes gram-positivos, anaeróbios, não móveis, não esporulados, catalase negativo e produtores de ácido lático como o principal produto metabólico da fermentação de açúcares (DELGADO et al., 2015; MONTET et al., 2014; VIJAYA-KUMARENDRA et al., 2015).

As BAL são comumente encontradas durante o processo fermentativo espontâneo de frutos e podem apresentar potencial probiótico (SILVA et al., 2015; CHANG et al., 2018), com possíveis aplicações no desenvolvimento de novos produtos, tais como iogurtes, queijos,

chucrute, pães, presuntos, azeitonas, picles, molho de soja, entre outros, em decorrência de suas atividades metabólicas (BERISTAIN-BAUZA et al., 2016). O que indica que esse grupo de bactérias possui um desenvolvimento adequado quanto à utilização de açúcares disponíveis na fermentação, produzindo ácidos orgânicos ou outros metabólitos importantes no desenvolvimento de alimentos (BOURDICHON et al., 2012).

A maioria dos probióticos comercialmente disponíveis para o consumo humano são BAL aplicadas em produtos alimentícios, que podem ser obtidas da fermentação de lácteos, de legumes e de frutas (DELGADO et al., 2015; MONTET et al., 2014; VIJAYA-KUMAR et al., 2015; HAYEK; IBRAHIM, 2013).

Por se tratar de vários gêneros, como por exemplo, as bactérias ácido-láticas: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weisella* e *Bacillus*, assim como algumas leveduras (COOK et al., 2012; SAAD et al., 2011), estudos revelam que a fermentação proporcionada pelas BAL não é realizada por uma única cepa, mas por uma mistura complexa desses microrganismos (SAUER et al., 2017; PETERSEN et al., 2017; SONG et al., 2017).

A fermentação gera efeito benéfico na qualidade dos produtos e depende não apenas das características metabólicas das BAL, mas também da atividade enzimática dos substratos utilizados (GANZLE, 2014). No estudo de Rizzello et al. (2016), foi verificado que a fermentação realizada por BAL tem o potencial de melhorar as características tecnológicas, nutricionais, funcionais e sensoriais de alimentos. Além disso, aumenta o conteúdo de compostos bioativos e a captação de minerais, diminuindo o nível de fatores antinutricionais e valores da resposta glicêmica (GOBBETTI et al., 2014).

Os produtos metabólicos produzidos por este grupo de bactérias, tais como os ácidos, o peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas, também possuem a importância de inibir o crescimento de outras bactérias e fungos possivelmente patogênicos (GUPTA; SRIVASTAVA, 2014). A nisina, por exemplo, é produzida por *Lactococcus lactis*, sendo um conservante antimicrobiano comumente utilizado para impedir o crescimento de patógenos específicos e deterioração causada por bactérias (SILVA et al., 2018).

A obtenção de novas cepas de bactérias probióticas assim como o estudo do comportamento destes probióticos é de considerável interesse para serem utilizados na preservação de alimentos e na manutenção da saúde humana. As características antagonistas desse grupo contra os patógenos de origem alimentar têm sido estudadas, principalmente no grupo de BAL, mostrando ações antagonistas frente a bactérias patogênicas e deteriorantes (WAN et al., 2018).

O gênero *Weissella* é composto por bactérias classificadas como gram-positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos, morfologia cocóide ou bacilos curtos e pertencem ao grupo das bactérias lácticas (BAL), caracterizadas principalmente pela produção de ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos (COLLINS et al., 1993).

As espécies de *Weissella* estão distribuídas em diferentes *habitats*, como solos, ordenhadeiras, cana-de-açúcar e algumas cepas com características tecnológicas interessantes foram isoladas de alimentos fermentados, como queijos, leite cru, vegetais e leite fermentados (BJORKROTH et al., 2009; VITALI et al., 2012; PATEL et al., 2013; YANG et al., 2014).

Do ponto de vista da tecnologia de alimentos, algumas cepas do gênero *Weissella* apresentam potencial na produção de exopolissacarídeos e oligossacarídeos não digeríveis, estando também envolvidas no controle de doenças de origem alimentar pela produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (PAPAMANOLI et al., 2003).

Algumas cepas mostraram atividade antagonica contra patógenos devido à produção de diversos compostos como bacteriocinas, ácidos orgânicos, hidrogênio, peróxido, entre outros (FUSCO et al., 2015; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018; GOH; PHILIP, 2015; YU et al., 2019; TRIAS et al., 2008).

2.4. Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica que consiste no revestimento do material ativo com um material encapsulante, formando cápsulas em miniaturas e seladas, que tem a capacidade de liberar seu conteúdo de forma controlada sob a influência de estímulos específicos (PEREIRA et al., 2018).

Vários estudos mostraram que a viabilidade de microrganismos probióticos pode ser melhorada incorporando-os dentro de microcápsulas (GONZALEZ-FERRERO et al., 2020; LEE et al., 2019; MARCIAL-COBA et al., 2018; MAWAD et al., 2018; MIRTIC et al., 2018; TIANI et al., 2018; YAO et al., 2020; YEUNG et al., 2016).

O material encapsulante deve ser seguro e compatível tanto com o material a ser encapsulado quanto a técnica a ser utilizada, além de fornecer proteção máxima ao material encapsulado em condições desfavoráveis (SOARES, et al., 2016). Os agentes encapsulantes mais empregados são os carboidratos (maltodextrina, goma arábica, alginatos, carragena, pectina, quitosana, entre outros) e as proteínas (proteínas de leite e do soro de leite, proteínas vegetais, gelatina, caseinato de sódio, entre outros) (VANISKI, et al., 2017).

Uma prática comum é associar pelo menos dois agentes encapsulantes para melhorar a eficiência da encapsulação e geralmente, mistura-se carboidratos e proteínas (KOÇ, et al., 2015). Dentre os agentes proteicos, o leite desnatado em pó contém cálcio de forma abundante, o que pode proteger as células contra o estresse térmico, pois a membrana citoplasmática combinada com as proteínas do leite forma um aglomerado celular, amortecendo tensões causadas pela rápida desidratação e elevação da temperatura (HUANG; CHEN, 2013).

A proteção conferida pelo leite em pó desnatado pode ser devida a presença da lactose, um dissacarídeo, que é considerado protetor da membrana citoplasmática durante a desidratação, com mecanismo similar aos dissacarídeos não-redutores, tais como trealose e sacarose (ANANTA et al., 2005).

Por outro lado, dentre os carboidratos, a maltodextrina é considerada um bom agente encapsulante por apresentar baixa higroscopicidade, evitar a aglomeração de partículas, possuir boa solubilidade e baixa viscosidade; além de ter um baixo custo, ausência de sabor e ter a característica de melhorar as propriedades de secagem (MENEZES, 2015).

Existem inúmeras técnicas de microencapsulação de probióticos que são divididas em três grandes grupos, tais como métodos físico-químicos; métodos físicos e métodos químicos (SOHAIL et al., 2011). Dentre as técnicas de microencapsulação existentes tem-se a técnica de *spray drying*, que é um método físico de fácil operação, apresenta um bom custo-benefício, bom rendimento e os microrganismos microencapsulados apresentam uma melhor estabilidade de armazenamento do que culturas novas ou armazenadas sob congelamento (ECKERT, 2016).

O processo utilizando o equipamento *Spray dryer* envolve diversificadas etapas, uma que consiste na dispersão e homogeneização do agente encapsulante, formando uma suspensão com o material ativo e de revestimento, que passa por uma câmara de secagem contendo ar quente circulante, onde o solvente é evaporado e os sólidos restantes do material de parede envolvem o conteúdo ativo, que serão despejados no ciclone ao final do procedimento, onde o produto em pó poderá ser recolhido (NUNES et al., 2015; MARTIN et al., 2015; SOARES, 2016).

A seleção do método depende do tamanho desejado da microcápsula e da aplicação que será dada à mesma, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (COOK et al., 2012; ASSUNÇÃO et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Explorar o potencial probiótico e biotecnológico de bactérias ácido-láticas isoladas a partir da fermentação espontânea do fruto amazônico bacupari (*Rheedia gardneriana*), bem como realizar a seleção, caracterização, identificação molecular, e microencapsulação dos microrganismos com potencial probiótico.

3.2. Específicos

- Isolar bactérias ácido-láticas do fruto bacupari por meio da fermentação espontânea;
- Avaliar, selecionar e caracterizar os isolados bacterianos que apresentaram potencial probiótico *in vitro*, por meio dos seguintes testes: resistência a temperatura de 37°C; antagonismo frente a bactérias patogênicas; tolerância a diferentes valores de pH; resistência aos sais biliares; e, suscetibilidade a antibióticos;
- Realizar testes de virulência (produção de gelatinase, lipase, DNase e atividade hemolítica) com as bactérias previamente selecionadas;
- Realizar a identificação molecular das bactérias selecionadas que apresentaram potencial probiótico;
- Realizar a microencapsulação das bactérias que apresentaram potencial probiótico por meio da técnica de *spray drying* e utilizando leite desnatado em pó e maltodextrina como agentes encapsulantes;
- Avaliar a viabilidade das bactérias microencapsuladas, à temperatura de refrigeração, por 60 dias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta dos frutos

Os frutos do bacupari (*R. gardneriana*) foram coletados em uma propriedade rural localizada na cidade de Aurora- TO. Posteriormente, foram armazenados em caixas isotérmicas, a fim de se manter a microbiota presente inalterada, e foram enviados sob refrigeração ao laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) da UFT - Campus Universitário de Palmas- TO.

4.2. Fermentação espontânea

Para a etapa inicial de fermentação os frutos coletados foram selecionados de acordo com o grau de integridade, sendo utilizados somente os livres de lesões, injúrias e podridões visuais. A partir dos frutos selecionados foi realizada a remoção das sujidades grosseiras e posteriormente realizada a sanitização, utilizando-se solução de hipoclorito 50 ppm durante 15 minutos, sendo em seguida lavados duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, 25 gramas dos frutos foram pesados e colocados em sacos plásticos estéreis (150 x 200 mm), macerados com o auxílio de um bastão de ferro e deixados para fermentarem espontaneamente dentro dos sacos plásticos fechados. A fermentação espontânea dos frutos foi monitorada durante um período de 15 dias, no qual foram incubados entre 28°C e 30°C (NASCIMENTO et al., 2017), onde foram realizadas 6 coletas (1 de cada saco) nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação para o isolamento das bactérias ácido-láticas.

4.3. Isolamento e caracterização morfológica das bactérias ácido-láticas

A metodologia empregada para essa etapa foi a proposta por Ribeiro (2012), com adaptações. O isolamento ocorreu nos diversos dias de incubação dos frutos em fermentação e consistiu em adicionar 225 mL de solução salina peptonada estéril em cada saco que continha as 25 gramas dos frutos de bacupari macerados. A primeira diluição foi homogeneizada em *stomacher* (Boitton, Brasil), durante 2 minutos. Posteriormente, sucessivas diluições seriadas foram realizadas até 10^{-7} . A partir de cada uma das diluições obtidas, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada em superfícies de placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar MRS (*De Man, Rogosa e Sharpe*) (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos). O meio de cultura MRS foi utilizado por favorecer o crescimento, isolamento e contagem de bactérias ácido-láticas (OKTAVIANI et al., 2021). Em seguida, as placas inoculadas foram incubadas entre 28°C e

30°C em estufa bacteriológica (*SolidSteel*, EUA) em uma condição de microaerofilia (lacradas com parafilme) durante 4 dias.

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram caracterizadas de acordo com seus aspectos macro morfológicos através da observação dos aspectos como: forma, elevação, margem, cor, brilho e tamanho. Após a obtenção de colônias puras, foram observados os aspectos morfotintoriais através do teste de coloração de Gram; e ainda caracterizadas fisiologicamente através do teste de catalase.

Os isolados foram transferidos para tubos contendo meio Ágar MRS inclinado (Difco *Laboratories* Inc., Detroit, Estados Unidos) e cobertos com óleo mineral estéril; além de serem conservados em glicerol a 20% (RHODES, 1957) para armazenamento. Todos os tubos foram mantidos em geladeira e freezer (*Consul*, Brasil) a temperatura de aproximadamente 4°C e -80°C, respectivamente.

4.4. Avaliação do potencial probiótico das bactérias ácido-láticas isoladas

Todos os isolados foram avaliados em relação ao potencial probiótico *in vitro* de acordo com os seguintes testes: resistência a temperatura de 37°C; antagonismo frente a bactérias patogênicas; tolerância a diferentes valores de pH; resistência aos sais biliares; e, suscetibilidade a antibióticos; de acordo com as metodologias descritas a seguir.

4.4.1. Resistência a temperatura de 37°C

Os isolados obtidos foram testados quanto a capacidade de crescer a 37°C. Para tanto, cada isolado foi inoculado, com uma alçada, em caldo MRS (Difco *Laboratories* Inc., Detroit, Estados Unidos) e mantidos na temperatura de 37°C por um período de 72 horas em banho maria (Solab, Brasil) e em uma condição de microaerofilia (tubos de ensaio com tampa rosqueada). Após este período, uma alíquota (10 µL) foi retirada dos tubos e foram feitos *spots*, através da técnica de microgota, em placas de Petri, contendo meio Ágar MRS (Difco *Laboratories* Inc., Detroit, Estados Unidos), e em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em microaerofilia (placas lacradas com parafilme), para confirmação da viabilidade microbiana (REHAIEM et al., 2014).

4.4.2. Antagonismo frente a bactérias patogênicas

Na avaliação de antagonismo frente a microrganismos patogênicos, os isolados obtidos foram testados contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* entérica *subsp. typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC

8739). A metodologia empregada foi a proposta por Jacobsen et al. (1999) e Vitali et al. (2012), com modificações. Todo experimento foi realizado em três repetições e as técnicas utilizadas foram: ágar *spot test* e difusão em poço, que serão descritas a seguir.

4.4.2.1 Preparação dos microrganismos

Os microrganismos isolados dos frutos do bacupari foram previamente crescidos em Ágar MRS (à 37°C por 24 h em uma condição de microaerofilia - placas de Petri lacradas com parafilme). Posteriormente, os inóculos foram padronizados a uma concentração celular de 15×10^8 UFC/mL (utilizou-se a escala de *Mc Farland* 5).

