



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS

LUIZ EVANDRO DE MELO JUNIOR

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* SP. DA
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DO FRUTO AMAZÔNICO TUCUMÃ
(*ASTROCARYUM VULGARE*)**

PALMAS/TO

2021

LUIZ EVANDRO DE MELO JUNIOR

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Lactobacillus* sp. DA
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DO FRUTO AMAZÔNICO TUCUMÃ
(*Astrocaryum vulgare*)**

Trabalho de Conclusão foi avaliado e apresentado à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas, Curso de engenharia de alimentos para obtenção do título de engenheiro de alimentos e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora

Orientador: Dr. Abraham Damian Giraldo Zuniga

Coorientador: Dr^a Juliana Fonseca Moreira da Silva

PALMAS

2021

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

M528i Melo Junior, Luiz Evandro de.

Isolamento e caracterização de *Lactobacillus* sp. Da fermentação espontânea do fruto amazônico tucumã (*Astrocaryum vulgare*). / Luiz Evandro de Melo Junior. – Palmas, TO, 2022.

37 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2022.

Orientador: Dr. Abraham Damian Giraldo Zuniga

Coorientadora : Dr^a Juliana Fonseca Moreira Silva

1. Microbiologia. 2. Engenharia de Alimentos. 3. Fruto tropical. 4. Biotecnologia. 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).

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUIZ EVANDRO DE MELO JUNIOR

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Lactobacillus* sp. DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DO FRUTO AMAZÔNICO TUCUMÃ (*Astrocaryum vulgare*)

Trabalho de Conclusão de Curso foi avaliado e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos e aprovado em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 09 / agosto / 2021

Banca Examinadora



Prof. Dr. Abraham Damian Giraldo Zuniga, UFT



Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim, UFT



Prof. Drª Eskálath Morganna Silva Ferreira, UFT

Palmas, 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo do curso. A minha mãe por ter feito o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui.

Ao meu best Raul por ter sido o melhor amigo que alguém possa ter nos momentos bons e ruins, assim também como a Isadora, Yasmin, Hellen, Maria Gabriela e Mara Polyana por serem as tóxicas mais perfeitas da minha vida e que de longe serão minha maior saudade da UFT. A Dhayna por ter um coração enorme e topado todos meus surtos. A Tábita e Kamila por serem minhas pet-friends favs e ajudado a segurar o forninho. A Romilda pelos 5 anos de parceria na luta de todo dia.

Ao Programa de Educação Tutorial – Engenharia de Alimentos por ter sido o grande responsável por minha formação acadêmica e pessoal. Ao professor Abraham por ter sido um tutor e um amigo durante esses últimos 4 anos. Aos meus antigos colegas do PET e amigos, Layon, Valeska, Letícia e Erika.

Ao LMGA, por ter me proporcionado educação e bons momentos. A Geovanka, Wilson, Breno e Gabriela por toda a parceria. E um agradecimento em especial a Juh e a Morgs por terem sido as orientadoras mais compreensivas e amigas que um aluno possa ter.

Aos meus professores, por minha formação e educação. A Universidade Federal do Tocantins, por ter me acolhido e se tornado minha segunda casa por 5 anos.

RESUMO

O Tucumã é um fruto da Amazônia que apresenta importantes princípios ativos benéficos para a saúde humana, que são pouco estudados e explorados. A sucessão microbiana ocorre durante processos fermentativos espontâneos, e comumente as bactérias do ácido láctico fazem parte destes processos. O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias do ácido láctico durante a fermentação espontânea do fruto Tucumã. Cerca de 210 microrganismos foram isolados e verificados *in vitro* quanto ao seu potencial probiótico através das características esperadas quanto ao gênero *Lactobacillus* sp., esses foram analisados quanto as estruturas morfotintoriais, teste de catalase e a tolerância sobre diversos fatores como: temperatura, pH, sais biliares e antagonismo de enteropatógenas e resistência aos antibióticos. Dentre todos isolados, 3 microrganismos (70, 72 e 86) tiveram resultados viáveis resistindo aos testes de temperatura a 37°C, resistência aos antibióticos (eritromicina, kanamicina, clindamicina e vancomicina), sais biliares na concentração de 0,3% e inibiram os enteropatógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogens*, demonstrando um possível potencial probiótico.

Palavras-chave: Biotecnologia, Microrganismos, Tucumã.

ABSTRACT

Tucumã is a fruit from the Amazon that presents important active principles beneficial to human health, which are little studied and explored. Microbial succession occurs during spontaneous fermentation processes, and lactic acid bacteria are commonly part of these processes. The objective of this work was to isolate lactic acid bacteria during the spontaneous fermentation of the Tucumã fruit. About 210 microorganisms were isolated and verified in vitro for their probiotic potential through the expected characteristics of the genus *Lactobacillus* sp., these were analyzed for morphotintorial structures, catalase test and tolerance to various factors such as: Temperature, pH, salts bile and enteropathogen antagonism and antibiotic resistance. Among all isolates, 3 microorganisms (70, 72 and 86) had viable results resisting the temperature tests at 37°C, antibiotic resistance (erythromycin, kanamycin, clindamycin and vancomycin), bile salts at a concentration of 0.3% and inhibited the enteropathogens *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogens*, demonstrating a possible probiotic potential.

Keywords: Biotechnology, Microorganisms, Tucumã

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visualização por microscopia de luz após a técnica de coloração de GRAM, demonstrando à forma de bacilos Gram positivos.....	23
Figura 2 - Perfil de resistência das concentrações celulares influenciadas pelo tempo de 0, 1, 2 e 3 horas incubação, no pH controle (6,8).....	26
Figura 3 - Perfil de Resistencia das concentrações celulares ($^{UFC}/mL$) frente ao pH 5 nos tempos 0,1 ,2 e 3 horas incubação.....	26
Figura 4 – Perfil de Resistencia das concentrações celulares ($^{UFC}/mL$) frente ao pH 3 nos tempos 0,1 ,2 e 3 horas de incubação.	27
Figura 5 – Perfil de Resistencia das concentrações celulares ($^{UFC}/mL$) frente ao pH 2 nos tempos 0,1 ,2 e 3 horas incubação.	27
Figura 6 - Perfil de tolerância dos microrganismos frente aos sais biliares Oxgall 0,3%	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição físico-química da polpa de tucumã determinada por Flor et al. (2015).	12
Tabela 2. Análise de susceptibilidade microbiana frente aos antibióticos	28
Tabela 3. Spot test Frente aos microrganismos Patógenos.....	31

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
2.REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 O FRUTO	12
2.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E SEUS BENEFÍCIOS	13
2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	15
2.4 EFEITOS BENÉFICOS DOS PROBIÓTICOS	16
3.OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4.MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS	18
4.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO (BAL) – <i>LACTOBACILLUS</i> SP.	18
4.2.1 <i>Teste de Coloração de GRAM e Teste da Catalase</i>	19
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO <i>IN VITRO</i> DAS BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>LACTOBACILLUS</i>	19
4.3.1 <i>Tolerância de crescimento a 37°C</i>	20
4.3.2 <i>Tolerância a diferentes valores de pH</i>	20
4.3.3 <i>Tolerância a sais de biliares</i>	20
4.3.4 <i>Resistência a antibióticos</i>	21
4.3.5 <i>Antagonismo frente a bactérias patogênicas</i>	21
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
5.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS, COLORAÇÃO DE GRAM, TESTE DE CATALASE E TESTE DE CRESCIMENTO A 37°C	22
5.2 RESISTÊNCIA À DIFERENTES VALORES DE PH	24
5.3 RESISTENCIA À ANTIBIÓTICOS	28
5.4 TOLERÂNCIA AOS SAIS BILIARES	29
5.5 ANTAGONISMO FRENTE À MICRORGANISMOS ENTEROPATÓGENOS	30
6.CONCLUSÃO	33
7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

O tucumã (*A. aculeatum*) é uma palmeira de origem na Amazônia, que se estende desde o norte da Bolívia, na Amazônia colombiana, na Venezuela, na Guiana, no Suriname e, no Brasil está presente em toda a Amazônia ocidental até o oeste do Pará, no Mato Grosso e Roraima. Seu fruto apresenta características sensoriais de suculência, com baixos teores de açúcares e ácido, apresenta altos teores de α -caroteno e valor energético elevado (SILVA et al., 2018; COUTINHO et al., 2020).

A espécie apresenta duas variedades em destaque, o tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) e o tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum* Meyer.). Ambas são palmeiras pertencentes à família Arecaceae, conhecidas popularmente como tucumanzeiro, com ampla distribuição na América do Sul (ZIMMER et al., 2020; SANTOS et al., 2015).

Os frutos podem ser micro habitats importantes para uma variedade de espécies de micro-organismos na natureza. Devido à sua alta concentração de açúcares simples e de baixo pH e visitas constantes por insetos vetores. Nestes substratos o desenvolvimento de leveduras e bactérias, envolvem diversos processos bioquímicos e ecológicos, incluindo a deterioração do fruto. Os principais microrganismos encontrados durante o processo fermentativo de um fruto são as leveduras e bactérias do ácido láctico e estes, podem ter um determinado potencial probiótico (MAMBUSCAY et al., 2013, WANG et al., 2015).

O termo “probiótico” de origem grega significa “para a vida” e tem sido utilizado das maneiras mais diversas ao longo dos últimos anos. A definição mais atual e oficial é da FAO/WHO (2001) que define como: “microrganismos vivos (leveduras ou bactérias) que quando administrados em quantidade adequada conferem um benefício à saúde do hospedeiro”.(CHEN et. al., 2010; BALIZA et al., 2018).