As bactérias patogênicas foram preparadas inicialmente sendo inoculadas em caldo *Brain-Heart-Infusion* (BHI) (Kasvi, Brasil) a 37°C durante 24 horas e o inóculo inicial utilizado foi ajustado com a escala de *Mc Farland* 0,5 (correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

4.4.2.2. Ágar *spot test*

Nesse método, a partir do caldo MRS inoculado com os isolados obtidos (a uma concentração celular de 15×10^8 UFC/mL), foi transferida uma alíquota de 10 µL para placa de Petri previamente preparada contendo Ágar MRS (Difco *Laboratories* Inc., Detroit, Estados Unidos), utilizando a técnica da microgota. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica (*SolidSteel*, EUA) por 24 horas em uma condição de microaerofilia (lacradas com parafilme). Decorrido esse período, foi vertida uma subcamada de 20 mL de Ágar BHI (Kasvi, Brasil) semissólido contendo uma das espécies de bactéria patogênica a ser testada (concentração celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As placas foram novamente incubadas a 37°C durante 24 horas e após esse período foi realizada a leitura para observação de halos de inibição que foram quantificados utilizando-se um paquímetro digital (*Digimess*, Brasil) (JACOBSEN et al., 1999, com modificações). O padrão utilizado para medida dos halos foi: (-) negativo (sem formação de halos); (+) fraca inibição (halos de até 4mm de diâmetro); (++) média inibição (halos de 5 a 9mm de diâmetro); (+++) forte inibição (halos acima de 10mm de diâmetro) (MORENO,1996).

4.4.2.3. Difusão em poço

Inicialmente, foi realizada a centrifugação (por 15 minutos a 14.000 rpm) do caldo MRS (Difco *Laboratories* Inc., Detroit, Estados Unidos) inoculado com os isolados obtidos (a uma concentração celular de 15×10^8 UFC/mL), onde obteve-se o sobrenadante livre de células (SLC). Posteriormente, cada uma das espécies de bactérias patogênicas a serem testadas

(concentração celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram inoculadas, com auxílio de um *swab*, em placas de Petri contendo Ágar BHI (Kasvi, Brasil). Em seguida, poços de 5 mm foram realizados nas placas e 50 μ L do SLC foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica (*SolidSteel*, EUA) por 24 horas e em uma condição de aerobiose. Decorrido o período de incubação, foi realizada a leitura dos halos de inibição utilizando-se um paquímetro digital (*Digimess*, Brasil) (VITALI et al., 2012, com modificações). O padrão utilizado para medida dos halos foi: (-) negativo (sem formação de halos); (+) fraca inibição (halos de até 4mm de diâmetro); (++) média inibição (halos de 5 a 9mm de diâmetro); (+++) forte inibição (halos acima de 10mm de diâmetro) (MORENO,1996).

4.4.3. Tolerância a diferentes valores de pH

Inicialmente os inóculos dos isolados obtidos foram previamente crescidos em Ágar MRS à 37°C por 24 horas em uma condição de microaerofilia (placas de Petri lacradas com parafilme). Posteriormente, os inóculos foram padronizados a uma concentração celular de 15×10^8 UFC/mL (utilizou-se a escala de *Mc Farland 5*). A tolerância a diferentes valores de acidez foi determinada a partir da inoculação de cada isolado em caldos MRS (*Difco Laboratories Inc.*, Detroit, Estados Unidos) com o pH ajustado previamente com Ácido Clorídrico (HCL) (1M) a diferentes valores (pH 2; pH 3; e, pH 5) com posterior incubação do caldo a 37°C durante os tempos de 0, 1, 2 e 3 horas.

Para verificação da taxa de sobrevivência dos isolados e o controle do crescimento foi utilizada a inoculação dos microrganismos no caldo MRS com um pH padrão (6,7 - sem ajustes). Em seguida, após o preparo dos inóculos nos diferentes pHs, uma alíquota de 50 μ L dos caldos foi inoculado em tempos distintos (0h, 1h, 2h e 3h) em placas de Petri contendo Ágar MRS através do equipamento *Spiral Plater* (IUL Instrumentos, Barcelona, Espanha). As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica (*SolidSteel*, EUA) por 48 horas em uma condição de microaerofilia (lacradas com parafilme) (UECKER, 2018, com modificações). Após a incubação, o número de células foi determinado por contador automático de colônias *Flash & Go* (IUL Instrumentos, Barcelona, Espanha) (SILVA et al., 2015). E foi calculada a taxa de sobrevivência aos diferentes valores de pHs de acordo com Bao et al. (2010), através da equação:

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = (\log \text{UFC } N1 / \log \text{UFC } N0) \times 100\%$$

Onde N1 corresponde a contagem de células viáveis após exposição aos diferentes pHs; e, N0 corresponde a contagem de células viáveis ao pH padrão (6,7 - sem ajustes). Todo experimento foi realizado em três repetições.

4.4.4. Teste de resistência aos sais biliares

Inicialmente os inóculos dos isolados obtidos foram previamente crescidos em Ágar MRS à 37°C por 24 horas em uma condição de microaerofilia (placas de Petri lacradas com parafilme). Posteriormente, foram padronizados a uma concentração celular de 15×10^8 UFC/mL (utilizou-se a escala de *Mc Farland 5*) e então foram adicionados em caldo MRS contendo 0,3% de sais biliares (Bacto-Oxgall, Difco®, EUA) de acordo com a metodologia proposta por Sanchez et al. (2015), com modificações. Foi utilizada a inoculação dos microrganismos no caldo MRS sem a adição dos sais biliares para o controle da verificação da taxa de sobrevivência dos isolados.

Os caldos com os sais biliares já inoculados com os microrganismos foram incubados a 37°C por 0h, 2h, 4h e 6h. Em seguida, uma alíquota foi retirada (50 µL) e foi realizada a semeadura na superfície de placas de Petri contendo Ágar MRS utilizando o equipamento *Spiral Plater*. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas em uma condição de microaerofilia (lacradas com parafilme) (GILLILAND et al., 1984, com modificações). Após a incubação, o número de células foi determinado por contador automático de colônias *Flash & Go* (SILVA et al., 2015). A taxa de sobrevivência aos sais biliares foi calculada de acordo com Bao et al. (2010), através da equação:

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = (\log \text{UFC N1} / \log \text{UFC N0}) \times 100\%$$

Onde N1 corresponde a contagem de células viáveis após exposição aos sais biliares; e, N0 corresponde a contagem de células viáveis anteriormente aos sais biliares. Todo experimento foi realizado em três repetições.

4.4.5. Análise de suscetibilidade a antibióticos

Para o teste de suscetibilidade a antibióticos, os inóculos dos isolados obtidos foram previamente crescidos em Ágar MRS à 37°C por 24 horas em uma condição de microaerofilia (placas de Petri lacradas com parafilme). Posteriormente, os inóculos foram padronizados a uma concentração celular de 15×10^8 UFC/mL (utilizou-se a escala de *Mc Farland 5*) e semeados com *swab*, em placas de Petri contendo Ágar MRS (SALMINEN et al., 1996).

Para a verificação do perfil de sensibilidade a diferentes antibióticos, foi utilizado o método da difusão em placa com discos impregnados com os seguintes antibióticos: ampicilina

(10µL), vancomicina (30µL), gentamicina (10µL), eritromicina (15µL), cloranfenicol (30µL), clindamicina (2µL), e kanamicina (30µL) (TARRAH et al., 2018). Estes foram obtidos do laboratório SENSIFAR (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

Os discos contendo cada um dos antibióticos foram adicionados às placas em pontos equidistantes, sob leve pressão, com o auxílio de uma pinça estéril. Após 1 hora sob temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37°C em estufa por 24 horas, em uma condição de microaerofilia (placas lacradas com parafilme) (NCCLS, 2003). A sensibilidade dos microrganismos foi avaliada por meio da medição dos halos de inibição ao redor dos discos de antibióticos, medidos com paquímetro e expressos em milímetros (mm). Conforme o tamanho do halo obtido (Tabela 1), os isolados foram classificados em: Resistente (R); Moderadamente Sensível (MS); e, Sensível (S), de acordo com a metodologia proposta por Charteris et al. (1998) e Lemos Junior et al. (2020). A técnica foi realizada em três repetições.

Tabela 1 - Tamanho dos halos para classificação dos isolados quanto a sua susceptibilidade aos antibióticos testados.

ANTIBIÓTICO	µL	R	MS	S
Ampicilina	10	≤12	13-15	≥16
Clindamicina	2	≤8	9-11	≥12
Cloranfenicol	30	≤13	14-17	≥18
Eritromicina	15	≤13	14-17	≥18
Gentamicina	10	≤12	-	≥13
Kanamicina	30	≤13	14-17	≥18
Vancomicina	30	≤14	15-16	≥17

Fonte: NCCLS (2003), adaptada.

4.5. Avaliação da virulência das bactérias ácido-láticas

Os isolados foram testados, a partir da análise de fatores de virulência, com o objetivo de aumentar a confiabilidade e segurança da sua utilização nas microcápsulas, sendo realizados os seguintes testes: produção de gelatinase, lipase, DNase e atividade hemolítica, como descritos a seguir.

4.5.1. Teste da produção de Gelatinase

A detecção da produção de gelatinase foi realizada de acordo com Marra et al. (2007). Os isolados selecionados dos testes anteriores foram inoculados, com uma alçada, em tubos contendo 4mL de caldo BHI (*Brain-Heart-Infusion*) acrescido com 12% de gelatina incolor (Dr. Oetker, Brasil) e foram incubados por 48 horas a 37°C. Após decorrido o período de incubação, os tubos foram acondicionados em banho de gelo por 30 min, sem agitação. O

resultado foi interpretado da seguinte forma: negativo quando o meio se apresentou sólido; e, positivo quando o meio se apresentou líquido. Todo experimento foi realizado em três repetições.

4.5.2. Teste de produção de Lipase

A produção de lipase foi realizada de acordo com Barbosa et al. (2010). Alíquotas de 2µL do sobrenadante bruto (obtidos a partir da centrifugação a 14.000 rpm por 15 min) de cada isolado, foram semeados pontualmente em placas de Petri contendo Ágar BHI (Kasvi, Brasil) suplementado com 2g/L de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) (Dinâmica, Brasil) e 10g/L de *Tween* 80 (NEON, Brasil). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e a atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias, sendo o experimento realizado em três repetições. O resultado foi considerado negativo se nenhum efeito fosse observado em torno das colônias.

4.5.3. Teste de DNase

O teste foi realizado conforme descrito por Bannerman (2003), com adaptações. Para tanto, os isolados previamente selecionados foram estriados diretamente em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar DNase (Oxoid, São Paulo, Brasil) e foram incubados por 24 horas à 37°C. Após o tempo de incubação a placa foi coberta com ácido clorídrico 1M por 3 minutos. E foi observado a formação de halos claros em torno das colônias, no qual foi considerada indicativo de resultado positivo. O resultado foi considerado negativo se nenhum efeito fosse observado em torno das colônias. Todo experimento foi realizado em três repetições.

4.5.4. Verificação da Atividade Hemolítica

Os isolados foram testados quanto a atividade hemolítica segundo Foulquié-Moreno et al. (2003), onde foram inoculados, por meio da técnica de estria simples, em Ágar Sangue (7% v/v de sangue de cavalo) e incubados a 37°C por 48 horas. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma: quando se obteve zonas verdes em torno das colônias o resultado foi considerado hemolítico (α -hemólise); quando nenhum efeito foi produzido sobre as placas foi considerado não hemolítico (γ -hemólise); e, quando zonas de lise de sangue foram identificadas ao redor das colônias considerou-se hemolítico (β -hemólise). Todo experimento foi realizado em três repetições.

4.6. Identificação molecular dos isolados

Para identificação molecular foram utilizados os isolados que foram selecionados por seus potenciais probióticos, por meio do sequenciamento do gene 16S. As metodologias de extração, amplificação e sequenciamento serão descritas a seguir.

4.6.1. Extração do DNA genômico

Os isolados foram previamente crescidos em Ágar MRS (à 37°C por 24 horas em microaerofilia - placas de Petri lacradas com parafilme), e uma alçada do crescimento recente foi ressuspensa em 100 µL de tampão de lise em tubo *ependorf* e homogeneizada em agitador *vortex* (Labor Import, Brasil) e incubada em banho maria (7Lab, Brasil) a 65°C por 30 minutos.

Posteriormente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado por inversão e centrifugado (Kasvi, Brasil) a 14.000 rpm por 10 minutos. Decorrido esse período, o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo *ependorf* e foi adicionado 100 µL de isopropanol. O tubo *ependorf* foi mantido em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos para que ocorresse a precipitação do DNA.

Em seguida, o tubo foi centrifugado por 14.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Foi adicionado ao tubo, 200 µL de etanol 70% e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 10 minutos. O etanol foi descartado por inversão e essa etapa de lavagem do DNA com etanol foi repetida por duas vezes. Em seguida, os tubos foram mantidos abertos à temperatura ambiente *overnight* para total evaporação do etanol. O *pellet* do DNA foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE pH 8.0. Ao término da extração, o DNA obtido de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c).

4.6.2. Amplificação do DNA por PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para a amplificação da região 16S do rDNA. Os pares iniciadores utilizados foram 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), como descritos por Lane (1991). As reações de amplificação foram realizadas utilizando 10 pmols de cada primer e até 5 µL de DNA molde e, PCR Mix contendo: 5 µL de Tampão de PCR, 3 µL de Cloreto de Magnésio, 1 µL de DNTP, 0,25 µL de Taq DNA polimerase e o volume final para chegar em 50 µL de água destilada estéril.

As etapas utilizadas na PCR consistiram em: 1 ciclo (95°C por 2 minutos), 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 5 minutos), de acordo com Moreira et al. (2005).

Decorrida a reação de PCR, para verificação da amplificação de cada amostra, 2 µL de DNA de cada amostra foram misturados em 2 µL do corante não mutagênico Safer e, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando 100 V, durante 30 minutos. Ao término da corrida, os géis foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta para observação do DNA amplificado.

4.6.3. Sequenciamento genético das amostras

O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) conforme metodologia proposta por Reysenbach et al., (2000). Foi utilizado o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank, disponível no portal do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI - National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Sendo estabelecido um percentual mínimo de 99% de similaridade entre as sequências analisadas (SANT'ANNA, 2015).

4.7. Elaboração das microcápsulas probióticas

Para elaboração das microcápsulas foram utilizados os isolados que foram selecionados por seus potenciais probióticos nas etapas anteriores. Iniciou-se com a curva de crescimento; seguida da elaboração das microcápsulas, cálculo de eficiência da microencapsulação e avaliação da viabilidade celular; metodologias estas que serão descritas a seguir.

4.7.1. Curva de crescimento

Previamente, foi realizada a curva de crescimento dos isolados. Para tanto, o isolado selecionado nos testes anteriores foi inoculado em placa de Petri contendo Ágar MRS (Kasvi, Brasil). A placa foi incubada a 37°C, em uma condição de microaerofilia (lacrada com parafilme) por 24 horas e posteriormente, após o crescimento, foi realizada a preparação do inóculo a partir da padronização celular utilizando a escala de *Mc Farland* 0,5 (que corresponde a uma concentração celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, esta concentração foi ajustada em 30 mL de caldo MRS que posteriormente foi incubado à 37°C.

Após a incubação, a cada 2 horas (até completar 48 horas), uma alíquota do caldo MRS foi retirada (50 μL) e realizada a semeadura na superfície de placas de Petri contendo Ágar MRS, com o auxílio do equipamento *Spiral Plater*. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas em uma condição de microaerofilia (lacradas com parafilme) (GILLILAND et al., 1984, com modificações). Após a incubação, o número de células foi determinado por contador automático de colônias *Flash & Go* e foi traçado o comportamento de crescimento do microrganismo (SILVA et al., 2015).

4.7.2. Elaboração das microcápsulas e eficiência da microencapsulação

Para a elaboração das microcápsulas foram utilizados como agentes encapsulantes: 10 g de leite desnatado (Molico, Nestlé), mais 2,5 g de maltodextrina (Athletica, Brasil) nos quais foram dissolvidos em 480 mL de água destilada estéril (GUERGOLETTTO et al., 2010).

Depois de descoberta a fase estacionária dos isolados, estes foram padronizados com a escala de *Mc Farland 5* (a uma concentração celular de 15×10^8 UFC/mL), onde adicionou-se 20 mL dessa escala nos 480 mL da solução com os agentes microencapsulantes (leite desnatado em pó (Molico, Nestlé) 2% + maltodextrina (Athletica, Brasil) 0,5%).

O equipamento utilizado foi o modelo LM MSD 0.5 e as condições de secagem em *spray dryer* para todo o experimento foram: vazão de 30 mL/min realizada através de uma bomba peristáltica, temperatura de entrada do ar $90 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura de saída $60 \pm 3^\circ\text{C}$ (Figura 2).

Figura 2 - *Spray Dryer* utilizado na microencapsulação da bactéria ácido-lática selecionada no presente estudo.



Fonte: autores (2021).

Os isolados microencapsulados na forma de pó, foram coletados em um ciclone localizado na saída do *Spray dryer*, armazenados em sacos cromados e foram embalados a vácuo, devidamente identificados e estocados à temperatura de refrigeração (entre 6°C e 10°C) por até 60 dias para análise de viabilidade celular.

Para verificação da eficiência da microencapsulação foi realizada a contagem de microrganismos viáveis logo após o procedimento. A eficiência da microencapsulação (EM) foi calculada através da equação (PICOT; LACROIX, 2004):

$$EM = (N/No) \times 100$$

Onde *N* é o número de células viáveis após a desintegração e *No* é o número de células viáveis antes da desintegração.

4.7.3. Avaliação da viabilidade celular dos isolados microencapsulados

A viabilidade celular dos isolados foi determinada conforme Fritzen-Freire et al. (2013), com adaptações. Portanto, após a realização da microencapsulação, foi retirada 1g da amostra ao qual foram adicionados 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (Himedia, Índia), seguido de agitação e de diluições decimais seriadas (até 10⁻³).

Em seguida, uma alíquota de cada diluição foi retirada (50 µL) e realizada a semeadura na superfície de placas de Petri contendo Ágar MRS (utilizando o equipamento *Spiral Plater* (as placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas em uma condição de microaerofilia (lacradas com parafilme) (GILLILAND et al., 1984, com modificações).

Após a incubação, o número de células foi determinado por contador automático de colônias *Flash & Go* (SILVA et al., 2015). Para o cálculo da viabilidade celular, os isolados microencapsulados foram armazenados durante 60 dias em sacos cromados embalados a vácuo e estocados em temperatura de refrigeração (entre 6°C e 10°C). Esse processo foi semanal durante 60 dias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e caracterização morfológica dos isolados

Inicialmente foram obtidos 97 isolados, característicos de bactérias, durante os tempos: 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação, durante a fermentação espontânea do fruto. Esses isolados foram agrupados morfológicamente em 8 grupos distintos. Todavia, nesse estudo não se observou crescimento bacteriano nos tempos 0 e 15 dias de incubação, fator dado possivelmente pela falta de condições que pudessem favorecer o crescimento no tempo inicial (0), visto que bactérias ácido-láticas necessitam de uma acidificação do meio para o seu crescimento e isto costuma ocorrer em decorrência dos dias de fermentação (MEDEIROS JUNIOR et al., 2019). Por outro lado, no tempo de 15 dias, pode ter ocorrido o aumento excessivo de metabólitos produzidos pelos próprios microrganismos que são capazes de limitar o desenvolvimento dos mesmos (REIS et al., 2018).

Quanto as características morfológicas das colônias foram observadas como prevalentes: a forma circular, margem inteira, cor branca e aspecto de brilho, presentes entre os 8 morfotipos descritos. A maior diferenciação, no entanto, se deu devido ao tipo de elevação e ao tamanho variado das colônias. A Tabela 2 apresenta todos os morfotipos encontrados, que foram agrupados segundo suas características morfológicas, e a quantificação do número de isolados em cada grupo.

Tabela 2 - Número de isolados obtidos a partir da fermentação espontânea de frutos do bacupari (*Reedia gardneriana*) e caracterização morfológica.

MORFOTIPO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS						Nº total de isolados
	Forma	Elevação	Margem	Cor	Brilho	Tamanho (cm)	
1	Circular	Convexa	Inteira	Branca	Presente	< 0,1	57
2	Circular	Plana	Inteira	Branca	Ausente	0,2 a 0,5	4
3	Circular	Papilada	Inteira	Amarela	Presente	>0,5	4
4	Circular	Plana	Inteira	Branca	Presente	<0,1	3
5	Circular	Convexa	Inteira	Branca	Presente	0,2 a 0,5	19
6	Circular	Convexa	Inteira	Amarela	Presente	> 0,5	4
7	Circular	Plana	Inteira	Branca	Presente	0,2 a 0,5	2
8	Puntiforme	Convexa	Inteira	Branca	Presente	<0,1	4
Nº TOTAL DE ISOLADOS:							97

Em relação aos morfotipos encontrados, destaca-se o morfotipo 1 com 57 isolados e o morfotipo 5 com 19 isolados, sendo estes dois os mais prevalentes. Por outro lado, apesar dos morfotipos 2, 3, 4, 6, 7 e 8 apresentarem uma menor quantidade de isolados, estes demonstraram uma considerável diversidade na microbiota do fruto, que de modo geral, foi evidenciada durante todo o tempo da fermentação espontânea.

Dos 97 isolados obtidos, 82 apresentaram viabilidade após a preservação inicial (apresentando uma perda de cerca de 16% do número total de microrganismos obtidos). Desses, 75 isolados apresentaram as características desejáveis para seleção de bactérias ácido-láticas como: morfologia de bacilos e/ou cocobacilos; Gram positivas para o teste de coloração de Gram; e, catalase negativa no teste da catalase.

Diversos estudos demonstram o potencial de frutos como uma categoria de alimentos a servir como transportador e fonte de microrganismos com potencial probiótico que pode ser explorada através da fermentação espontânea (PANGHAL et al., 2018; SEPTEMBRE-MALATERRE et al., 2018; XU et al., 2018). Fator observado neste estudo e em diversas pesquisas que relatam o isolamento e a identificação de bactérias ácido-láticas de diferentes frutas, como: amoras, abacaxis, uvas, cerejas, maçãs, pêssegos, peras e bananas (BAE et al., 2006; TRIAS et al., 2008; CHEN et al., 2010; DI CAGNO et al., 2011; VERON et al., 2017; ABUBAKR; AL-ADIWISH, 2017).

De acordo com Serra et al. (2019) ao realizarem a identificação da comunidade microbiana do fruto do cacau amazônico brasileiro (*Theobroma cacao*), esses encontraram seis bactérias ácido-láticas, sendo elas: *Lactococcus lactis*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Weissella confusa*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus murinus*. Em um outro trabalho, Tenea et al. (2017) também obtiveram resultados semelhantes ao isolar bactérias ácido-láticas do fruto de jurubeba proveniente da floresta amazônica, demonstrando a riqueza probiótica que se pode encontrar nesses frutos.

Sánchez et al. (2019) também isolaram e identificaram 37 espécies de BAL, incluindo *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus brevis* e *Weissella confusa* de frutos da Amazônia peruana (caju, carambola, pupunha, jenipapo, buriti, buritirana, camu-camu, patauá, maracujá, maracujá doce, umari, araçá e cubiu). No mesmo estudo foi apresentada a caracterização fenotípica destas cepas, onde a maioria eram bacilos homofermentativos capazes de fermentar glicose, maltose, celobiose, frutose e crescer em uma ampla faixa de temperaturas e pHs.

Desta forma, a presença dessas bactérias ocorre naturalmente em frutos, podendo ser isolados da casca, da polpa e das sementes (BOURDICHON et al., 2012; BERISTAIN-BAUZA

et al., 2016). Como observado no presente estudo, que mostrou que o isolamento de BAL a partir da fermentação espontânea de frutos do bacupari pode apresentar uma relevante diversidade, o que torna promissora a obtenção de populações microbianas residentes em frutos amazônicos, visto que aumenta a possibilidade de descoberta de novos microrganismos para a exploração em aplicações biotecnológicas.

5.2. Avaliação do potencial probiótico das bactérias ácido-láticas

Todos os isolados foram avaliados em relação ao potencial probiótico *in vitro* de acordo com os seguintes testes: resistência a temperatura de 37°C; antagonismo frente a bactérias patogênicas; tolerância a diferentes valores de pH; resistência aos sais biliares; e, suscetibilidade a antibióticos. Os resultados obtidos serão descritos a seguir.

5.2.1. Resistência a temperatura de 37°C

Os 75 isolados caracterizados anteriormente foram submetidos inicialmente ao teste de resistência a temperatura de 37°C e destes, 48 resistiram a temperatura submetida e foram selecionados para a próxima etapa do estudo.

A temperatura de crescimento é um fator de grande influência no metabolismo dos microrganismos, uma vez que todos os processos de crescimento são dependentes de reações bioquímicas que são afetadas pela temperatura ótima de crescimento. Desta forma, a temperatura de 37°C foi testada com o intuito de simular a temperatura do corpo humano, visto que o pretendido é obter cepas adaptadas a esta temperatura (OLIVEIRA et al., 2017).

Na pesquisa realizada por Arteaga et al. (2018), estes observaram que cepas de *Lactobacillus plantarum*, espécie de bactéria ácido-lática, apresentaram similaridade de crescimento em relação aos diferentes níveis de temperatura submetidas, pois as bactérias toleraram temperaturas entre 30°C e 45°C, sem afetar o seu crescimento.

O que também foi observado por Mangoni (2009), que ao isolar *Lactobacillus* sp. visando sua utilização como probióticos, demonstrou que estes microrganismos também tiveram um bom crescimento e desenvolvimento a temperatura de 37°C, resultados que corroboram com os encontrados no presente estudo e demonstram sua importância.

5.2.2. Antagonismo frente a bactérias patogênicas

Os 48 isolados que apresentaram crescimento a temperatura de 37°C foram submetidos ao teste de antagonismo frente às bactérias patogênicas. Os resultados demonstraram que 15 isolados (1, 7, 11, 13, 18, 19, 20, 24, 25, 30, 35, 36, 54, 57 e 61) inibiram o crescimento de

alguma das bactérias patogênicas em pelo menos uma das técnicas empregadas (ágar *spot test* e/ou difusão em poço).

Os resultados obtidos com a técnica de *spot test* mostraram que 9 isolados obtidos (7, 19, 20, 24, 25, 30, 36, 57, 61) apresentaram forte inibição (>10mm) frente ao patógeno *Listeria monocytogenes*. Já na técnica de difusão em poço, apenas um isolado (36) apresentou média inibição (5 à 9mm), frente ao mesmo patógeno testado.

Com relação aos halos de inibição frente ao patógeno *Escherichia coli*, 7 isolados sendo estes: 11, 25, 35, 36, 54, 57 e 61 apresentaram forte inibição (>10mm) na técnica de *spot test*; já na técnica de difusão em poço, 3 microrganismos (20, 36 e 61) apresentaram média inibição (5 à 9mm).

Da mesma forma, 2 microrganismos (36 e 61) apresentaram forte inibição (>10mm) frente ao patógeno *Staphylococcus aureus* na técnica de *spot test*; já o microrganismo 57 apresentou média inibição (5 à 9mm) e os microrganismos 13 e 18 apresentaram fraca inibição (<4mm). Todavia, na técnica de difusão em poço 3 microrganismos (7, 36 e 57) apresentaram média inibição (5 à 9mm) frente ao patógeno *Staphylococcus aureus*.

Por fim, 3 microrganismos, sendo eles: 36, 57 e 61 apresentaram forte inibição (>10mm) frente ao patógeno *Salmonella typhimurium* na técnica de *spot test*; enquanto os microrganismos 1 e 11 apresentaram fraca inibição (<4mm). Já na técnica de difusão em poço, apenas 3 microrganismos (20, 57 e 61) apresentaram média inibição (5 à 9mm) frente ao patógeno *Salmonella typhimurium*.

A atividade antimicrobiana é expressa através da formação de halo decorrente da inibição do crescimento das bactérias patogênicas (SCHILLING; LUCKER, 1989). A presença de um halo de inibição, independente do diâmetro, é um indicativo de antagonismo frente a bactérias patogênicas (NETO et al., 2005).

Os resultados dessa análise podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Ação inibitória dos isolados de frutos do bacupari sobre bactérias patogênicas utilizando as técnicas ágar *spot test* e difusão em poço.