Dentre as características dos probióticos, está a estimulação dos mecanismos imunitários e não imunitários das mucosas, através de um antagonismo e ou concorrência com os patógenos potenciais, imunomodulação, promovendo mudanças nos perfis das citocinas pró e anti-inflamatórias e/ou modulação de resposta a antígenos alimentares. Alguns produzem certas vitaminas, como biotina, ácido fólico, ácido nicotínico e tiamina, proporcionando uma suplementação vitamínica ao hospedeiro, também podem ser capazes de produzir lactase, enzimas que podem contribuir para o alívio de cólicas abdominais, náusea e inchaço em intolerantes à lactose. Possuem ação na regulação do trânsito gastrointestinal, reduzindo inchaço ou produção de gases, além de melhorar a absorção de íons pelas células epiteliais do intestino. Para que esses benefícios sejam manifestos, o probiótico tem de ser capaz de

sobreviver à passagem pelo aparelho digestivo e resistir ao ácido estomacal e à bile, e ainda proliferar-se no intestino (VANDENPLAS et al., 2015; BALIZA et al., 2018; KABEERDOSS et al., 2011).

O impacto de probióticos na saúde humana tem direcionado o desenvolvimento econômico de produtos que os contêm, compreendendo entre 60% a 70% de todo o mercado de alimentos funcionais (BALIZA et al., 2018).

Os alimentos funcionais são definidos como alimentos que fornecem benefícios além dos nutricionais básicos. Estes benefícios são provenientes de compostos biologicamente ativos, que podem ser desde microrganismos a proteínas, vitaminas, dentre outras substâncias (LAU et al., 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho tem o intuito de descrever o isolamento, e a caracterização da microbiota de possíveis bactérias probióticas presentes no fruto amazônico tucumã (*A. vulgare*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O FRUTO

O tucumã (*Astrocaryum vulgare*) é um típico fruto amazônico, conhecido por diversos nomes, tais como, tucumã-do-amazonas, tucumã-açu e Jabarana. Apresenta características de succulência, baixa acidez, pouco teor de açúcar, presença elevada de β -caroteno e valor energético alto. Sua polpa é amplamente comercializada em feiras e comércios amazonenses, sendo ingrediente de diversos alimentos da cultura local (AZEVEDO, 2016). O fruto tem sua origem no estado do Amazonas-Brasil, onde há grande concentração da palmeira *Astrocaryum aculeatum*, porém, é encontrada também nos estados de Roraima, Mato Grosso, Pará, e nos países Venezuela, Bolívia, Colômbia e Guiana (OLIVEIRA et al., 2018).

Silva (2017), analisou físico-quimicamente o mesocarpo e epicarpo do tucumã, obtendo altos teores de proteínas (9,2 e 7,5 g.100g⁻¹, mesocarpo e epicarpo, respectivamente) e lipídios (32 e 17 g.100⁻¹ mesocarpo e epicarpo, respectivamente), quanto a umidade encontrou teores em torno de 37 g.100g⁻¹. E 1,7 e 1,8 g.100g⁻¹ para os teores de cinzas do mesocarpo e epicarpo, respectivamente. Sendo esses valores encontrados, com exceção da umidade, semelhantes a FAO (1987) para *Astrocaryum aculeatum*. Já Flor et al. (2015) realizou as análises físico-químicas da polpa do tucumã descritas na tabela 1.

Tabela 1. Composição físico-química da polpa de tucumã determinada por Flor et al. (2015).

Componente	Quantidade
Umidade	40,7 $\pm$ 5,1 g.100g ⁻¹
pH	6,1
Acidez	0,6 $\pm$ 0,1 %
Proteínas	3,7 $\pm$ 0,1 g.100g ⁻¹
Lipídios	37,4 $\pm$ 2,7 g.100g ⁻¹
Carboidratos	12,1 g.100g ⁻¹
Energia	399,7 kcal/g
Cinzas	1,9 $\pm$ 0,2 g.100g ⁻¹
Carotenoides totais	7,4 $\pm$ 1,2 mg. 100g ⁻¹

Fonte: Adaptada de Flor et al. (2015).

O seu alto valor lipídico tem grande importância no fornecimento de energia e colabora para a extração e produção de óleos, sendo produzido em média da polpa 37,5% de óleo amarelo e da amêndoa, cerca de 30 a 50% de óleo branco. Os lipídios também facilitam a absorção de carotenoides que são responsáveis pela cor amarelada do fruto (OLIVEIRA, 2018; FLOR et al., 2015).

Em geral, os frutos apresentam boas fontes de compostos bioativos, como vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos, sendo este último presente de forma considerável no tucumã. Silva et al. (2020) encontraram cerca de 131,21 mg. $100g^{-1}$ de ácido gálico, classificando o fruto como de médio potencial fenólico. Além do ácido gálico é encontrado também no tucumã ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina e quercetina (AZEVEDO, 2016).

A presença destes compostos abre espaço para uma série de aplicações biotecnológicas, o que torna importante estudar a microbiota autóctone do tucumã devido as possibilidades de serem encontradas linhagens microbianas com potenciais probióticos que podem ter aplicações industriais (COUTINHO, 2020).

2.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

O histórico dos mecanismos benéficos dos microrganismos probióticos vem sendo relatado há séculos, quando o cientista Henry Tessler do Pauster Institute, em Paris, desvendou que crianças que possuíam bactérias do gênero *Bifidobacterium*, no intestino apresentavam menos episódios diarreicos (KECHAGIA et al., 2013).

No entanto, apenas em 1907, o russo Eli Metchnikoff propôs que o uso destas linhagens probióticas remediavam episódios de intoxicação alimentar a partir da substituição dos microrganismos patogênicos pelas estirpes benéficas consumidas. (GORDON, 2008).

Segundo a FAO – *Food Agriculture Organization* e OMS - Organização Mundial da Saúde, os microrganismos probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; NET et al., 2014; RIZZOLI; BIVER, 2020).

O impacto de probióticos na saúde humana tem direcionado o desenvolvimento econômico de produtos que os contêm, compreendendo entre 60% a 70% de todo o mercado de alimentos funcionais. Sendo estes microrganismos aqueles que atingem as áreas finais do trato digestivo, exercendo um efeito benéfico na saúde do hospedeiro seja ele humano ou animal (BALIZA et al., 2018; NEME & MONSERRAT, 2020).

As culturas de *Lactobacillus* spp. estão entre estes produtos e se destacam por sua eficácia na melhoria de produção e nos indicadores de saúde (RONDÓN et al., 2018). Tais microrganismos não são patogênicos, podem compor a microbiota intestinal e podem ser utilizados no tratamento de doenças associadas ou não, a esse sítio (ISLAM, 2016). Dentre as bactérias com propriedades probióticas destacam-se as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* caracterizadas como Gram-positivos e anaeróbicos (CHEW et al., 2015; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Porém, além das bactérias, também existem gêneros de leveduras como a *Saccharomyces* espécie *Saccharomyces boulardii* que também desempenham papel probiótico (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017).

Entre as espécies do gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. ramhamusus*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri* e *L. casei*. Enquanto que as espécies de *Bifidobacterium* mais facilmente utilizadas como probióticos incluem *B. animalis*, *B. infantis*, *B. lactis* e *B. longum* (ISLAM, 2016).

O isolamento das estirpes com potencial probiótico pode ser realizado de diferentes nichos e seres como: humanos, animais, plantas, frutos, ou no ambiente (SHOKRYAZDAN et al., 2017). Diversos parâmetros são considerados importantes para que a classificação das linhagens isoladas possa ser validada como um potencial probiótico. Dentre eles destacam-se: apresentar resistência aos processos tecnológicos, ser capaz de aderir aos tecidos epiteliais, ser estável na presença de ácido e bile, ter capacidade de sobreviver no ambiente gastrointestinal e ser capaz de influenciar atividades metabólicas do hospedeiro, bem como a inibição de microrganismos patogênicos de origem alimentar e resistência à antibióticos. (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; KECHAGIA et al., 2013).

Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução nº 241 de 26 de julho 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, cita a necessidade da identificação e caracterização dessas estirpes por meio de métodos genotípicos e fenotípicos; especificação da origem e comprovação do depósito da cepa em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida (BRASIL, 2018).

Shokryazdan et al. (2017) relata que como última verificação para o reconhecimento da cepa como potencial probiótico, o status de segurança para humanos pode ser verificado através de testes *in vitro* e *in vivo* e sequenciamento de genoma, pois tratam-se de estudos mais

profundos acerca do assunto, sejam eles com objetivos de caracterizar o gênero e a espécie no qual fazem parte ou determinar as transformações realizadas por estas linhagens.

Do Carmo et al. (2018) e Islam (2016) propõem que há a necessidade de novas elucidações científicas quanto a formulação adequada para um melhor fornecimento de cepas a todas essas condições de obtenção, caracterização e identificação, fatores que coincidem com os objetivos do trabalho realizado.

2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias Ácido-Láticas, também conhecidas como BAL, são as espécies que se destacam-se na colonização do trato gastrointestinal, geralmente consideradas linhagens favoráveis a todas essas condições devido à sua capacidade de estimular o desenvolvimento da microbiota do hospedeiro, função digestiva, tolerância da mucosa, resposta imune estimulante e melhor resistência à doenças (RINGØ et al., 2018).

São amplamente utilizadas na indústria, na produção agrícola, na pecuária, engenharia farmacêutica. São capazes de enfrentar o baixo potencial hidrogeniônico (pH) para desempenhar suas propriedades probióticas, através do seu próprio crescimento e fermentação (WANG; CUI; QU, 2017).