Bactérias Isoladas	<i>Lysteria monocytogenes</i>				<i>Escherichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Salmonella typhimurium</i>					
	<i>Spot Test</i>		Poço		<i>Spot Test</i>		Poço		<i>Spot Test</i>		Poço		<i>Spot Test</i>		Poço			
	HA	IN	HA	IN	HA	IN	HA	IN	HA	IN	HA	IN	HA	IN	HA	IN		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4	+	-	-
7	18,0	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7	++	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	31,3	+++	-	-	-	-	-	-	-	4,0	+	-	-	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	+	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	+	-	-	-	-	-	-	
19	32,7	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	27,2	+++	-	-	-	-	6,9	++	-	-	-	-	-	-	-	6,0	++	
24	78,0	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	32,5	+++	-	-	21,2	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	52,9	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	-	-	-	-	16,3	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	40,8	+++	9,1	++	53,3	+++	6,1	++	16,4	+++	6,7	++	29,0	+++	-	-		
54	-	-	-	-	10,7	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
57	47,8	+++	-	-	74,0	+++	-	-	8,7	++	5,6	++	30,4	+++	5,2	++		
61	15,1	+++	-	-	49,0	+++	6,9	++	56,3	+++	-	-	31,3	+++	6,0	++		

(HA) = Resultado dos tamanhos dos halos obtidos da média de três repetições e estão expressos em mm (milímetros).

(IN) = Classificação da inibição (Negativo, Fraca, Média ou Forte).

Padrão para medida dos halos segundo MORENO (1996):

(-) = Negativo: Não houve inibição do crescimento do patógeno.

(+) = Fraca inibição: halos de até 4mm de diâmetro.

(++) = Média inibição: halos de 5 à 9mm de diâmetro.

(+++)= Forte inibição: halos acima de 10mm de diâmetro.

A metodologia empregada de ágar *spot test* é necessária pois avalia a concorrência direta entre os microrganismos. Normalmente cepas selvagens necessitam suportar a concorrência de outros microrganismos para sobreviver no ambiente natural hostil, de modo que muitas vezes produzem antimicrobianos como bacteriocinas e outros metabólitos, como: ácidos láctico, acético e propiônico (BERVANAKIS et al., 2008). Estas substâncias são naturalmente formadas por muitas bactérias ácido-láticas e, podem servir como estratégia para ganharem vantagens e inibirem o desenvolvimento de microrganismos concorrentes, produzindo compostos antagônicos aos demais microrganismos e acidificando o meio (SOOMRO et al., 2002).

Na avaliação do antagonismo frente a bactérias patogênicas pela técnica de difusão em poço, utilizou-se apenas o sobrenadante livre de células das bactérias isoladas. Com isso, os resultados nesse teste foram menos expressivos do que em comparação a técnica de ágar *spot test*, tendo em vista que nessa técnica a interação direta entre os microrganismos pode levar a inibição também pela concorrência por espaço e nutriente e maior produção de substâncias antimicrobianas, que agem como agentes químicos na destruição de outros microrganismos e no aumento da sobrevivência do organismo que o produz no ambiente, dando maior capacidade de colonização (ALVAREZ-OLMOS; OBERHELMAN, 2001; KARSKA-WYSOCKI et al., 2010; DRAGO et al., 2015).

Alguns estudos demonstraram vários mecanismos antimicrobianos de bactérias ácido-láticas, como: competição por nutrientes, produção de compostos inibitórios, estimulação imunológica e competição por sítios de ligação (GEORGIEVA et al., 2015; INGLIN et al., 2015). Além disso, bactérias ácido-láticas podem secretar certas moléculas antimicrobianas, como etanol, ácido graxo, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem exercer a atividade antimicrobiana (INGLIN et al., 2015; GEORGIEVA et al., 2015).

Por meio desses mecanismos, segundo Kang et al. (2017), algumas bactérias ácido-láticas demonstraram sua capacidade de inibir vários patógenos bacterianos, incluindo *Clostridium difficile* (MCFARLAND, 2015), *Escherichia coli* (KUMAR et al., 2016), *Shigella spp.* (MIRNEJAD et al., 2013), *Streptococcus mutans* (AHN et al., 2018), *Pseudomonas aeruginosa* (JAMALIFAR et al., 2011) e *Staphylococcus aureus*.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com cepas de *Lactobacillus sp.* por Kato et al. (2016) e Neto et al. (2005), que relataram inibição por bactérias ácido-láticas frente ao *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Resultados similares do antagonismo *in vitro* foram relatados também por outros autores, como: Alexandre et al. (2002) que demonstraram atividade antagonista de bactérias ácido-láticas

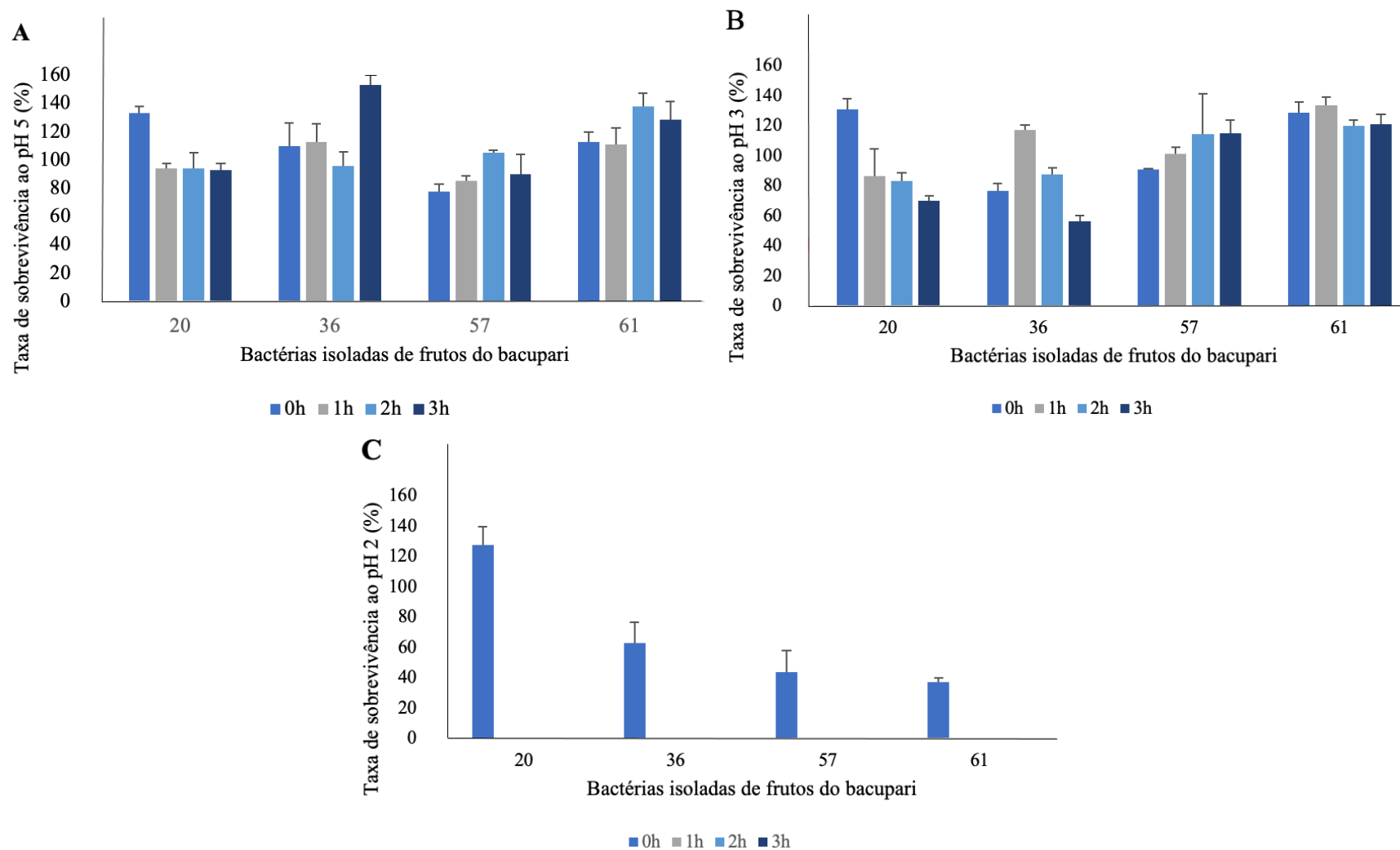
contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*. E no trabalho desenvolvido por Chioda et al. (2006), foi apresentado que o *L. acidophilus* foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e ainda segundo Kos et al. (2011) também foi observado atividade antagonista de *L. lactis* frente a *Staphylococcus* sp. e *E. coli*.

Deste modo, no desenvolvimento do presente estudo foi observado que os microrganismos 36, 57 e 61 foram capazes de inibir todas as bactérias patogênicas (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*) através de uma média ou forte inibição. Além desses, o microrganismo 20 também inibiu 3 das 4 patógenas testadas (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*). Portanto essas 4 bactérias (20, 36, 57 e 61) demonstraram potencial para as suas possíveis aplicações como potenciais probióticos e foram selecionadas para os testes posteriores. Os demais isolados foram descartados do estudo.

5.2.3. Tolerância a diferentes valores de pH

Os 4 isolados selecionados no teste anterior descrito (20, 36, 57 e 61) foram submetidos ao teste de tolerância a diferentes valores de pH, sendo estes avaliados quanto ao seu crescimento em valores de pHs: 5, 3 e 2 em diferentes tempos de incubação (0, 1, 2 e 3 horas). Os resultados dessa análise podem ser observados na Figura 3.

Figura 3 – Resultados obtidos no teste de tolerância aos pHs 5, 3 e 2 dos isolados 20, 36, 57 e 61, previamente selecionados.



*As barras são referentes às médias de três repetições e os marcadores acima das barras de cada gráfico representam o desvio padrão das médias obtidas.

Na figura acima é possível observar que no pH 5 (Fig. 3-A) todos os microrganismos (20, 36, 57 e 61) tiveram uma taxa de sobrevivência acima de 80%, apresentando uma concentração celular de 10^6 UFC/ml em todos os tempos analisados. Já nas Figuras 3-B e 3-C são indicados os efeitos dos pHs 3 e 2 respectivamente. Onde no pH 3, foi observado que todas as bactérias testadas (20, 36, 57 e 61) continuaram com suas taxas de sobrevivência acima de 60%, o que também foi equivalente a concentrações celulares de 10^6 UFC/ml. No entanto, no pH 2, foi apresentado crescimento significativo de todas as bactérias apenas no início do período de incubação (Tempo 0h); onde o isolado 20 apresentou uma taxa de sobrevivência de 130%, enquanto o isolado 36 apresentou 60%, e os isolados 57 e 61 demonstraram uma taxa de sobrevivência acima de 40%. Todavia nenhum dos isolados resistiram ao pH 2 por mais de 1 hora, resultado este que pode ser devido à condição ácida extrema.

O pH ácido é uma das condições hostis mais desafiadoras que podem ser encontradas por cepas probióticas em alimentos de baixo pH, durante o trânsito gástrico e após a exposição a ácidos graxos no intestino delgado (COTTER; HILL, 2003). Assim, a identificação de cepas naturalmente tolerantes pode garantir a robustez probiótica durante o processamento, estocagem e trânsito pelo trato gastrointestinal (KULKARNI et al., 2018).

A sobrevivência de microrganismos probióticos a pHs ácidos é uma característica que garante os benefícios dos probióticos, uma vez que os microrganismos devem chegar ao intestino com uma concentração de células viáveis mínimas de 10^6 UFC/ml para atuar como um probiótico no trato gastrointestinal e exercer seu efeito benéfico no organismo do hospedeiro, além de que a bactéria deve ser capaz de sobreviver às condições ácidas do estômago e resistir aos ácidos biliares presentes no intestino delgado (KULKARNI et al., 2018). Condição que foi observada nesse estudo, visto que todas os isolados selecionados resistiram por até 3 horas ao pH 3, em taxas de sobrevivência acima de 60% (10^6 UFC/ml).

Segundo Talib et al. (2019) o pH mais baixo encontrado no estômago humano é em torno de pH 1,5, que normalmente ocorre quando uma pessoa está em jejum. Os autores ainda citam que boas cepas de probióticos devem ser capazes de se desenvolverem em condições de crescimento de pelo menos pH 3, considerando a influência da capacidade de tamponamento com matrizes alimentares. Outro fator importante seria a análise do tempo de permanência de no mínimo 3 horas, pois, este é o tempo necessário para simular o tempo em que o alimento permanece no estômago antes de ser digerido (TALIB et al., 2019).

As variações observadas nas taxas de sobrevivência em todos os pHs (5, 3 e 2) podem ser devidas às habilidades de adaptação variáveis de cada isolado ao ácido no momento de sua presença no caldo MRS. Esses dados foram muito semelhantes aos do estudo realizado por

Tokatlı et al. (2015), onde descobriram que diferentes cepas de *Lactobacillus* sp. isolados de pickles tiveram taxas de sobrevivência variáveis em condições ácidas, que foram devidas à adaptação de cada cepa, já que estas possuem metabolismos específicos.

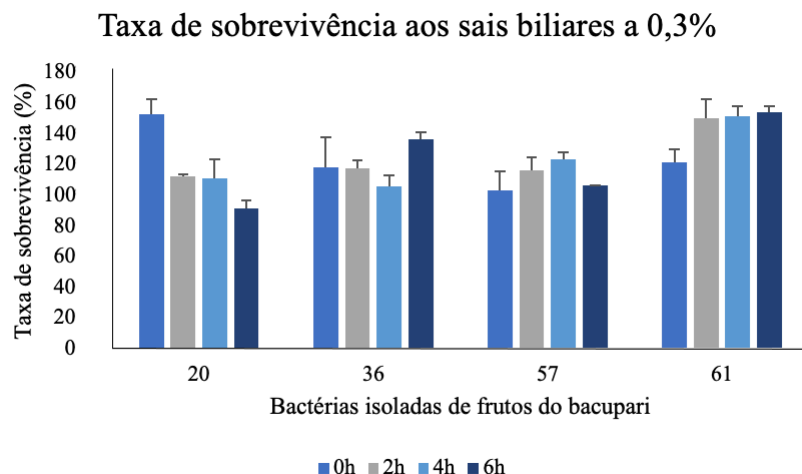
Um estudo realizado por Kim et al. (1999), também evidenciou que todas as células de *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis*, espécies de bactérias ácido-láticas, perderam sua viabilidade em um valor de pH 2. E Meira (2011) observou que as bactérias ácido-láticas quando expostas a diferentes condições ácidas não tiveram diferenças significativas de crescimento em pH 4, todavia, em pH 2 observou que a contagem bacteriana esteve abaixo do limite de detecção, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo.

Embora os isolados tenham sido incapazes de tolerar a acidez do pH 2, esses ainda podem ser explorados como possíveis probióticos. Pois algumas técnicas, como a microencapsulação e até mesmo o consumo destas cepas juntamente com formulações alimentares, podem permitir uma condição mais estável de resistência às condições mais ácidas estomacais por um maior tempo de viabilidade (ZARATE et al., 2000).

5.2.4. Teste de resistência aos sais biliares

Nesse experimento, os 4 microrganismos (20, 36, 57 e 61) aplicados no teste anterior, foram analisados quanto a resistência a presença dos sais de bile a aproximadamente 0,3% (SHUKLA et al., 2014). Assim, os resultados mostraram que todos os isolados (20, 36, 57 e 61) resistiram a essa condição de crescimento e mantiveram sua taxa de sobrevivência acima de 90% (concentração celular de 10^6 UFC/ml) durante as 6 horas de inoculação, conforme mostra a Figura 4.

Figura 3 - Resultados obtidos da taxa de sobrevivência dos isolados 20, 36, 57 e 61, previamente selecionados, aos sais biliares a 0,3%.



*As barras são referentes as médias de três repetições e os marcadores acima das barras representam o desvio padrão das médias obtidas.

Outro desafio enfrentado por bactérias probióticas é a resistência a presença dos sais biliares no intestino, onde estas deverão possuir mecanismos de defesa específicos para conter esse estresse e colonizar com sucesso esse órgão (SANCHEZ et al., 2012). Microrganismos probióticos devem ser capazes de suportar a concentração de sais biliares presentes no intestino (ZIELINSKA et al., 2015). Assim, a capacidade das cepas de sobreviverem aos sais biliares ajuda na colonização e na atividade metabólica das bactérias no intestino delgado do hospedeiro (NAWAZ et al., 2017).

A concentração de sais biliares em humanos varia entre 0,3% e 0,5%, mas alguns estudos sugeriram que a concentração varia dependendo da composição da dieta e da secreção de enzimas pancreáticas e, em geral, o efeito dos sais biliares sobre bactérias ácido-láticas é variável (RODA et al., 1978; ARCHER; HALAMI, 2015).

A inibição de crescimento em concentrações de sais biliares entre 0,3% e 0,6% foi relatada em cepas de *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. pentosus* e *L. rhamnosus*, espécies de bactérias ácido-láticas, por Guglielmotti et al., (2007) e Todorov et al., (2012). No entanto, altos níveis de resistência aos sais biliares foi relatado em outras cepas de bactérias ácido-láticas, como *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius* e *L. curvatus*, aos quais foram capazes de resistir a uma concentração entre 1,0 e 3,0g/100 ml de sais biliares (TODOROV et al., 2012; SHUKLA et al., 2014). A variabilidade de suscetibilidade a sais biliares de bactérias ácido-láticas isoladas de diferentes origens também foi observada por Chateau et al. (1994).

De acordo com Coeuret et al. (2004) aproximadamente 40% de bactérias ácido-láticas isoladas de leite cru resistiram a 0,3% de sais biliares após três horas de incubação. Vinderola et al. (2008) também avaliaram 19 amostras de bactérias ácido-láticas isoladas do trato gastrointestinal humano, sendo que todas as amostras foram resistentes ou pouco inibidas aos sais biliares.

Logo, além de tolerar o pH ácido do estômago, bactérias com características probióticas têm como desafio os sais biliares. A resistência a esses sais constitui uma importante característica fisiológica, uma vez que todas as cepas devem estar viáveis ao alcançarem o intestino delgado (SANCHEZ et al., 2012). Neste teste de tolerância aos sais biliares, os resultados mostraram que todas as bactérias isoladas de frutos do bacupari (20, 36, 57 e 61) foram tolerantes a 0,3% de concentração de sais biliares por 6 horas a uma concentração celular acima de 90% (10^6 UFC/ml) e devido a essas características foram selecionadas para os testes posteriores.

5.2.5. Análise de suscetibilidade a antibióticos

Desta maneira, os 4 isolados (20, 36, 57 e 61) foram experimentados quanto a suscetibilidade de crescimento frente a diversos antibióticos. Com relação ao antibiótico vancomicina, todos os isolados (20, 36, 57 e 61) mostraram resistência ao antimicrobiano. Contudo, quanto ao antibiótico kanamicina, apenas o microrganismo 36 demonstrou ser moderadamente sensível, enquanto os demais (20, 57 e 61) demonstraram ser resistentes. Frente ao antibiótico gentamicina, todos os isolados (20, 36, 57 e 61) também demonstraram resistência. Em relação a ampicilina, o microrganismo 36 se demonstrou moderadamente sensível e o 57 demonstrou ser sensível, enquanto os isolados 20 e 61 foram resistentes. O antibiótico clindamicina foi inibitório apenas para o isolado 57 (que mostrou sensibilidade), no entanto, os demais (20, 36 e 61) foram resistentes ao fármaco. Por fim, com relação ao antibiótico cloranfenicol, todos os isolados (20, 36, 57 e 61) demonstraram resistência. Os resultados dessa análise podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação da suscetibilidade dos isolados de frutos do bacupari a antibióticos.

Bactérias isoladas	ANÁLISE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS						
	VAN 30µg/ disco	KAN 30µg/ disco	GEN 10µg/ disco	ERI 15µg/ disco	AMP 10µg/ disco	CLI 2µg/ disco	CLO 30µg/ disco
20	R	R	R	R	R	R	R
36	R	MS	R	S	MS	R	R
57	R	R	R	S	S	S	R
61	R	R	R	R	R	R	R

*Os resultados são expressos como R (Resistente); MS (Moderadamente Sensível); e, S (Sensível).

As siglas referem-se aos antibióticos, sendo; VAN: vancomicina, KAN: kanamicina, GEN: gentamicina, ERI: eritromicina, AMP: ampicilina, CLI: clindamicina e CLO: cloranfenicol.

Resultados correspondentes às médias de três repetições.

Os resultados obtidos constataram que todos os isolados testados foram resistentes aos antibióticos vancomicina e cloranfenicol. A resistência de bactérias ácido-láticas, como as do gênero *Lactobacillus*, à vancomicina é uma característica comum, sendo associada a esse gênero; portanto pode ser indicativo de uma resistência intrínseca a esse antimicrobiano (ZHOU, 2005).

Os probióticos podem restaurar ou manter o equilíbrio da microbiota intestinal normal durante ou ao término de uma antibioticoterapia, e para isso, eles devem sobreviver a presença de substâncias antibióticas (TORRUCO et al., 2020). Desse modo, a resistência dos probióticos frente aos antibióticos é um critério essencial para sua detecção e seleção, desde que, eles não

representem uma ameaça pela transferência de genes de resistência a outras bactérias (NEETHU et al., 2014).

Os isolados 36 e 57 foram inibidos pelo antibiótico ampicilina, que tem seu mecanismo de ação na parede celular e na interrupção da síntese de proteínas. Por ser um antibiótico de amplo espectro, tem atividade contra bactérias Gram + e -, o que pode ter colaborado com o resultado obtido. Resultados semelhantes foram obtidos por Beyalti et al. (2007) e outros pesquisadores, aos quais concluíram que as bactérias ácido-láticas eram sensíveis contra os mesmos antibióticos utilizados neste estudo (TEMMERMAN et al., 2003; ARICI et al., 2004).

Argyri et al. (2013) do mesmo modo, demonstraram a presença de resistência de cepas de bactérias ácido-láticas, isoladas de azeitonas fermentadas frente ao antibiótico kanamicina. No mesmo estudo, cepas de *Lactobacillus* sp. apresentaram resistência à gentamicina, ampicilina e cloranfenicol. A resistência a kanamicina por *Lactobacillus* sp. foi observada também em um estudo feito por D'Aimmo et al. (2007).

Os resultados de outros estudos indicam que a resistência observada a antibióticos é intrínseca entre BALs, o que significa que existe a possibilidade mínima de transferência de genes resistentes para outras bactérias por transferência horizontal (ABRIOUEL et al., 2015; SHARMA et al., 2016).

A resistência aos antibióticos é intransferível entre espécies devido ao fato de que as espécies de *Lactobacillus* são intrinsecamente resistentes à vancomicina e gentamicina. Esse fato justifica a importância de se determinar previamente os padrões de resistência aos antimicrobianos antes de usar uma cepa de bactéria ácido-lática como probiótico (TALIB et al., 2019). Por conseguinte, os microrganismos 20 e 61 foram selecionados para as próximas etapas da pesquisa, por apresentarem a característica de serem resistentes a todos os antibióticos testados. E os isolados 36 e 57 foram descartados do estudo.

5.3. Avaliação dos fatores de virulência dos isolados selecionados

Os isolados então selecionados (20 e 61) foram submetidos aos testes de análises de fatores de virulência, onde foi verificada a capacidade de produzirem as enzimas gelatinase, lipase, DNase e avaliada a atividade hemolítica. Esses testes são necessários para garantir a segurança na aplicação das cepas e devem ser feitos até mesmo em bactérias reconhecidas como seguras (GRAS) (FAO/WHO, 2002). Os resultados destes testes podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Classificação dos isolados 20 e 61 quanto aos fatores de virulência.

MO	Gelatinase	Lipase	DNase	Atividade Hemolítica
20	-	-	-	γ -hemólise
61	-	-	-	α -hemólise

(-): resultado negativo, ausência do fator de virulência.

Resultados correspondentes a três repetições.

Os resultados dos testes de gelatinase apontaram que as duas bactérias (20 e 61) foram gelatinase negativas. Essa análise tem como objetivo investigar se a cepa submetida ao teste tem a capacidade de hidrolisar caseína, gelatina, colágeno, hemoglobina e alguns outros peptídeos bioativos (WANG et al., 2011). Acredita-se que a principal função da gelatinase na patogênese seja o fornecimento de nutrientes para as bactérias a partir da degradação do tecido hospedeiro (FISCHER et al., 2009). Em 2015, Mahasneh et al., avaliaram algumas cepas de *Lactobacillus sp.* isoladas de produtos fermentados e verificaram que estas cepas, com potencial probiótico, não apresentavam atividade de gelatinase. Assim como Franco (2016) avaliou bactérias ácido-láticas isoladas de alguns alimentos regionais aos quais também apresentaram gelatinase negativa. Resultados estes que corroboram com o que foi observado no presente estudo.

Com relação ao teste de lipase, as duas bactérias (20 e 61) foram lipase negativas. Esse teste tem como intuito investigar a capacidade das cepas em degradar lipídeos, pois as lipases são enzimas que hidrolisam lipídeos de cadeia longa e as lipases presentes no metabolismo microbiano costumam hidrolisar gorduras, como por exemplo, gorduras presentes em leites. Esse fator é relatado como fator de virulência presente em cepas patogênicas, pela alteração excessiva e acúmulo dessa enzima no sangue (XIE et al., 2012). No estudo de Moraes et al. (2010) foi investigado a atividade lipolítica de bactérias ácido-láticas isoladas de derivados lácteos, onde chegaram ao resultado de que nenhuma das cepas submetidas ao teste foi lipolítica positiva, corroborando com o presente estudo.

Com relação ao teste de DNase, as duas bactérias (20 e 61) foram DNase negativas. O intuito deste teste seria investigar o fator de virulência capaz de degradar o ácido nucleico (DNA) (UECKER, 2018). Nos estudos de Almeida et al. (2015) e Luiz et al. (2015) onde eles isolaram bactérias ácido-láticas de leite de cabra, foi observado que as cepas eram DNase negativa, resultado este que também corrobora com o presente estudo.

Referente ao teste de atividade hemolítica, o isolado 61 demonstrou atividade α -hemolítica, ou seja, apareceram zonas verdes em torno de suas colônias. Em contrapartida, o isolado 20 se demonstrou γ -hemolítico, ou seja, não foi produzido qualquer efeito sobre as placas de Ágar sangue, sendo considerada não hemolítica. O teste de atividade hemolítica teve como objetivo investigar a capacidade das cepas em ocasionar anemia e edema no indivíduo hospedeiro, visto que a produção de hemolisina é um fator de virulência por conta do consumo do ferro pelas bactérias patogênicas (VESTERLUND et al., 2007). Nos estudos de Baumgartner et al. (1998) e Maragkoudakis (2006), ao submeterem cepas de *L. rhamnsus* e *Lactobacillus* sp. ao teste de hemólise, estes constataram atividade α -hemolítica em sangue de carneiro e em sangue humano, respectivamente, resultados que corroboram com o que foi encontrado no isolado 61.

A presença das atividades de gelatinase, lipase, DNase e hemólise em BAL com potencial probiótico não são desejáveis (FISHER; PHILLIPS, 2009). Os fatores de virulência, também conhecidos como fatores de patogenicidade, referem-se aos mecanismos observados em comuns entre vários microrganismos patogênicos. Segundo Schaechter et al. (1999), fator de patogenicidade é qualquer elemento do microrganismo que potencialize a sua capacidade em causar doenças no hospedeiro.

Esses testes são fundamentais para descartar a possibilidade de um microrganismo com potencial probiótico possuir a capacidade de virulência e ocasionar danos ao hospedeiro, dessa forma, garantindo uma segurança maior a saúde de quem os consome (FISHER; PHILLIPS, 2009). Baseado nestes resultados, o isolado 61, por apresentar atividade α -hemolítica, foi descartado do estudo e o isolado 20 foi selecionado para a etapa de identificação molecular.

5.4. Identificação molecular

O isolado 20 foi então submetido à amplificação do gene 16S rRNA e o resultado do sequenciamento do gene foi comparado as cepas depositadas no banco de dados BLAST do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os resultados mostraram que o isolado exibiu > 99% de homologia com a sequência depositada no banco de dados para a espécie de bactéria ácido-lática correspondente a *Weissella jogaejeotgali*. Os resultados da análise estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultado da identificação molecular do isolado 20.