Vale ressaltar que o uso clínico desses microrganismos depende de diversas questões particulares ao probiótico, como formulação, armazenamento, viabilidade, assim como fatores dependentes ao paciente, como a idade, patologia e condição clínica geral (DO CARMO et al., 2018; ISLAM, 2016).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017) as linhagens autorizadas para uso em suplementos no Brasil são: *Bacillus coagulans* BGI-30, *Bifidobacterium lactis* HN019, *Bifidobacterium lactis* BL-04, *Lactobacillus acidophilus* LA14, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* LC-11, *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Lactobacillus reuteri* DSM17938, *Lactobacillus helveticus* R0052, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus rhamnosus* LR-32, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 e *Lactococcus lactis* LL-23.

Segundo Zotta et al. (2017) o gênero *Lactobacillus*, com mais de 200 espécies e subespécies reconhecidas, é o maior entre as bactérias do ácido láctico (BAL). Até o momento 619 genomas de cepas de *Lactobacillus* estão disponíveis nos bancos de dados públicos do genoma (Integrado Genoma microbiano, IMG).

Devido seu amplo uso na saúde humana e produção de alimentos, várias espécies de *Lactobacillus* foram classificadas como microrganismos de qualidade alimentar pelo Food and Drug Administration (FDA) e atendem aos critérios de presunção qualificada de segurança proposto pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA).

Segundo a EFSA (2021), a presunção qualificada de segurança (PQS) é baseada em evidências razoáveis. Para obter o status PQS, um microrganismo deve atender aos critérios de identidade taxonômica bem definida, o corpo de conhecimento disponível quanto ao microrganismo deve ser suficiente para estabelecer sua segurança; deve haver a falta de propriedades patogênicas que necessita ser estabelecida e comprovada, além de seu uso pretendido deve ser claramente descrito.

ESFA (2021) os demais microrganismos que não atenderem os critérios descritos para os quais algumas questões de segurança possam ser identificadas ou para os quais não é possível concluir se eles representam uma preocupação de segurança para humanos, animais ou meio ambiente, não podem ser considerados adequados para o status e devem ser submetidos à uma avaliação de segurança completa. Se uma avaliação concluir que um grupo de microrganismos não levanta questões de segurança, o grupo recebe o “status QPS” – Presunção de Segurança Qualificada.

Segundo Zotta et al. (2017) estes parâmetros são avaliados no uso pretendido na indústria de alimentos, a existência de uma lista de espécies e subespécies de *Lactobacillus* com QPS, usadas como culturas alimentares microbianas (MFC) e / ou como suplemento probiótico em alimentos e rações

Portanto, mais pesquisas *in vivo* serão muito necessárias para caracterização, segurança na preparação e na qualidade das linhagens administradas seja para a produção de novos alimentos, rações e suplementos com caráter funcional e probiótico (CAMERON et al., 2017; KECHAGIA et al., 2013; RINGØ et al., 2018).

2.4 EFEITOS BENÉFICOS DOS PROBIÓTICOS

Embora existam dados clínicos conflitantes sobre muitas cepas e formulações, o consumo de probióticos aumentou significativamente nos últimos anos. A literatura propõe a melhoria da qualidade de evidências clínicas, transparência quanto às alegações dos produtos comercializados, conscientização do consumidor, assim como sua regulamentação frente aos órgãos de saúde (SUEZ et al., 2019).

Os efeitos desses probióticos no hospedeiro ocorrem principalmente por competição de nutrientes frente às bactérias patogênicas, imunomodulação, mudança de pH local que impe a colonização de patógenos (SÁNCHEZ et al., 2017; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017).

Do Carmo et al. (2018) afirma que a infecção bacteriana intestinal se trata da colonização epitelial realizada pelo patógeno, com a produção de mucinas pelas células caliciformes e de peptídeos antimicrobianos, como as defensinas e catelicidinas, pelas células intestinais. As células dendríticas fagocitam o agente patogênico e apresentam seus antígenos aos linfócitos T. Estes, por sua vez, liberam citocinas responsáveis pela ativação das células B, com subsequente liberação de imunoglobulina A (IgA), anticorpos específicos para o patógeno infeccioso.

Dentro deste contexto, considerando que as cepas probióticas ocupam os mesmos receptores dos microrganismos patogênicos, sua colonização na microbiota intestinal diminui a incidência de doenças oriundas desses agentes. Isso se deve ao fato dos probióticos provocarem maior estimulação na produção de mucina e de peptídeos antimicrobianos, com aumento da estabilidade da junção celular, maior liberação de IgA pelas células B ativadas e inibição do crescimento de patógenos pela produção de moléculas antimicrobianas, como ácidos graxos de cadeia curta, bacteriocinas e microcinas (DO CARMO et al., 2018; RAGHUWANSHI et al., 2018)

Além de suas contribuições para a qualidade de vida e segurança alimentar, os probióticos atraíram um interesse considerável devido às suas potencialidades para adicionar propriedades funcionais à certos alimentos e terapêuticas como suplementos projetados para oferecer benefícios adicionais ao longo seus valores nutricionais básicos e contribuem para a saúde humana (DOUILLARD & VOS, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, e caracterizar o potencial probiótico *in vitro* de linhagens obtidas a partir da fermentação do fruto Tucumã (*Astrocaryum vulgare*).

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a fermentação do fruto Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) por 15 dias e isolar os microrganismos nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de fermentação;

- Verificar resistência das linhagens isoladas à Temperatura de 37 °C
- Verificar resistência das linhagens isoladas ao pH 2, 3, 5 e 7;
- Verificar resistência das linhagens isoladas aos sais biliares;
- Verificar o potencial antagonista das linhagens isoladas frente as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella entérica* subsp. Typhimurium (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739).
- Verificar a resistência das linhagens isoladas à diferentes antibióticos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS

Os frutos de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) foram coletados na feira livre de Manaus-AM e armazenados em caixa isotérmica refrigerada a fim de se manter a microbiota presente inalterada. Posteriormente, foram enviados ao laboratório de Microbiologia geral e aplicada da UFT – Campus de Palmas. As amostras foram selecionadas, considerando-se os critérios de qualidade relacionados à ausência de danos e podridões visuais, descartando-se os frutos injuriados. Por seguinte, foram lavados com água corrente e higienizados em solução clorada a 10 mg/L por 15 minutos e enxaguados com água destilada estéril.

Após a higienização, cerca de 25 g dos frutos foram pesados, macerados em homogeneizador tipo Stomacker (logen) e acondicionados em sacos plásticos estéreis para fermentarem espontaneamente por 15 dias à temperatura de 25 °C, em microaerofilia (NASCIMENTO et al., 2017).

5.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO (BAL) – *LACTOBACILLUS* SP.

O isolamento dos microrganismos ocorreu de acordo com a metodologia proposta por Ribeiro (2012) com modificações. Adicionou-se às 25 g do fruto, um volume de 225 mL de solução salina peptonada estéril (SILVA et al., 2017), em seguida a amostra foi homogeneizada em *Stomacker*, durante 02 min. Posteriormente, foram realizadas sucessivas diluições seriadas (até 10^{-7}) e a partir de cada uma das diluições obtidas, uma alíquota de 100µL foi inoculado e espalhado com o auxílio da alça de *Drigalski* na superfície das placas de Petri, que continham os meios de cultura ágar MRS acidificado (Man, Rogosa e Sharpe). As placas contendo o meio

de cultura MRS foram incubadas a 25°C, durante 72 horas em microaerofilia. O isolamento foi realizado nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 de fermentação, em duplicata.

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas, foram caracterizadas de acordo com suas características morfológicas. Realizou-se a contagem total dos morfotipos encontrados. Após este processo, os micro-organismos foram isolados e purificados. As bactérias foram preservadas em tubos criogênicos contendo caldo MRS acrescentados de 20% de glicerol e em tubos contendo ágar MRS inclinado com óleo mineral, todos os tubos foram armazenados em freezer -80°C e a 4°C, respectivamente (SILVA et al., 2017).

4.2.1 Teste de Coloração de GRAM e Teste da Catalase

O teste de coloração de GRAM seguiu-se de acordo com a metodologia de Silva et. Al. (2014) para a verificação das características morfotintoriais dos isolados. Se correspondiam as características visuais relacionadas ao gênero *Lactobacillus*.

Para a técnica de coloração o material microbiológico foi adicionado em lâmina e solução salina e secado em bico de Bunsen para a obtenção do esfregaço. Posteriormente, os reagentes atuantes na técnica: cristal violeta, lugol, descorante e fucsina foram utilizados para a coloração. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur o primeiro reagente adicionado foi o cristal violeta por 1 minuto, em seguida, lavado em água corrente. O mesmo procedimento se deu com o lugol por 1 minuto, descorante por 15 segundos e por último fucsina por 30 segundos. Todas as lâminas foram verificadas utilizando o microscópio óptico.

O teste da Catalase foi realizado com o auxílio da solução de Peróxido de Hidrógeno 3%. Visualmente se o material microbiológico apresentasse borbulha correspondia ao teste positivo de catalase, característica indesejável aos isolados, caso contrário catalase negativa, caracterizava os isolados de *Lactobacillus*.

5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO *IN VITRO* DAS BACTÉRIAS DO GÊNERO *LACTOBACILLUS*

Após a obtenção dos microrganismos e purificação dos isolados que apresentaram as características morfotintorias do gênero *Lactobacillus* sp. (cocos ou bacilos Gram positivo, e catalase (-)) esses foram avaliados em relação ao potencial probiótico *in vitro* de acordo com as análises a seguir.