Isolado	Números de acesso - Cepas tipo GenBank	Número de adesão GenBank	Similaridade (%)	Principal resultado da pesquisa do BLAST (nome da espécie)
20	NR145896.1	CP014332.1	99%	<i>Weissella jogaejeotgali</i> cepa FOL01

A espécie de *Weissella*, *W. jogaejeotgali* FOL01, foi isolada inicialmente a partir de mariscos fermentados coreanos e é uma espécie de bactérias ácido-láticas (LEE et al., 2015). Ainda no estudo de Lee et al. (2015) foram realizadas análises do genoma desta espécie, onde foi apresentado seu potencial para uso na fermentação de alimentos e habilidades de resistência ao estresse osmótico para processamento em indústrias de alimentos. Além disso, previu-se que esta cepa tinha tolerância ao ácido e adesão à camada mucosa para sobrevivência e colonização no intestino.

Em um experimento subsequente foram comprovadas essas habilidades, sugerindo que *W. jogaejeotgali* pode ter potencial probiótico e uma alta taxa de sobrevivência durante a fermentação de alimentos (KU et al., 2017). Este resultado demonstra que, bactérias ácido-láticas, podem ser encontradas em frutos amazônicos, como neste caso, de frutos do bacupari. No estudo de Moura (2015), bactérias ácido-láticas do gênero *Weissella* sp. foram isoladas através da fermentação espontânea de frutos do açaí. Trias et al. (2008) também isolaram cepas de *Weissella* sp. de frutas e vegetais frescos.

Portanto, nesse trabalho, foram descobertas cepas de *W. jogaejeotgali*, que já é uma espécie de bactéria ácido-lática reconhecida como probiótica, as quais foram obtidas a partir da fermentação espontânea do fruto amazônico bacupari, sendo que estas informações podem constituir uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos aplicados à alimentos. A *Weissella jogaejeotgali* (20) foi então submetida a etapa de microencapsulação.

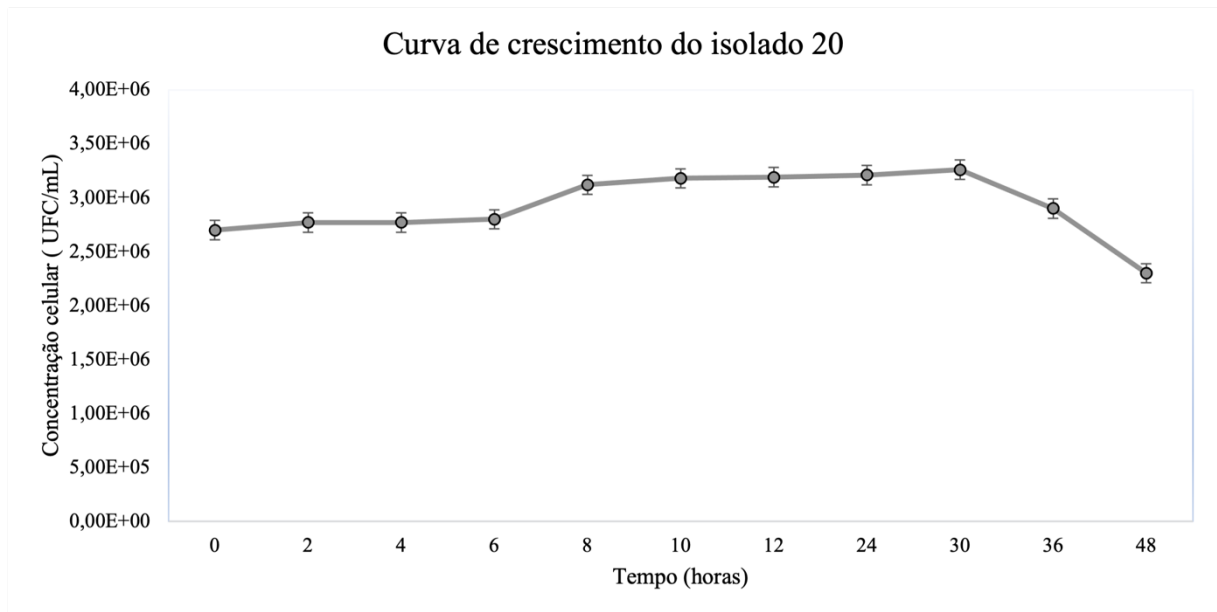
5.5. Elaboração das microcápsulas probióticas

Para elaboração das microcápsulas probióticas, iniciou-se com a curva de crescimento da *Weissella jogaejeotgali* (20) com o objetivo de descobrir sua fase estacionária.

5.5.1. Curva de Crescimento

Os resultados durante a observação da curva de crescimento da *Weissella jogaejeotgali* (20), mostraram que, após 8 horas de incubação, a bactéria alcançou a fase estacionária de crescimento, atingindo a concentração celular de 10^6 UFC/mL. A curva de crescimento pode ser observada na Figura 5.

Figura 4 - Curva de crescimento da *Weissella jogaejeotgali*.



*Os pontos são referentes as médias de três repetições e os marcadores acima dos pontos representam o desvio padrão das médias obtidas.

Alguns estudos comprovaram que a fase estacionária tem sido a que mais garante a sobrevivência dos microrganismos submetidos a microencapsulação por *spray drying* (CORCORAN et al., 2004; MORGAN et al., 2006; RANADHEERAA et al., 2015). Na fase estacionária tem-se o esgotamento de fontes de nutrientes disponíveis no meio, o que ocasiona respostas de estresse para permitir a sobrevivência da cultura bacteriana, dessa forma protegendo as células em condições adversas como a desidratação e altas temperaturas (MORGAN et al., 2006). Desse modo, sendo importante a realização de estudos que envolvam a análise da fase estacionária seguida da microencapsulação de bactérias ácido-láticas, obtidas a partir da fermentação espontânea de frutos Amazônicos, como é o caso do bacupari.

5.5.2. Obtenção das microcápsulas, eficiência da microencapsulação e viabilidade celular

Na Figura 6 são apresentadas as microcápsulas obtidas da *Weissella jogaejeotgali* (20), a partir do processo de secagem por *spray drying*, utilizando como agentes encapsulantes o leite desnatado em pó e a maltodextrina.

Figura 6 - Microcápsulas obtidas pela técnica de *Spray drying*.



Fonte: autores (2021).

No presente estudo optou-se pela utilização do leite desnatado em pó associado a maltodextrina, pois dentre estes agentes encapsulantes, o leite desnatado tem-se demonstrado um bom protetor da viabilidade celular durante a microencapsulação por *spray drying* e tem sido empregado em vários estudos (FU e CHEN, 2011; GARCÍA, 2011; SILVA et al., 2011; PAÉZ et al., 2012).

Já a maltodextrina foi escolhida por ser um carboidrato que não tem sabor, é de baixo custo e apresenta baixa higroscopicidade, além de ser um excelente contribuinte para matrizes alimentares, além de que, quando associada a proteínas gera-se uma maior eficiência de encapsulação (REINECCIUS, 2001).

A escolha dos agentes encapsulantes é de suma importância para a eficiência da encapsulação e estabilidade das microcápsulas. Diversos agentes encapsulantes já foram utilizados na microencapsulação de probióticos por *spray drying*, como amidos (O'RIORDAN et al., 2001; GODERSKA et al., 2008; YING et al., 2010), maltodextrina (LIAN et al., 2002; REDDY et al., 2009), gomas (CHAVÉZ et al., 2007; RODRÍGUEZ- HUERZO, 2007; ZHAO et al., 2007), gelatina (LIAN et al., 2003), proteínas do soro (PICOT e LACROIX, 2004; YING et al., 2010), e leite desnatado reconstituído (SIMPSON et al., 2005; GOLOWCZYC et al., 2010; PAÉZ et al., 2012).

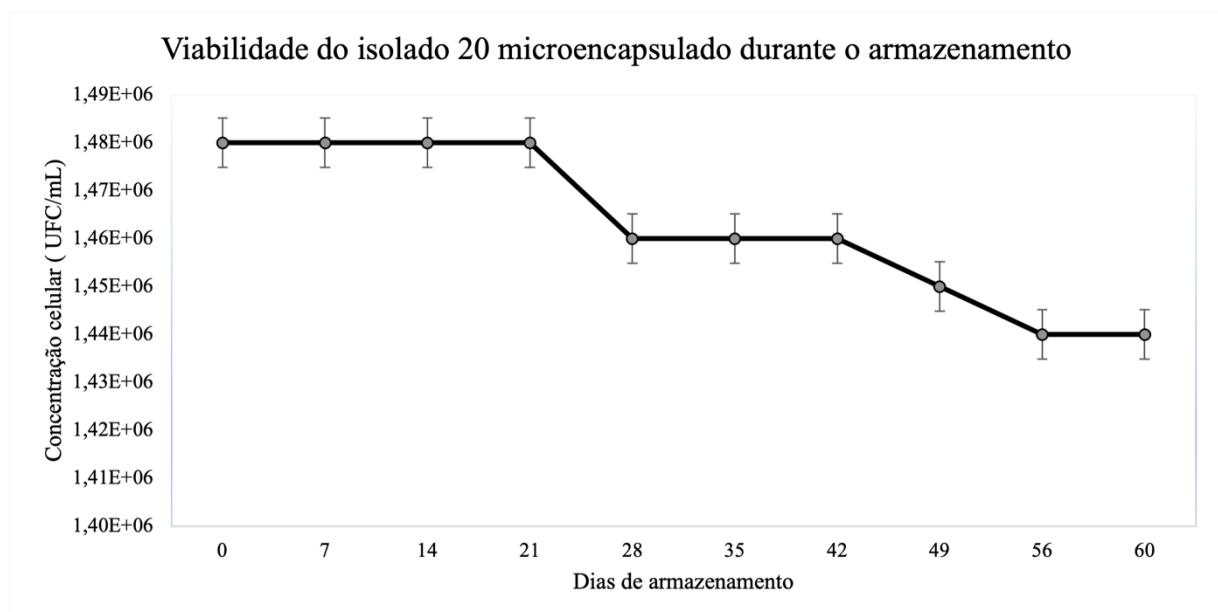
Com relação a eficiência da encapsulação (EM), esta foi de 65,77%, onde a concentração celular inicial (antes da encapsulação) era de 10^9 UFC/mL e após a encapsulação

ficou em 10^6 UFC/mL. Os resultados encontrados podem ser devido ao leite desnatado em pó ser capaz de prevenir a lesão celular por estabilizar a membrana da célula, uma vez que contém proteínas que formam um revestimento protetor para as células (SILVA et al., 2011). Além disso, segundo Carvalho et al. (2003) o leite desnatado favorece a sobrevivência das bactérias em baixa temperatura, estabilizando os constituintes da membrana celular e formando um revestimento protetor sobre as proteínas da parede celular. Esta estabilização pode estar diretamente relacionada a lactose e o cálcio presente no leite desnatado.

No estudo de Riveros et al. (2009), eles obtiveram uma EM de 80,5% ao microencapsularem *L. acidophilus* utilizando soro de leite. Maciel (2013) ao microencapsular *L. acidophilus* com soro de leite teve uma eficiência de 82,3% e ao usar leite desnatado a eficiência foi de 79,85%. Fritzen-Freire et al. (2013) ao encapsularem *Bifidobacterium lactis* com leite desnatado apresentou a eficiência de 71,72%.

A viabilidade da *Weissella jogaejeotgali* (20), microencapsulada, foi monitorada durante 60 dias de armazenamento, onde esta foi embalada à vácuo em sacos cromados e estocada sob temperatura de refrigeração. Vários estudos comprovam que o alimento deve conter no mínimo 10^6 a 10^7 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ de células viáveis para que possa ser vendido como probiótico (BADARÓ et al., 2009; MADUREIRA, et al., 2011; RIBEIRO, 2011). Os valores da concentração celular da bactéria 20, monitorados durante os 60 dias, sob refrigeração, podem ser observados na Figura 7.

Figura 7 - Viabilidade celular da *Weissella jogaejeotgali* (20), microencapsulada, durante o armazenamento.



*Os pontos são referentes as médias de três repetições e os marcadores acima dos pontos representam o desvio padrão das médias obtidas.

A partir da curva traçada pode-se observar que a contagem das células viáveis começou a reduzir a partir dos 21º dias de armazenamento, no entanto, esta ainda se manteve na concentração celular de 10^6 UFC/mL, durante todo o período de estocagem (60 dias), considerado o valor mínimo presente em um alimento para que possa desempenhar um efeito probiótico (REID et al., 2007). As células probióticas microencapsuladas apresentaram um percentual de sobrevivência de 100% no início da estocagem e 96,62% ao final da estocagem, tendo uma redução de apenas 3,38%, o que é positivo e demonstra o potencial de se microencapsular cepas de *W. jogaejeotgali* com os agentes encapsulantes leite desnatado em pó e maltodextrina.

Em um estudo realizado por Abe et al. (2009) foram identificadas concentrações celulares maiores que 10^7 UFC/mL para bifidobactérias ao final de 24 meses de estocagem, onde foi utilizada fórmula láctea em pó como agente encapsulante. No estudo de Schuck et al. (2013), foram observadas concentrações celulares superiores a 10^7 UFC/mL ao final de 3 anos para linhagens de *Propionibacterium acidipropionici* utilizando soro de leite em pó. Em contrapartida, Golowczyc et al. (2010) utilizando leite desnatado como agente encapsulante, identificou concentrações celulares menores que 10^6 UFC/mL ao final de 80 dias de armazenamento, para *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *Saccharomyces lipolytica*.

No estudo de Simpson et al. (2005), onde eles avaliaram a viabilidade de 12 espécies de *Bifidobacterium* microencapsuladas por *spray drying* e utilizando o leite desnatado em pó como agente encapsulante, todas as amostras apresentaram uma concentração celular maior do que 10^6 UFC/mL ao final de 90 dias de armazenamento (sob a temperatura de 4°C). Os resultados do presente estudo corroboram com as pesquisas que afirmam que os microrganismos microencapsulados apresentam maior resistência, e conseqüentemente maior viabilidade, durante sua vida de prateleira (DING; SHAH, 2008; NUALKAEKUL et al., 2012; YING et al., 2013). E apesar da análise do presente estudo ter sido de apenas 60 dias, essa viabilidade poderia ter sido analisada por períodos maiores, como demonstrado nos estudos supracitados.