4.3.1 Tolerância de crescimento a 37°C

Os microrganismos isolados foram testados quanto a capacidade de crescer na temperatura de 37°C. Para tanto, todos os isolados foram inoculados em caldo MRS e submetidos a esta temperatura por um período de até 72h, em banho Maria e em microaerofilia. Após este período, uma alíquota foi retirada dos tubos e estriada em placas de Petri contendo o meio Agar MRS sendo novamente incubadas nas mesmas condições anteriormente citadas, para confirmação da viabilidade microbiana (REHAIEM et al., 2014).

4.3.2 Tolerância a diferentes valores de pH

Com os microrganismos resistentes ao teste de temperatura, prosseguiu-se com o teste de tolerância a diferentes valores de pHs. Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio MRS, e através da biomassa resultante foi padronizada uma concentração de cada microrganismo, em escala *Mcfarland* 5, com o valor $1,5 \times 10^9$ UFC/ml. Posteriormente, uma alíquota de 1 ml da concentração de cada isolado foi adicionada dentro dos tubos contendo 9 ml de caldo MRS ajustado com ácido clorídrico (1 M) aos diferentes valores de pHs avaliados: 2, 3, 5 e controle (pH inalterado) e incubados a 37°C em microaerofilia por até 3h, durante este período foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 1, 2, e 3 horas de incubação e estriados em placas contendo MRS, esta metodologia foi realizado para uma triagem inicial. Após a realização da triagem os microrganismos que permaneceram viáveis foram submetidos a metodologia de quantificação celular.

A quantificação celular foi realizada no equipamento *Spiral Plater* (IUL Instrumentos, Barcelona, Espanha) no qual uma alíquota de cada tubo foi retirada. Após o plaqueamento nos tempos e pHs, já pré determinados, as placas de Petri contendo MRS, foram incubadas a 37°C em microaerofilia por até 48h, finalizado este período a leitura das amostras foram realizadas pelo contador automático de colônias *Flash & Go* (IUL Instrumentos, Barcelona, Espanha) e os resultados expressos em logaritmo decimal de unidade formadora de colônias (Log10 UFC) (SILVA et al., 2015; REHAIEM et al., 2014; UECKER et al., 2018; SAARELA et al., 2006).

4.3.3 Tolerância a sais de biliares

As cepas que foram viáveis ao teste de diferentes valores de pH foram submetidas ao teste de tolerância a sais biliares. Os isolados foram inoculados em ágar MRS e incubados a 37°C em microaerofilia por até 48 h para formação de biomassa. Após este período esta biomassa foi raspada com auxílio de alça bacteriológica e a concentração celular foi ajustada

para $1,5 \times 10^9$ UFC /mL em 9 mL de salina a 0,85% de acordo com a escala de *McFarland* posteriormente 1 ml da concentração celular de cada isolado, foi adicionada ao caldo MRS contendo um *pool* de sais biliares Oxgall na concentração de 0.3% e incubados durante 6h.

No decorrer deste período, 50µL do crescimento microbiano (caldo MRS suplementado com 0,3% de Oxgall) foi inoculado em placas de Petri contendo MRS nos tempos de: 0, 2, 4 e 6 horas, utilizado o equipamento *Spiral plater*. Todas as placas foram incubadas à 37°C/48 horas em microaerofilia. Após a incubação, a leitura e a contagem das colônias nas placas foram realizadas pelo contador automático *Flash & Go* e os resultados expressos em logaritmo decimal de unidade formadora de colônias (Log10 UFC) (SANCHEZ et al., 2015; SILVA et al., 2015; GILLILLAND et al., 1984).

4.3.4 Resistência a antibióticos

Para os testes de resistência aos antibióticos, os microrganismos isolados foram previamente cultivados em meio ágar MRS, e depois realizada a padronização da concentração de células, através da escala McFarland 5, que corresponde a $1,5 \times 10^9$ UFC/ml. Com o auxílio de um swab, as cepas foram inoculadas em meio ágar MRS, e a seguir foram adicionados os discos de antibióticos de: Ampicilina – AMP (10µg); Vancomicina – VAN (30 µg); Kanamicina – KAN (30 µg); Cloranfenicol – CLO (30 µg); Eritromicina – ERI (15 µg); Clindamicina – CLI (2 µg) e Gentamicina – GEN (10 µg). Os testes foram realizados em triplicata, todas as placas foram incubadas por 48h. a 37°C, em microaerofilia (ARGYRI et al., 2013; LEHTO & SALMINEN 2020; TARRAH et al., 2018; LEMOS JUNIOR et al., 2020; NCCLS 2003). A leitura dos halos de inibição foi realizada com paquímetro digital e as amostras foram classificadas como resistentes, moderadamente sensíveis ou sensíveis aos antimicrobianos de acordo com a tabela proposta por Charteris et al. (1998).

4.3.5 Antagonismo frente a bactérias patogênicas

Na avaliação de antagonismo frente bactérias patogênicas, os microrganismos isolados foram testados contra enteropatógenos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella 21ntérica subsp. Typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). As técnicas utilizadas foram ágar *spot test*. Para a realização dos testes a biomassa de cada isolado foi realizada conforme descrito anteriormente no teste de tolerância a sais biliares. A concentração celular dos isolados foram ajustadas no valor de

$1,5 \times 10^9$ UFC/ml, e as bactérias enteropatógenas foram padronizadas para de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml de acordo com a escala McFarland 0.5.

No método agar *spot testa* partir da escala padronizada dos microrganismos isolados, foi transferida uma alíquota de 10 μ L para o centro da placa de Petri previamente preparada contendo ágar MRS, utilizando a técnica da microgota. Em seguida as placas foram incubadas à 37 °C, por 24 h em microaerofilia. Após esse período, uma amostra de 10 μ L concentração celular padronizada das cepas patogênicas foi adicionada em diferentes tubos contendo cerca de 10 mL de meio ágar semissólido BHI (*Brain Heart-Infusion*), posteriormente cada tubo contendo as diferentes cepas patogênicas, foi homogeneizado e vertido sobre o crescimento visível dos isolados, e incubados novamente por até 48 horas à 37 °C, em aerobiose, após este período foi realizada a leitura com o auxílio de uma paquímetro digital medindo-se em milímetro o diâmetro dos halos inibitórios. O delineamento estatístico foi realizado pelo Teste T à 5% de significância pelo software BioEstat 5.0 (JACOBSEN et al., 1999; VITALI et al., 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS, COLORAÇÃO DE GRAM, TESTE DE CATALASE E TESTE DE CRESCIMENTO A 37°C

Os microrganismos com possíveis potenciais probióticos foram isolados nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de fermentação. Durante o processo de fermentação foram obtidas 210 bactérias, no entanto não foi observado uma variável biodiversidade bacteriana no meio MRS, ficando reduzido apenas a um morfotipo de acordo com as características macroscópicas, sendo observada a forma circular, margem inteira, presença de brilho, elevação do tipo convexa, com tamanhos predominantemente $< 0,1$ cm.

Todos os isolados foram submetidos a coloração de Gram, no entanto, muitos destes não corresponderam as características morfotintoriais esperadas para o gênero *Lactobacillus*, o que reduziu a quantidade de isolados. De 210 isolados, para 173 isolados que apresentaram estruturas de cocobacilos ou bacilos GRAM positivo, correspondentes ao do gênero esperado (figura 1) (SILVA et al., 2017).

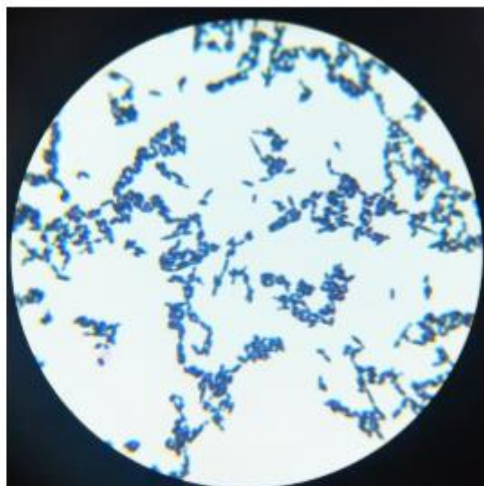


Figura 1 – Visualização por microscopia de luz após a técnica de coloração de GRAM, demonstrando à forma de bacilos Gram positivos.

Fonte: Próprio autor (2019).

A partir dos 173 isolados selecionados pela coloração de Gram, foi realizado o teste de catalase, onde 117 isolados mostraram resultado de catalase negativo característica fisiológica e importante que defini as bactérias ácido-láticas. De acordo com Zanini et al. (2012) essas bactérias, são definidas como morfologicamente bastonetes, Gram-positivas e catalase negativa. Nesse estudo foi utilizado o meio Ágar MRS acidificado (Man, Rogosa e Sharpe – Acumedia) que possui seletividade para o gênero lactobacilos, dessa forma as características de alguns isolados foram compatíveis com as do gênero de bactéria desejado.

Ao reativar os isolados característicos de *Lactobacillus* sp., para iniciar os testes de avaliação do potencial probiótico *in vitro*, alguns não apresentaram viabilidade representando uma perda de aproximadamente 20% dos isolados. Desta forma, 93 isolados ativos e viáveis foram utilizados nos testes de crescimento a 37°C. Destes 71 apresentaram resultados positivos de crescimento na temperatura analisada, o que demonstra possível resistência e capacidade de desenvolvimento de temperatura semelhante à temperatura corporal, fator que pode caracterizar como potenciais micro-organismos probiótico.

De acordo com Silva et al. (2020) a indústria mostra um interesse emergente em microrganismos benéficos como probióticos e a resistência a altas temperaturas é uma característica essencial destes microrganismos quando trabalha-se na concepção de produtos alimentícios e para se manterem viáveis nas concentrações adequadas.

Para Desmond et al. (2002) e Papadimitriou et al. (2016) a adaptação à temperatura e a resistência de *lactobacillus* sp podem ser avaliadas geralmente na produção relacionada com alimentos, buscando determinar se os microrganismos resistem a temperaturas por períodos de

tempo muito curtos, ou se eles podem aumentar sua taxa de sobrevivência após a exposição ao estresse ou processo tecnológico. Silva et al. (2020) ainda afirma que para obter um grande número de células viáveis e uma vida útil prolongada de microrganismos probióticos no produto projetado, é exigido aplicar procedimentos tecnológicos usando altas temperaturas ou mudanças abruptas, que resultam em condições que são diferentes da temperatura ideal de crescimento para a caracterização de resistência.

Desta forma, a pré-adaptação celular durante a fermentação e a temperaturas de armazenamento e processamento são estratégias aplicadas para facilitar a análise do termo resistência de bactérias lácticas relacionadas a aplicação em alimentos em particular aos *Lactobacillus* sp (FERRANDO et al., 2015; YANG et al., 2017 e ARENA et al., 2019). De acordo com Silva et al. (2020) ao observarem o crescimento de 30 cepas de lactobacilos probióticos, esses verificaram que os isolados apresentaram padrões diferentes de crescimento no teste de temperaturas 37 °C. Esses resultados demonstram que a resistência às temperaturas mais elevadas do que o ideal é dependente da cepa e não é relacionada à espécie ou às características metabólicas do grupo de bactérias ácido lácticas.

5.2 RESISTÊNCIA À DIFERENTES VALORES DE PH

Para analisarmos os 71 isolados que sobreviveram a 37°C verificou-se se os isolados seriam resistentes ou não aos diferentes valores de pH estipulados: 2, 3, 5 e controle (pH inalterado do meio MRS) por até 3 horas. Apenas 15 sobreviveram em todos os pHs testados no decorrer do tempo (isolados: 62, 64, 65, 70, 72, 76, 80, 82, 86, 90, 92, 96, 97, 127 e 146) e, portanto, prosseguiram para a próxima etapa, no qual foi realizado a quantificação de células resistentes ao diversos pHs.

Para a realização da avaliação da concentração celular a metodologia utilizada foi através do equipamento *Spiral plater* acoplado ao contador automático de colônias *Flash & Go*, metodologia descrita no item 3.3.2.

A partir dos resultados é possível gerar um perfil gráfico que demonstra o comportamento dos isolados selecionados frente as condições expostas. Por tratar-se de uma condição comum não influenciou no crescimento dos microrganismos. Pois o pH controle trata-se do potencial hidrogeniônico inalterado do meio MRS, seletivo para microrganismos do gênero *Lactobacillus* ssp., principal alvo de interesse na investigação. Pelo gráfico infere-se que nestas condições, a maioria dos isolados desenvolveram-se naturalmente, exceto pelos microrganismos 80 e 96, que não sobreviveram ao teste.

Podemos observar que no tempo 0 (zero) a concentração celular (UFC/mL) dos isolados mantiveram uma concentração dentro do esperado, variando de $3,07 \times 10^7$ a $1,07 \times 10^7$ quando comparados com o controle (La), sendo uma concentração ideal para o desenvolvimento de um alimento com potencial probiótico de acordo com dados da ANVISA (2014).

Para analisar o perfil das concentrações dos isolados no pH 5, observamos na Figura 3, que a maioria dos microrganismos permaneceram estáveis nestas condições, no entanto, os isolados 62, 64, 65 e 127 apresentaram uma redução na concentração celular no tempo de 3 horas quando comparado com o controle ficando abaixo do preconizado pela ANVISA (2014) que estabelece uma concentração mínima de 10^8 UFC/mL.

Na figura 4 observamos os resultados das concentrações celulares dos microrganismos no pH 3, dos isolados testados apenas 4 (70, 72, 76 e 86) permaneceram viáveis no tempo analisados, quando comparados ao controle *Lactobacillus acidophilus*, por outro lado, os outros isolados 62, 64, 65, 80, 82, 90, 92, 96, 97, 127 e 146 apresentaram uma redução significativa no tempo de 3h quando comparadas a concentração celular do controle, indicando que estes isolados não permaneceriam viáveis quando submetidos aos stress do sistema gastrointestinal.

A figura 5 representa os resultados das concentrações celulares das cepas isoladas quando submetidas ao pH 2. Analisando a figura, verificamos que nenhum dos microrganismos sobreviveram até o tempo de 3h em um pH baixo em uma concentração considerável.

O pH do suco gástrico é tipicamente 3,0, sendo que o pH 2,0 é frequentemente usado para simular condições estomacais extremas (TSAI et al., 2005). Em relação a este assunto, os testes *in vitro* são realizados para determinar as propriedades probióticas desejáveis. Apesar da grande redução nos tratamentos, as cepas probióticas serão provavelmente tamponadas por alimentos ou outras moléculas de matriz transportadora após o consumo, e, portanto, provavelmente não serão expostas a extrema acidez no estômago (RUBIO et al., 2014).

Segundo Klungsupya et al. (2020) a resistência ao meio ácido do sistema gástrico e a tolerância à bile são pré-requisitos para a sobrevivência e função no trato intestinal dos probióticos. No entanto, é geralmente aceito que uma cepa com tolerância total a pH 3 tem alta resistência a ácidos, que no trabalho foram as cepas 70, 72, 76 e 86. (ARGYRI et al., 2013; GUO et al., 2010; LIN et al., 2006).

Gomaa, et al. (2020) descrevem em seus estudos que a mudança no pH podem ser capazes de reduzir a concentração celular dos microrganismos, reforçando os resultados observados neste trabalho. Os autores observaram que a maior taxa de redução foi detectada em *L. acidophilus* (redução de 3,02 vezes) o mesmo aconteceu com os nossos achados, sendo também observado com o nosso controle (*L. acidophilus*). Estes mesmos autores, descrevem

que a utilização de probióticos para avaliação da tolerância à acidez e à bile *in vitro* é preditiva para avaliar a sobrevivência de uma cepa no trato gastrointestinal.

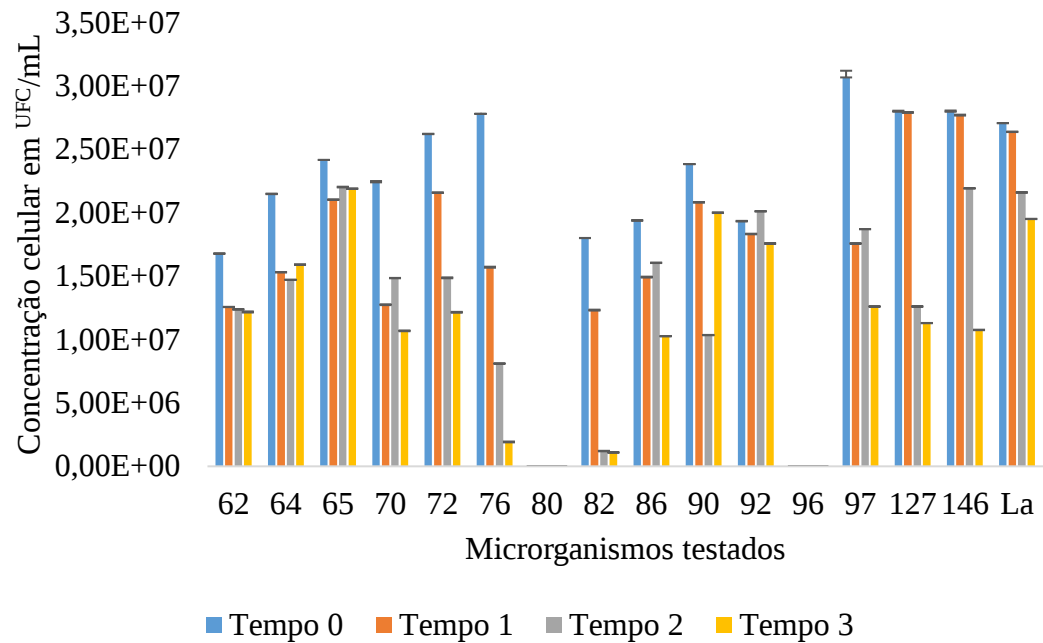


Figura 2 - Perfil de resistência das concentrações celulares influenciadas pelo tempo de 0, 1, 2 e 3 horas incubação, no pH controle (6,8)