O método de *spray drying* foi efetivo na formação de microcápsulas, utilizando leite desnatado e maltodextrina como agentes encapsulantes, proporcionando resistência e viabilidade durante a vida útil avaliada. Vale ressaltar que tanto o leite em pó desnatado quanto a maltodextrina são matérias-primas de baixo custo e são interessantes para a microencapsulação de culturas probióticas, além de serem susceptíveis ao armazenamento em temperatura de refrigeração, sem que haja redução na viabilidade dos microrganismos microencapsulados. Sob o ponto de vista industrial, as bactérias com potencial probiótico ao serem microencapsuladas podem ser aplicadas em diversas matrizes alimentares, pois essa

técnica garante a manutenção das características da cultura ativa e estabilidade durante a estocagem (ANAL; SINGH, 2007).

Diante do exposto, observa-se que os probióticos, além de conferirem inúmeros benefícios a saúde de quem os consome, apresentam estudos com resultados distintos, por conta das diferentes cepas utilizadas nos experimentos e das características inerentes a cada uma das espécies. O que torna cada vez mais importante estudos que isolem novas cepas, que analisem o potencial probiótico e que observem os possíveis efeitos destes microrganismos em seus hospedeiros. Dessa maneira, pode-se estabelecer o importante papel dos probióticos, que além de diminuir os riscos de uma série de doenças ainda auxiliam na manutenção da saúde do ser humano (OLIVEIRA et al., 2017).

6. CONCLUSÕES

O fruto amazônico bacupari demonstrou uma considerável diversidade na microbiota, apresentando potencial para o isolamento de bactérias ácido-láticas a partir da fermentação espontânea do fruto. Após a realização dos testes *in vitro* de resistência a temperatura de 37°C; antagonismo contra bactérias patogênicas; tolerância a diferentes valores de pH; resistência aos sais biliares; resistência a antibióticos; e, testes de virulência, foi possível obter cepas com potencial probiótico, sendo identificadas molecularmente como *Weissella jogaejeotgali*, as quais se mantiveram viáveis após terem sido microencapsuladas, em temperatura de refrigeração pelos 60 dias monitorados. Como indicação para trabalhos futuros, sugere-se o monitoramento das microcápsulas de *Weissella jogaejeotgali* por um tempo maior, assim como maiores estudos referentes a utilização desta espécie como probiótico em matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABE, F., et al. Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. **International journal of dairy technology**, v. 62, n. 2, p. 234-239, 2009.
- ABRIOUEL, H., et al. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. **Food Res Int.** 78:465–481. 2015.
- ABUBAKR, M., et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from different fruits with proteolytic activity. **Int J Microbiol Biotechnol.** 2(2):58–64. 2017.
- AHN, K. B., et al. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **PLoS One** 13:e0192694. 2018.
- ALEXANDRE, D. P., et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.**, v.54, p.424-428. 2002.
- ALMEIDA, C. C., et al. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei Shirota* and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 247-251. 2012.
- ALMEIDA, J. W. L. G., et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103. 2015.
- ALMEIDA, L. S. B. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 886-891. 2008.
- ALMEIDA, S. P., et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: EMBRAPA-CPAC.** 1998.
- ALVAREZ-OLMOS, M. I., et al. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clin Infect Dis**, 32:1567–76. 2001.
- ANAL, A. K., et al. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in food Science and Technology**, n. 18, p. 240-251. 2007.

ANANTA, E., et al. Cellular injuries and storage stability of spraydried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, n. 15, p. 399-409. 2005.

ARCHER, A.C., et al. Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 99, 8113–8123. 2015.

ARGYRI, A. A., et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Journal of Food Microbiology**. v. 33, p. 282-291. 2013.

ARICI, M., et al. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiol** 21:19–24. 2004.

ARTEAGA, F. et al. Isolation, selection and identification of *Lactobacillus* spp. with probiotic and technological potential, from digestive tract of backyard chickens. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 38, n. 1, p. 15-20, 2018.

BADARÓ, A. C. L., et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores de saúde humana. *Revista Digital de Nutrição*, v.3, n.4, p. 396-416. 2009.

BAE, S., et al. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. **J Appl Microbiol.** 100(4):712–727. 2006.

BAO, Y., et al. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control.** 21, p. 695–701. 2010.

BARROSO, G. M. *Sistemática de angiospermas no Brasil*. 2 ed. Viçosa: UFV. 2002.

BERISTAIN-BAUZA, S. C., et al. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*, **Food Control**, Volume 62, Pages 44-51, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.007>. 2016.

BERVANAKIS, S., et al. A non-polyenic antifungal produced by a *Streptomyces yatensis* strain isolated from Mellah Lake in El Kala, North-East of Algeria. **Journal de Mycologie Medicale**, 25(1), 2-10. 2008.

BEYALTI, Y., et al. Determination of some characteristic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional hand-made Turkish yogurts. **Deut Lebensm.** 2007.

BJORKROTH, J. A. Genus III. *Weissella* Collins, Samelis, Metaxopoulos and Wallbanks 1994, 370VP (Effective publication: Collins, Samelis, Metaxopoulos, and Wallbanks 1993, 597),” in **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Edn., Vol. 3.

The Firmicutes, eds P. de Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, et al. (New York, NY: Springer), 643–654. 2009.

BOGSAN, C. S. B., et al. Fermented or unfermented milk using *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019: Technological approach determines the probiotic modulation of mucosal cellular immunity, **Food Research International**, Volume 64, Pages 283-288, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.036>. 2014.

BOURDICHON, F., et al. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use, **International Journal of Food Microbiology**, Volume 154, Issue 3, 2012, Pages 87-97, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Alimentos regionais brasileiros. Ministério da Saúde: Brasília. 2002.

CARVALHO, A. S., et al. Effect of different sugars added to the growth and drying medium upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, n. 20, p.248–254. 2003.

CASTARDO, J. C. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411. 2008.

CASTRO, A., et al. Potent schistosomicidal constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Médica**, v. 81, n. 09, p. 733-741. 2015.

CHANG, L. S., et al. Characterization of enzyme-liquefied soursop (*Annona muricata* L.) puree. **LWT - Food Science and Technology**, v. 94, p. 40–49. 2018.

CHARTERIS, W. P., et al. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. **Journal of Food Protection**, vol. 61, n 12, p 1636-1643. 1998.

CHATEAU, A. N., et al. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. **Lett. App. Microbiol.**, v.18, p.42-44. 1994.

CHEN, Y., et al. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. **Braz J Microbiol.** 41(4):916–921. 2010.

CHIODA, T. P., et al. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Rev. Port. Clin.Vet.**, v.101, p.121- 124. 2006.

COEURET, V., et al. In vitro screening of potential probiotic activities of selected *Lactobacilli* isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.451-460. 2004.

COLLINS, M. D. Taxonomic studies on some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **J. Appl. Bacteriol.** 75, 595–603. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x. 1993.

COOK, M. T., et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 56-67. 2012.

CORCORAN, B. M., et al. Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n.5, p. 1024-1039. 2004.

CORREIA, M. C. R., et al. Caracterização dos frutos, sementes e plântulas de espécies de *Clusiaceae* das restingas do Rio de Janeiro. Rodriguésia Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 64, n. 1, p. 61-73. 2013.

COTTER, P. D., et al. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiol Mol Biol Rev** 67(3):429– 453. 2003.

CUNHA JUNIOR, R. M., et al. Brazilian amazon plants: an overview of chemical composition and biological activity. In: **Natural Resources Management and Biological Sciences**. IntechOpen. 2020.

CUNHA, B. L. A., et al. Evaluation of anti-microbial and antitumoral activity of *Garcinia mangostana L.* (Mangosteen) grown in Southeast Brazil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 21-28. 2014.

D'AIMMO, M. R., et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *bifidobacterium* sp. isolated from dairy and pharmaceutical products. **Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 35-42. 2007.

DAS, D., et al. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim, LWT - **Food Science and Technology**, Volume 61, Issue 1, 2015, Pages 263-268, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.013>.

DELGADO, S., et al. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5. 2015.

DI CAGNO, R., et al. Effect of lactic fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. **Food Microbiology**, v.28, p.1062-1071. 2011.

DING, W. K., et al. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v.15, n.2, p. 219-232. 2008.

DRAGO, L., et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus salivarius* LS01 and *Bifidobacterium breve* BR03, alone and in combination, on peripheral blood mononuclear cells of allergic asthmatics. **Allergy Asthma Immunol Res**, 7:409–13. 2015.

DUBEY, M. R., et al. Probiotics: A promising tool for calcium absorption. **The open nutrition journal**, v. 12. p. 59-69. 2018.

DURIGAN, G., et al. A Flora Arbustivo-Arbórea do Médio Paranapanema: Base para a Restauração dos Ecossistemas Naturais. Pesquisas em conservação e recuperação ambiental no oeste paulista. 2004.

ECKERT, C. **Bactérias Lácticas: avaliação da resistência ao trato gastrointestinal simulado e encapsulamento com soros lácteos**. 113f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Centro Universitário UNIVATES. Lajeado. 2016.

EJTAHED, H, S, et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients, **Nutrition**, Volume 28, Issue 5, 2012, Pages 539-543, ISSN 0899-9007, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013>.

FAO / WHO. Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação. London, 11 p. 2002.

FARIA, L. M. Potencial probiótico in vitro de microrganismos probióticos veiculados em leites fermentados funcionais comerciais. 38f. Trabalho de conclusão de curso. Centro Universitário de Formiga. UNIFOR-MG. 2017.

FERREIRA, C. L. L. C. F. Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. 2. ed. Rio de Janeiro: **Rubio**. 220p. 2018.

FIGUEIREDO, S. A., et al. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. 2014.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 15, p.1749-1757, 2009.

FONTANA, L., et al. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **Br J Nutr**, 109 Suppl 2, S35-50. 2013.

FRANCO, B. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 863. 2016.

FRITZEN-FREIRE, C. B., et al. Effect of microencapsulation on survival of bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **Food Science and Technology**, v. 50, n.1, p. 39-44. 2013.

FUSCO, V., et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 155, 2015.

GANZLE, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. **Food microbiology**, v. 37, p. 2-10, 2014.

GARCÍA, A. H. Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. **Journal of Biosciences**. 36(5), p. 939–950. 2011.

GEORGIEVA, R., et al. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.** 29, 84–91. 2015.

GILLILAND, S. E., et al. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. **J Dairy Sci.** 67: 3045-3051. 1984.

GOBBETTI, M., et al. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. **Food microbiology**, v. 37, p. 30-40, 2014.

GODERSKA, K., et al. Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Polish journal of microbiology**, v. 57, n. 2, p. 135-40. 2008.

GOH, H. F., PHILIP, K. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140434, 2015.

GOLOWCZYC, M. A., et al. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 7–12. 2010.

GONTIJO, V. S., et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food chemistry**. 1;132(3):1230-5. 2012.

GONZALEZ-FERRERO, C., et al. Encapsulation of probiotics in soybean protein-based microparticles preserves viable cell concentration in foods all along the production and storage processes. **Journal of microencapsulation**, v. 37, n. 3, p. 242-253, 2020.

GUERGOLETTI, K. B., et al. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 415-421. 2010.

GUGLIELMOTTI, D. M., et al. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant. **International Dairy Journal**, 17, 916-925. 2007.

GUPTA, R., et al. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage, **Food Microbiology**, Volume 42, 2014, Pages 1-7, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.005>.

HUANG, S., et al. Significant effect of Ca²⁺ on improving the heat resistance of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, n. 344, p. 31-38. 2013.

ILHA, E. C., et al. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *Eur Food Res Technol* 240:977– 984 *J. Ethnopharmacol*, 126, p. 159 – 175 **Journal of Nutrition and Metabolism**. 2015.

INGLIN, R. C., et al. High throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. **J. Microbiol. Methods** 114, 26–29. 2015.

JACOBSEN, C. N., et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology** v.65, p. 4949 – 4956. 1999.

JAMALIFAR, H., et al. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Iran J. Microbiol.** 3, 21–25. 2011.

JENA, B. S., et al. Chemistry and biochemistry of (–) hydroxycitric acid from *Garcinia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 10-22. 2002.

JONES, M. L., et al. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 1234-1241. 2012.

KAJI, R., et al. Short communication: Probiotic induction of interleukin-10 and interleukin-12 production by macrophages is modulated by co-stimulation with microbial components, **Journal of Dairy Science**, Volume 101, Issue 4, 2018, Pages 2838-2841, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13868>.

KANG, M. S., et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. **Pathog. Dis.** v. 75. 2017.

KARSKA-WYSOCKI, B., et al. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbiol Res** 165:674–86. 2010.

KATO, C. D., et al. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp and *Lactococcus* spp Isolated from various Parts of pebbly fish, *Alestes baremoze*. **British Microbiology Research Journal**, v. 17, p. 1-7. 2016.

KIM, W., et al. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stress. **FEMS Microbiol Lett** 171:57–65. 1999.

KOÇ, M., et al. Microencapsulation of extra virgin olive oil by spray drying: effect of wall materials composition, process conditions and emulsification method. **Food Bioprocess Technol**, v. 8, p. 301-18, 2015.

KOS, B., et al. Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. **Mljekarstvo**, v.61, p. 273-282. 2011.

KU, H. J., et al. Genomic Insights of *Weissella jogaejeotgali* FOL01T Reveals Its Food Fermentation Ability and Human Gut Adaptive Potential for Probiotic Applications in Food Industries. **J. Microbiol. Biotechnol.** 943-946. 2017.

KUMAR, M., et al. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. **Int. J. Antimicrob. Agents** 48, 265–270. 2016.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, p.115-175. 1991.

LEBLANC, J. G., et al. B-Group Vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**, 2 ed. p. 279-296. 2015.

LEE, S., et al. *Weissella jogaejeotgali* sp. nov., isolated from jogae jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. Pt_12, p. 4674-4681, 2015.

LEE, Y. et al. Microencapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* kbl409 by extrusion technology to enhance survival under simulated intestinal and freeze-drying conditions. 2019.

LEMONS JUNIOR, W. J. F., et al. Safety and Stability of Two Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains After In Vitro Gastrointestinal Transit. **Probiotics and antimicrobial proteins**. 2020.

LIAN, W. Viability of microencapsulated *bifidobacteria* in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 293–301. 2003.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, M., et al. Evaluation of xylan as carbon source for *Weissella* spp., a predominant strain in pozol fermentation. **LWT**, v. 89, p. 192-197, 2018.

LUIZ, W., et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103. 2015.