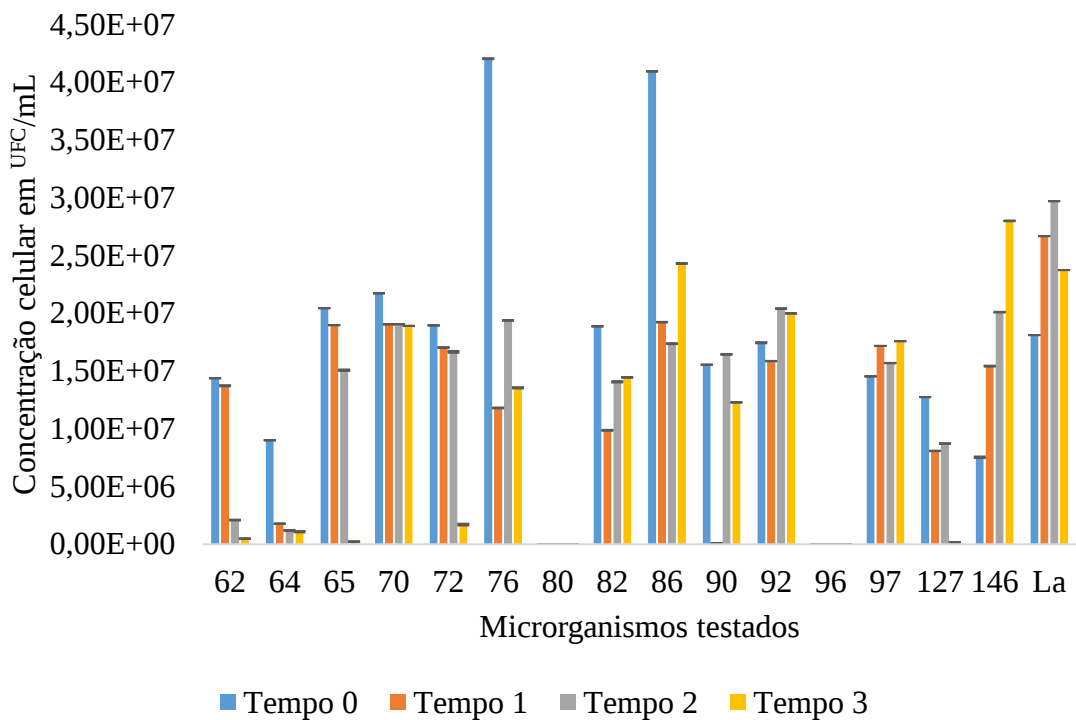


Figura 3 - Perfil de Resistencia das concentrações celulares (UFC/mL) frente ao pH 5 nos tempos 0,1 ,2 e 3 horas incubação.

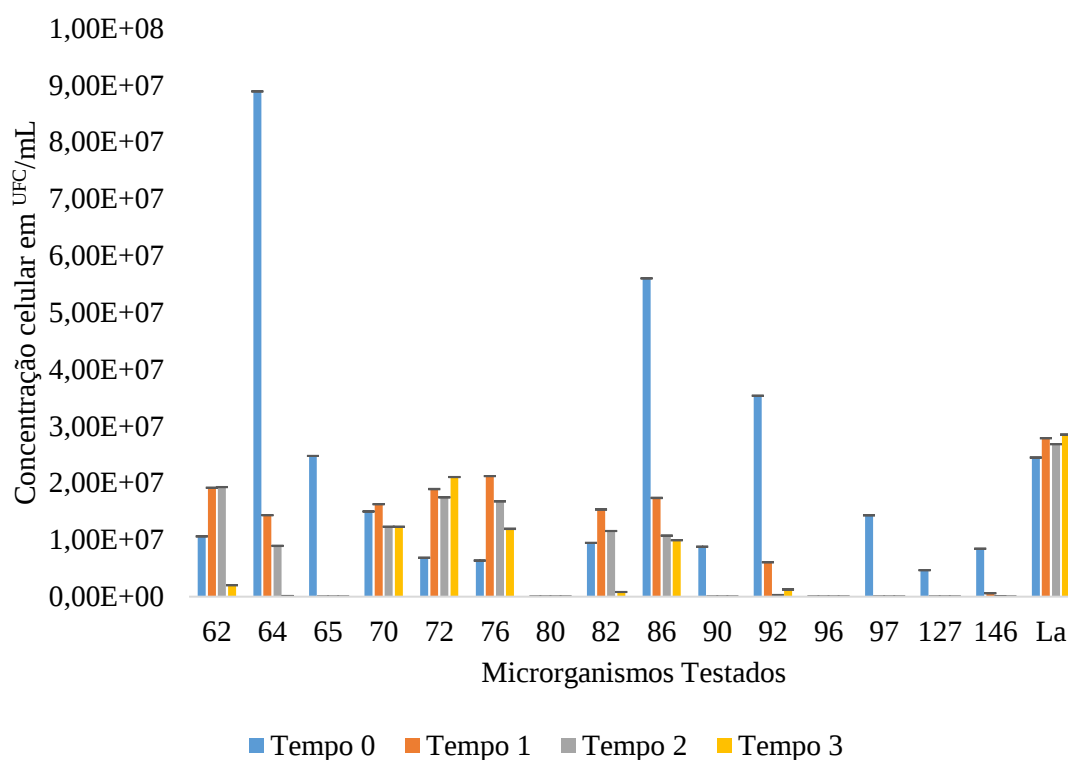


Figura 4 – Perfil de Resistencia das concentrações celulares (UFC/mL) frente ao pH 3 nos tempos 0,1,2 e 3 horas de incubação.

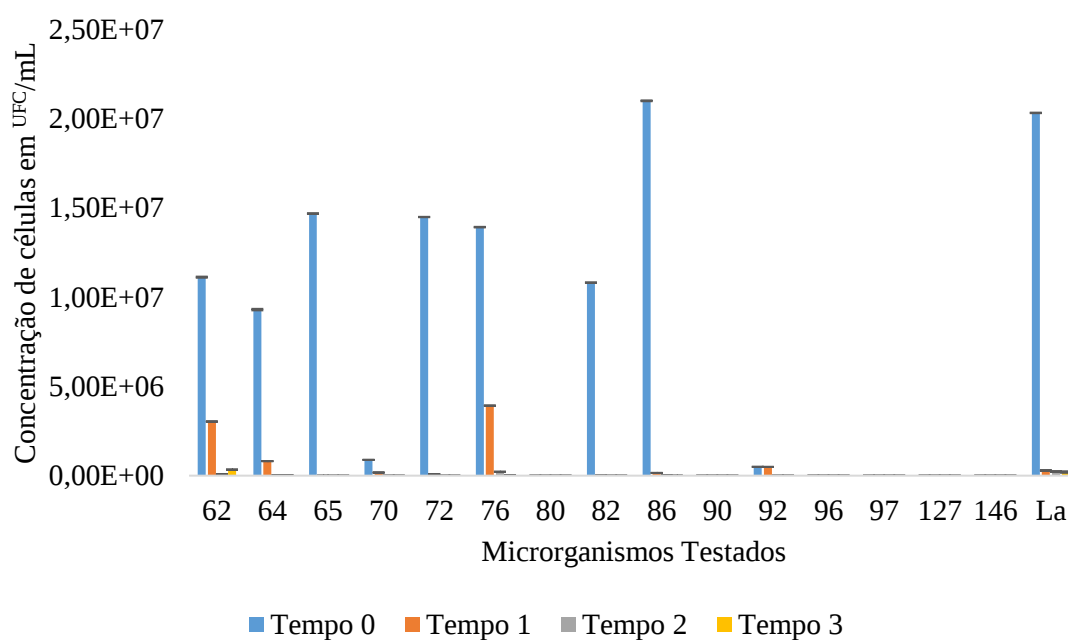


Figura 5 – Perfil de Resistencia das concentrações celulares (UFC/mL) frente ao pH 2 nos tempos 0,1,2 e 3 horas incubação.

5.3 RESISTENCIA À ANTIBIÓTICOS

Apenas os microrganismos que sobreviveram ao teste de resistência à diferentes valores de pH (70, 72, 76, e 86) foram submetidos a resistência a antibióticos. Foram utilizados no teste os discos de antibióticos: Ampicilina –AMP (10µg); Vancomicina - VAN (30 µg); Kanamicina - KAN (30 µg); Cloranfenicol - CLO (30 µg); Eritromicina – ERI (15 µg); Clindamicina - CLI (2 µg) e Gentamicina - GEN (10 µg) para a verificação da susceptibilidade microbiana. Os resultados à sua susceptibilidade, seja: R – resistente, MS – Moderadamente Suscetível e S – suscetível são mostrados na tabela 2 a seguir (CHARTERIS, 1998).

Tabela 2. Análise de susceptibilidade microbiana frente aos antibióticos

Microrganismos	Antibióticos						
	AMP	ERI	KAN	VAN	GEN	CLI	CLO
70	R	R	R	R	MS	R	R
72	R	R	R	R	R	R	R
76	R	R	R	R	S	R	MS
86	S	R	R	R	R	R	R

Legenda: R – Resistente; S – Suscetível e MS – Moderadamente Suscetível.

Os resultados demonstraram que todas as cepas foram resistentes em relação aos antibióticos: Eritromicina, Kanamicina, Clindamicina e Vancomicina. O isolado 86 demonstrou ser sensível apenas ao antibiótico ampicilina, o isolado 70 e o 76 demonstraram uma sensibilidade moderada aos antibióticos: gentamicina e cloranfenicol, respectivamente. Apenas o isolado 72 foi resistente a todos os antibióticos testados.

Wang et al. (2020) em seus estudos, estabelece que o padrão de suscetibilidade dos isolados de BAL a diferentes antibióticos deve ser de resistência, resultados parecidos com os encontrados em nosso estudo e consideram que a resistência entre os isolados de BAL parece variar entre as espécies.

Segundo Ouarabi et al. (2019) uma das principais preocupações quanto ao uso e segurança de BAL como probiótico é a resistência aos antibióticos principalmente pela possível transferência do gene de resistência para bactéria patogênica.

Cui et al. (2018) relataram que *Lactobacillus* e *Pediococcus* são gêneros que intrinsecamente resistentes à Vancomicina, sendo observado em nossos resultados. Para Tenea et al. (2020) a resistência a antibióticos é um critério a ser considerado a partir de uma

perspectiva de biossegurança, proporcionando uma nova alternativa do desenvolvimento de novos antibióticos, principalmente porque a resistência dos patógenos é considerado um problema de saúde pública.

Outros estudos que validam os achados do presente estudo demonstram que as cepas probióticas podem ser resistentes à ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloranfenicol (EFSA, 2012; Fraqueza et al. 2015). Sendo assim, os resultados encontrados direcionam para um possível potencial probiótico destes isolados visto que estes apresentaram multirresistência.

5.4 TOLERÂNCIA AOS SAIS BILIARES

Os isolados selecionados foram submetidos ao teste de resistência a sais biliares posteriormente onde permaneceram por até 6h em caldo MRS suplementado com 0,3% de Oxgall. Os resultados são expostos na figura 6.

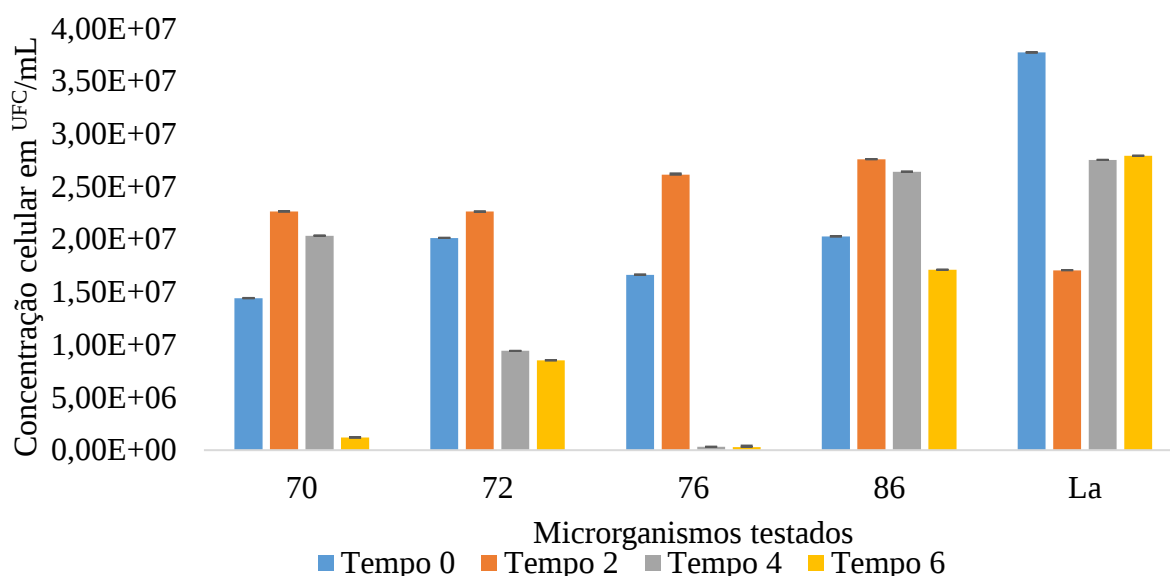


Figura 6 - Perfil de tolerância dos microrganismos frente aos sais biliares Oxgall 0,3%

Desta forma, observou-se que as cepas 72 e 86 foram as que obtiveram uma menor influência na concentração celular durante 6 horas, quando comparadas ao controle, apresentando no tempo de 6h a concentração de $8,52 \times 10^6$ UFC/mL e $1,71 \times 10^7$ UFC/mL. O isolado 76 obteve redução de sua concentração celular (98,85%) a partir do tempo 4, já o isolado 70 observamos uma redução significativa apenas no tempo 6 (99,16%) quando comparado ao *L. acidophilus* (controle).

Segundo Xu et al. (2019) a concentração de sais biliares no intestino delgado humano varia de 0,03% a 0,3%. Os sais biliares em altas concentrações têm a capacidade de dissolver a membrana lipídios, o que leva apoptose celular. A bile é armazenada na vesícula biliar e flui para o duodeno durante a digestão, facilitando a solubilização e absorção de gorduras dietéticas. Em condições fisiológicas normais, nosso intestino mantém a concentração de sal biliar em uma faixa entre 2% e 0,05% para moldar o perfil da comunidade microbiana encontrada no intestino (ISLAM et al., 2011).

Klungsupya et al. (2020) verificaram que a cepa probiótica utilizada em seu estudo não sofreu redução significativa quando exposto a 0,3% de sal biliar por 4 horas, o mesmo comportamento foi observado por 3 cepas (70, 72 e 86) no nosso experimento. Com base nos resultados obtidos pelos autores, o teste de tolerância a sais biliares, pode demonstrar que o microrganismo pode ser adequado para administração oral, sugerindo que os nossos isolados tenham as mesmas características.

Para os mesmos autores acima citados a identificação de cepas que apresentam maior tolerância aos sais biliares indica propriedades probióticas adequadas. É importante para garantir a eficácia dos microrganismos probióticos, incluídos em produtos alimentícios. Para alcançar o cólon em um estado viável, os probióticos devem lidar com desafios de estresse específicos em todo o trato gastrointestinal.

5.5 ANTAGONISMO FRENTE À MICRORGANISMOS ENTEROPATÓGENOS

As cepas que sobressaíram no teste de resistência a sais biliares foram submetidas ao teste de antagonismo frente as bactérias enteropatogênicas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella enterica subsp. Typhimurium* (ATCC 14028) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), pela técnica do ágar spot.

A tabela 3 demonstra os resultados das bactérias isoladas da fermentação espontânea frente aos enteropatógenos. Os resultados foram analisados pelo Teste T à 5% de significância. Na prática o fato de o perfil estatístico acusar como não significativo (NS) indica que tanto os isolados quanto ao controle utilizado *L. acidophilus* apresentam o mesmo comportamento inibitório dos patógenos.

Na tabela abaixo observamos que a bactéria *Salmonella enterica subsp. typhimurium* (ATCC 14028), não foi inibida por nenhum dos isolados. O isolado 70 inibiu apenas a cepa de *S. aureus*. A bactéria *E.coli* foi inibida apenas pelo isolado 86 e a *L. monocytogenes* pelos isolados 72 e 76 quando comparado ao controle.

Tabela 3. Spot test Frente aos microrganismos Patógenos

MO	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. tiphymurium</i>	
	Zona de Inibição (mm)	C+ (mm)	Zona de Inibição (mm)	C+ (mm)	Zona de Inibição (mm)	C+ (mm)	Zona de Inibição (mm)	C+ (mm)
70	11.12 NS	13.33	0 S	30.1	0 S	20.7	0 S	21.6
72	14.93 NS	12.92	32.50 NS	34.28	0 S	23.38	0 S	22.48
76	0 S	18.06	22.61 NS	19.1	0 S	22.06	0 S	21.06
86	0 S	18.18	0 S		20.79 NS	23.18	0 S	22.28

Legenda: S – Significativo, os dados possuem diferença estatística pelo Teste t à 5%; NS- Não significativo – os dados não possuem diferença estatística pelo Teste t à 5%. C+ é o controle positivo utilizado microrganismo *Lactobacillus acidophylus*.

Umar et al. (2020) destacam a importância do efeito antibacteriano demonstrado pelas cepas de *lactobacillus* spp, estes autores observaram os valores de halos de inibição para o microrganismo *Staphylococcus aureus* permaneceram na faixa entre 15,60 – 21,20 mm, valores que não diferem muito da faixa de inibição provocadas pelos os microrganismo isolados (72) que ficou na faixa de 15,35 – 18,94 mm.

Wang et al. (2020) realizou investigações com 11 cepas de BAL avaliando o potencial antimicrobiano. Entre as cepas selecionadas, todas mostraram atividade moderada contra *E. coli* ATCC 30105 com halos entre 10 – 15 mm, valores que corroboram com o obtido no experimento para o isolado 86 (20,79 mm).

A *L. monocytogenes* também se apresentou suscetível quanto a atividade antagonista dos isolados. Sendo inibida pelos isolados 72 e 76 com halos que variaram entre 22 e 32 mm quando comparado ao controle. Dentre os enteropatógenos testados a *L. monocytogenes* apresentou os maiores halos provocados pelos isolados, Wang et al. (2020) em seus estudos verificou o potencial antimicrobianos frente à *Listeria monocytogenes* com halos entre 20 – 23 mm, valores que coincidem com o desenvolvido neste trabalho.

Segundo O'Toole et al. (2008) bactérias probióticas competem contra outras bactérias através da produção de ácidos graxos de cadeia curta, modulação do pH, produção de peróxido de hidrogênio e de toxinas específicas como bacteriocinas, bacteriófagos ou outras substâncias inibidoras, como por exemplo o ácido lático. Por outro lado, Indira et al. (2019) relata que as bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomicamente e produzidos por certas cepas bacterianas sendo os efeitos semelhantes aos dos antibióticos. De acordo com Chen e Hver

(2003), as bacteriocinas não apresentam atividade significativa contra microrganismos Gram-negativos devido a proteção da camada LPS característica deste grupo de bactérias.

Contudo, outros agentes antimicrobianos produzidos pelo isolado 86 podem ter inibido a *E.coli* em nosso estudo. Portanto, a inibição das bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) observada pode ser devida à presença de bacteriocinas ou outro agente inibidor produzidas pelo isolados 70, 72 e 76. De acordo com Souza et al. (2005) e Parada (2007) as bacteriocinas são normalmente eficazes contra bactérias Gram-positivas pertencentes a diferentes gêneros, como exemplo podemos citar a nisina, enterocinas e a lacticinas que já demonstraram atividade inibitória sobre a *Listeria monocytogenes*. A substância plantaricina TF711, substancia semelhante a bacteriocina, a enterocinas AS-48, nisina e a reutina foram eficientes contra o *S.aureus*.

No levantamento bibliográfico realizado durante todo o experimento observamos que a procura de novas cepas com potencial probiótico vem aumentando no decorrer dos anos. No caso específico dos produtos probióticos, parece ser desejável que essas bactérias além de apresentarem a característica de proteção ao produto, apresentem a capacidade de adaptação e desenvolvimento no trato intestinal. Assim, a vantagem conferida pela competição por substratos por bactérias benéficas deve ser melhor explorada para esta finalidade.