MACIEL, G. M. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por spray-drying utilizando soro doce e leite desnatado**. 62f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 2013.

MADUREIRA, A. R., et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470. 2011.

MAHAMODO, S., et al. Antimicrobial prenylated benzoylphloroglucinol derivatives and xanthenes from the leaves of *Garcinia goudotiana*. **Phytochemistry**, v. 102, p. 162-168. 2014.

MAHASNEH, A. M., et al. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species Isolated from Local Traditional Fermented Products. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 81–87. 2015.

MAHBOOBI, S., et al. The effects of probiotic supplementation on markers of blood lipids, and blood pressure in patients with prediabetes: a randomized clinical trial. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 5, n. 10. 2014.

MANGONI, J. **Potencial probiótico de *Lactobacillus* de origem suína**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 46 p. 2009.

MARAGKOUidakis, P., et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, 16, 189-199. 2006.

MARCIAL-COBA, M. S., et al. Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and in vitro simulated upper gastrointestinal tract passage. **Food & function**, v. 9, n. 11, p. 5868-5879, 2018.

MARQUES, H. P. Influência da glutamina na produção de metabólitos especiais em calos de *Garcinia brasiliensis* Mart. (*Clusiaceae*). 45f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, MG, Alfenas. 2014.

MARTIN, M. J., et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 27, p. 15-25. 2015.

MAWAD, A., et al. *E. coli* Nissle microencapsulation in alginate-chitosan nanoparticles and its effect on *Campylobacter jejuni* in vitro. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 24, p. 10675-10690, 2018.

MCFARLAND, L. V. Probiotics for the primary and secondary prevention of *C. difficile* infections: a meta-analysis and systematic review. **Antibiotics** 4, 160–178. 2015.

MEIRA, S. M. M., et al. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Braz. Jour. Food Technol.**, n.12, p.75-80. 2011.

MIRNEJAD, R., et al. The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. **Iran Red Crescent Med. J.** 15, 122–126. 2013.

MIRTIC, J., et al. Development of probiotic-loaded microcapsules for local delivery: Physical properties, cell release and growth. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, p. 178-187, 2018.

MONTET, D., et al. Lactic acid fermentation of vegetables and fruits. In: **Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods**. Ed. Montet D & Ray RC; CRC Press, Taylor & Francis, FL, USA, p. 108. 2014.

MORAES, P. M., et al. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, n. 43, p. 1320- 1324. 2010.

MOREIRA, J. L. S., et al. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S- 23S rRNA restriction profiling. **BMC Microb.**, v. 5, p. 5-15. 2005.

MORENO, I. Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de *Lactococos* e sua utilização no processamento de queijo "Minas Frescal". 1996. 150f. **Dissertação** (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

MORGAN, C. A., et al. Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of microbiological methods**, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.

MOURA, F. G. Biodiversidade bacterianas durante a fermentação espontânea de frutos do açaí (*Euterpe oleracea*). **Tese (doutorado)** - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém. 2015.

MURATA, R. M., et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865-872. 2010.

NALDONI, F. J., et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 403-407. 2009.

NASCIMENTO, F., et al. Factors that interfere in the process of natural fermentation of the cubiu slices. **Revista Colombiana Ciência Animal**; v. 9, n 1: p. 81-88. 2017.

NAWAZ, A. S. N., et al. Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria for Acidic pH and Bile Tolerance. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.** 6, 3975–3980. 2017.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Eighth Edition.** NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238- 485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2003.

NETO, L. G., et al. Antimicrobial activity of lactic bacteria isolated from artesanal and industrial coalho cheese against indicator microorganisms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245-250. 2005.

NEVES, J., et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Médica**, v. 73, n. 7, p. 644-649. 2007.

NUALKAEKUL, S. et al. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydr. Polym.** v. 90, p. 1281-1287. 2012.

NUNES, G. L., et al. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 37, p. 132-141. 2015.

O'RIORDAN, K., et al. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1059-66. 2001.

OKTAVIANI, L., et al. Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Waste Using Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. In: **Multifaceted Protocols in Biotechnology**, Volume 2. Springer, Cham, 2021. p. 133-144.

OLIVEIRA, J. L. O., et al. A importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unoesc e Ciência - ACBS**, v. 8, n. 1, p. 7-12. 2017.

PAÉZ, L. R., et al. Effect of heat treatment and spray drying on *lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**. Vol. 48-2, p. 748-754. 2012.

PALOMAR, M. M., et al. Oral probiotics supplementation can stimulate the immune system in a stress process. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v.8, p. 29-40. 2017.

PANGHAL, A., et al. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, 21, 80– 89. 2018.

PAPADIMITRIOU, K., et al. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. **Frontiers in Microbiology**, 6, 58-58. 2015.

PAPAMANOLI, E., et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and pro- biotic properties. *Meat Sci.* 65, 859–867. doi: 10.1016/S0309-1740(02) 00292-9. 2003.

PATEL, A., et al. Evidence for xylooligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from Indian fermented foods and vegetables. **FEMS Microbiol. Lett.** 346, 20–28. doi: 10.1111/1574-6968.12191. 2013.

PEREIRA, G. V., et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, 36(8), 2060-2076. 2018.

PEREIRA, I. O., et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345. 2010.

PEREIRA, I. O., et al. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as Leishmania protease inhibitors. **Journal of Medicinal Food**, v.6, p. 557-562. 2011.

PEREIRA, K. C., et al. Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através de secagem por atomização: Revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21. 2018.

PETERSEN, L. M., et al. Community characteristics of the gut microbiomes of competitive cyclists. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2017.

PICOT, A., et al. Encapsulation of *bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, 14(6), 505–515. 2004.

PINTO, P. M. **Pós-colheita de abiu, bacupari e camu-camu, nativos da Região Amazônica, cultivados no Estado de São Paulo**. 145 f. (Tese de Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2013.

POTT, A., et al. 1994. Plantas do Pantanal. Corumbá: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal**. 320 p.

RAMASAMY, K., et al. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 65-69. 2010.

RANADHEERA, C., et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensensi* 702 by spray drying in goat's milk. **Small Ruminant Research**, v. 83, n. 15, p. 50-58. 2015.

REDDY, K. B. P. K., et al. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 2, p. 240–248. 2009.

REHAIEM, A., et al. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. **Food Control**, v. 37, p.343-350. 2014.

REID, A. A., et al. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Journal of food Science**, v. 72, n. 1, p. 31-37. 2007.

REINECCIUS, G. A., et al. Multiple-core encapsulation: the spray drying of food ingredients. **Microencapsulation of food ingredients**. p. 151-185. 2001.

REIS, V. R., et al. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 23. 2018.

REUTRAKUL, V., et al. Cytotoxic and anti-HIV-1 xanthenes from the resin and fruits of *Garcinia hanburyi*. **Planta Médica**, v. 73, p. 33-40. 2007.

REYSENBACH, A. L., et al. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. **Appl. Env. Microb**, v. 66, n. 9, p. 3798-3806. 2000.

RHODES, M. E. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 20, n. 1, p.108–118. 1957.

RIBEIRO, M. C. E. **Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado**. 75f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. 2011.

RIBEIRO, M. C. O. R. **Caracterização do *Pediococcus acidilactici* b14 quanto às propriedades probióticas e sua associação com *Lactobacillus acidophilus* atcc 4356 com aplicação em sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

RIVEROS, B., et al. Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, v. 27, n. 1, p. 123–132. 2009.

RIZZELLO, C. G., et al. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. **Food Microbiology**, v. 56, p. 1-13, 2016.

ROCHA, A. P. **Tecnologia de sementes e mudas de *Garcinia gardneriana* (PLANCH. & TRIANA) ZAPPI.** Tese (Doutorado em Ciências Florestais), 134 f. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 2015.

RODA, E., et al. Enterohepatic circulation of bile acids after cholecystectomy. **Gut**, 19, 640–649. 1978.

ROKKA, S., et al. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research Technology** v. 231, p. 1–12, 2010.

SAAD, S. M. I., et al. **Probióticos e Prebióticos em alimentos.** 1º Ed – São Paulo: Livraria Varela. 2011.

SALMINEN, S., et al. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 70, p. 347-358. 1996.

SANCHEZ, B., et al. Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. **Trends Food Sci Technol** 26(1):56–63. 2012.

SANCHEZ, L., et al. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. **Rev. Salud Anim.** Vol. 37 No. 2, 94-104. 2015.

SANDERS, M. E., et al. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. **Curr Opin Biotechnol**, 49, 207-216. 2019.

SANTA-CECILIA, F.V. I., et al. Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (*Clusiaceae*). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.15, n.3, p. 397-404. 2013.

SAUER, M., et al. The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. **Trends in biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 756-769, 2017.

SCHAECHTER, M., et al. Mechanisms of microbial disease. 3th edition. Ed. Lippincott, **Williams & Wilkins**. 1999.

SCHILLING, U., et al. Antibacterial Activity of *Lactobacillus* sake from Meat. **Applied and Environmental Microbiology**. 1989.

SCHNEIDER, L. C., et al. Desenvolvimento e análise nutricional da farinha da polpa de frutos de bacupari *Salacia crassifolia* (Mart. ex Schult.) G. Don. **Sustentabilidade em Ciência e Tecnologia de Alimentos** 2. p 66-78. 2020.

SCHUCK, P., et al. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 1, p. 12-17, 2013.

SERRA, J. L., et al. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. **LWT- Food Science and Technology**, v. 106, p. 229-239. 2019.

SHARMA, P., et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Res Int**. 57:176–195. 2016.

SHEU, T. Y., et al. Microtrapping of *lactobacili* in calcium alginate gels. **Journal of food science**, v. 54. n. 3, p. 557-561. 1993.

SHUKLA, R., et al. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, 3, 79-87. 2014.

SILVA, J. F. M., et al. Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-8. 2015.

SILVA, J., et al. Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 321– 335. 2011.

SILVA, R. S., et al. Physicochemical properties of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) powders with different carbohydrate biopolymers. **LWT - Food Science and Technology**. v.94, p.79-86. 2018.

SIMPSON, P. J., et al. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**. n. 2002, p. 493–501. 2005.

SOARES, B. L. M. **Desenvolvimento de uma bebida funcional a base de caju (*Anacardium occidentale L.*) com *Lactobacillus casei* livre e microencapsulado**. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2016.

SOHAIL, A., et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p.162- 168. 2011.

SONG, Z., et al. Unraveling core functional microbiota in traditional solid-state fermentation by high-throughput amplicons and metatranscriptomics sequencing. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1294, 2017.

SOOMRO, A. H., et al. Role of lactic acid bacteria in food preservation and human health - a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1. n. 1, p. 20-24. 2002.

TALIB, Noorshafadzilah et al. Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from kefir samples in Malaysia. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2606, 2019.

TARRAH, A., et al. In vitro probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains. **Front Microbiol** 9:1–11. 2018.

TEMMERMAN, R., et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **Int J Food Microbiol** 81:1–10. 2003.

TENEA, G. N., et al. Antimicrobial peptides of *Lactobacillus plantarum* UTNCys3.4 isolated from native fruits of Ecuadorian Amazonia inhibit the growth of foodborne pathogens. SciForum. **International Conference on Multidisciplinary Sciences**, 2nd edition. Workshop on Natural Products and Agro-Industrial Processes in Amazon, Ecuador. 2017.

TIANI, K. A., et al. Extending viability of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* by microencapsulation in alginate microgels. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 69, n. 2, p. 155-164, 2018.

TODOROV, S.D., et al. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28, 973–984. 2012.

TOKATLI, M., et al. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. **Biomed Res. Int.** 2015.

TRIAS, R., et al. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. **Int J Food Microbiol**; 123(1–2):50–60. 2008.

UECKER, J. N. **Screening de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e derivados com potencial probiótico**. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. 2018.

VAGHEF-MEHRABANY, E., et al. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis, **Nutrition**, Volume 30, Issue 4, 2014, Pages 430-435, ISSN 0899-9007, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.09.007>.

VANISKI, R., et al. Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**. v.8, n.1. 2017.

VERON, H. E., et al. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. **LWT**; 84:231 –240. 2017.

VESTERLUND, S., et al. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, 116. 325-331. 2007.

VIJAYA-KUMAR, B., et al. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112- 6124. 2015.

VINDEROLA, G., et al. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification 747 of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT - Food Science and Technology**, 748 41, 1678-1688. 2008.

VITALI, B., et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, p. 116-125. 2012.

WAN, M. L. Y., et al. Targeting gut microbiota in hepatocellular carcinoma: probiotics as a novel therapy. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 7, n. 1, p. 11, 2018.

WANG, L., et al. Relationship of biofilm formation and gelE Gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from Root canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. **Journal of Endodontics**, v.37, n. 5, p.631-636. 2011.

WANG, M., et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.13, p. 5691-701. 2016.

WEHKAMP, J., et al. NF- κ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium. **Infection and Immunity**, 72(10), 5750–5758. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004>. 2004.

XIE, W., et al. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.1, p.84-91. 2012.

XU, X., et al. Characterization of diversity and probiotic efficiency of the autochthonous lactic acid bacteria in the fermentation of selected raw fruit and vegetable juices. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2539. 2018.

YANG, J., et al. Selection of functional lactic acid bacteria as starter cultures for the fermentation of Korean leek (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel). **Int. J. Food Microbiol.** 191C, 164–171. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.016. 2014.

YAO, M., et al. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 857-874, 2020.

YEUNG, T. W., et al. Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: enhancing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. **Food & function**, v. 7, n. 4, p. 1797-1804, 2016.

YING, D. et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**. v.5, p. 5:98-105. 2013.

YING, D. Y., et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. **Journal of Food Science**, v. 75. 2010.

YU, H., et al. Evaluation of the probiotic characteristics and prophylactic potential of *Weissella cibaria* strains isolated from kimchi. **LWT**, v. 112, p. 108229, 2019.

ZARATE, G., et al. Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. **J Food Prot** 63:1214–1221. 2000.

ZENE, K. L., et al. Ação de prebióticos e probióticos em indivíduos com câncer colorretal: Revisão integrativa. **Revista Uningá**, v. 29, n. 3, p. 127-131. 2017.

ZHAO, R., et al. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1349-1354. 2007.

ZHOU, J. S., et al. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Int. J. Food Microbiol.** 98, 211 e 217. 2005.

ZIELINSKA, D., et al. In vitro screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. **Curr. Microbiol.** 70, 183–194. 2015.