6. CONCLUSÃO

Dentre os 210 isolados obtidos, todos apresentaram as mesmas características morfológicas. Na etapa de seleção, o teste de resistência a diferentes valores de pH demonstrou que apenas 04 isolados ficaram viáveis. Todos estes 4 isolados foram resistentes aos antibióticos Eritromicina, Kanamicina, Clindamicina e Vancomicina e somente 3 isolados ficaram viáveis na concentração de 0,3% de sais biliares e apresentaram alguma inibição frente as bactérias patogênicas. Os 3 isolados 70, 72 e 86 são os microrganismos que apresentaram um possível potencial probiótico, no entanto ainda são necessários mais estudos para a comprovação da identidade dos isolados por identificação molecular para confirmar se estas linhagens pertencem ou não ao grupo de bactérias do ácido lático.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, S. C. M. **Estudo do potencial biotecnológico da polpa de tucumã (*astrocaryum aculeatum*) in natura e da conservação das suas propriedades nutricionais em embalagens a vácuo.** Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Universidade do Estado do Amazonas. Manaus – AM, 2016.
- BALIZA, D. D. M. S.; SILVA, J.F.M; PIMENTA, R.S.. **Evaluation of the applicability of a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae* in cereal bars.** Braz. J. Food Technol. v.21, e2017148, 2018, <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.14817>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 241, de 26 de julho de 2018. **Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.** Brasília: Anvisa, 2018.
- CAMERON, D. et al. **Probiotics for gastrointestinal disorders: Proposed recommendations for children of the Asia-Pacific region.** World Journal Gastroenterology, v. 23, n. 45, p. 7952–7964, 2017.
- CHEN, L. S.; MA, Y.; MAUBOIS, J. L.; CHEN, L. J.; LIU, Q. H.; GUO, J. P. **Identification of raw milk yeasts and selection for some antioxidant properties specific.** International Journal of Dairy Technology, v. 63, n. 1, p. 47-54, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00548.x>
- CHEW, S. Y. et al. **Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates.** Journal of Applied Microbiology, v. 118, n. 5, p. 1180–1190, 2015.
- CORDAIN, L. et al. **Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century.** Am. J. Clin. Nutr. 81, 341–354 (2005).
- COUTINHO, F. D. P.; UCHOA, I. B.; PASSOS, J. P. **Frutos amazônicos como fonte de aplicações biotecnológicas.** Coletânea Frutos Amazônicos: Biotecnologia e sustentabilidade. EDUFT. Palmas - TO, 2020.
- DO CARMO, M. S. et al. **Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children.** Food & Function, v. 9, n. 10, p. 5074–5095, 2018.
- DOUILLARD, F. P. & de Vos, W. M. **Biotechnology of health-promoting bacteria.** Biotechnol. Adv. 37, 107369 (2019).
- ERDOGAN, F. S. et al. **The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice.** Food Research International, v. 115, p. 408–413, jan. 2019.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food and fruit-bearing forest species**. Rome, 1987.

FLOR, N. S.; ANDRADE, J. S.; FERREIRA, S. A. N. **Nutritional value and sensorial attributes of tucum paste**. British Journal of Applied Science & Technology, v. 5, p. 371-379, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation** FAO FOOD AND NUTRITION PAPER. Food and Nutrition Paper, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria**. Cordoba, Argentina: 2001.

GORDON, S. Elie Metchnikoff: **Father of natural immunity**. European Journal of Immunology, v. 38, n. 12, p. 3257–3264, 2008.

ISLAM, S. U. **Clinical Uses of Probiotics**. Medicine, v. 95, n. 5, p. 1–5, 2016.

KABEERDOSS, J.; DEVI, R. S.; MARY, R. R.; PRABHAVATHI, D.; VIDYA, R.; MECHENRO, J.; MAHENDRI, N. V.; PUGAZHENDHI, S.; RAMAKRISHNA, B. S. **Effect of yoghurt containing Bifidobacterium lactis Bb12 on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta- defensin 2 in healthy adult volunteers**. Nutrition Journal, v. 10, p. 138, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-10-138>. PMID: 22196482.

KECHAGIA, M. et al. **Health Benefits of Probiotics: A Review**. ISRN Nutrition, v. 2013, p. 1–7, 2013.

LAU, H. H.; MURNEY, R.; YAKOVLEV, N. L.; NOVOSELOVA, M. V.; LIM, S. H.; ROY, N.; SINGH, H.; SUKHORUKOV, G. B.; HAIGH, B.; KIRYUKHIN, M. V. **Protein-tannic acid multilayer films: a multifunctional material for microencapsulation of food-derived bioactives**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 505, p. 332-340, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2017.06.001>. PMid:28601742.

MAMBUSCAY, M. L. A; LÓPEZ, A. W. A; CUERVO, M. R. A; ARGOTE, V. F. E; CADAVID, E. O. **Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva**. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Ed. Especial. n. 2, p. 136-144,. 2013.

MARCO, M. L. et al. **Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond**. Curr. Opin. Biotechnol. 44, 94–102 (2017)

- OLIVEIRA, S. F; MOURA, J. P; SILVA, K. E. R. **Uma revisão sobre a morfoanatomia e as propriedades farmacológicas das espécies *Astrocaryum aculeatum* Meyer e *Astrocaryum vulgare* Mart.** Scientia Amazonia, v.7, n.3, CS18-CS28, 2018.
- PASOLLI, E., DE FILIPPIS, F., MAURIELLO, IE, CUMBO, F., WALSH, AM, LEECH, J.,... Ercolini, D. (2020). **A análise em larga escala do genoma liga as bactérias do ácido láctico dos alimentos ao microbioma intestinal.** *Nature Communications*, 11 (1). doi: 10.1038 / s41467-020-16438-8
- RAGHUWANSHI, S. et al. **Probiotics: Nutritional Therapeutic Tool.** *Journal of Probiotics & Health*, v. 06, n. 01, p. 1–8, 2018.
- RINGØ, E. et al. **Lactic acid bacteria in finfish-An update.** *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. AUG, p. 1–37, 2018.
- SÁNCHEZ, B. et al. **Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease.** *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 61, n. 1, p. 1–15, 2017.
- SANTOS, M.; MAMEDE, R.; RUFINO, M.; BRITO, E.; ALVES, R. **Amazonian native palm fruits as sources of antioxidant bioactive compounds.** *Antioxidants*, v. 4, n. 3, p. 591-602, 7 set. 2015.
- SHOKRYAZDAN, P. et al. **Probiotics: From Isolation to Application.** *Journal of the American College of Nutrition*, v. 36, n. 8, p. 666–676, 2017.
- SILVA, C. M. S.; MORAIS, R. A; SANTOS, A. L; MARTINS, G. A. S. **Quantificação de compostos fenólicos totais em frutos não convencionais cultivados no cerrado.** *Revista Desafios – Suplemento*, 2020.
- SILVA, M. B. **Caracterização físico-química e secagem de frutos de tucumã (*astrocaryum aculeatum meyer*): avaliação da preservação de suas propriedades funcionais.** o Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes – RJ, 2016.
- SILVA, R. S.; SANTOS, C. L.; MAR, J. M.; KLUCZKOVSKI, A. M.; FIGUEIREDO, J. A.; BORGES, S. V. B.; BAKRY, A. M.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H. **Physicochemical properties of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) powders with different carbohydrate biopolymers.** *LWT - Food Science and Technology*. v.94, p.79-86, 2018.
- STEFANOVIC, E., FITZGERALD, G. & MCAULIFFE, O. **Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: a review.** *Food Microbiol.* 61, 33–49 (2017).
- SUEZ, J. et al. **The pros, cons, and many unknowns of probiotics.** *Nature Medicine*, v. 25, n. 5, p. 716–729, 2019.

- VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. **Probiotics: an update**. *Jornal de Pediatria*, v. 91, n. 1, p. 6- 21, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2014.08.005>. PMID:25458874.
- WANG, C.; CUI, Y.; QU, X. **Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria**. *Archives of Microbiology*, v. 200, n. 2, p. 195–201, 2017.
- WANG, C.; GARCÍA-FERNANDEZ, D.; MAS, A.; ESTEVE-ZARZOSO, B. **Fungal diversity in grape wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE**. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, v. 1156. 20.
- WANG, L. Q. et al. **Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 11, p. 1999–2007, 2010.
- WANG, S. Y. et al. **Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain**. *Food Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 274–285, 2012.
- WANG, Y. et al. **L. pseudomesenteroides and L. johnsonii isolated from yaks in Tibet modulate gut microbiota in mice to ameliorate enteroinvasive Escherichia coli-induced diarrhea**. *Microbial Pathogenesis*, v. 132, p. 1–9, 2019.
- WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. *World Gastroenterology Organization World Guidelines - Probiotics and Prebiotics*, 2017.
- WU, C., HUANG, J. & ZHOU, R. **Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications**. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 393–404 (2017).
- ZIMMER, F. M. D. A. L.; FERRAZ, F. D. S.; AULER, C. A. D. S.; **Diversidade dos frutos amazônicos e seu uso sustentável**. *Coletânea Frutos Amazônicos: Biotecnologia e sustentabilidade*. EDUFT. Palmas - TO, 2020.
- ZOTTA, T., PARENTE, E., & RICCIARDI, A. (2017). **Metabolismo aeróbio no gênero Lactobacillus: impacto na resposta ao estresse e potenciais aplicações na indústria de alimentos**. *Journal of Applied Microbiology*, 122 (4), 857–869. doi: 10.1111 / jam.13399