

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE
MARACUJÁ-DO-MATO (PASSIFLORA CINCINNATA MAST.)**

**PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM WILD
PASSION FRUIT (PASSIFLORA CINCINNATA MAST.)**

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS DE ÁCIDO LÁCTICO AISLADAS DE
MARACUYÁ SILVESTRE (PASSIFLORA CINCINNATA MAST.)**

 10.56238/revgeov16n4-088

Bruna Peregrino de Souza

Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais
Instituição: Universidade Federal do Oeste da Bahia
E-mail: bruna.souza@ufob.edu.br
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2555-8487>
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5798836997123186>

Beatriz Paiva dos Santos

Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Oeste da Bahia
E-mail: beatriz.santos@ufob.edu.br
Orcid: <https://orcid.org/0009-0001-4570-6846>
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7785834843887725>

Ingrid Carvalho do Nascimento

Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Oeste da Bahia
E-mail: ingrid.n8777@ufob.edu.br
Orcid: <https://orcid.org/0009-0006-6468-7309>
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5514201176556749>

Taides Tavares dos Santos

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Norte do Tocantins
E-mail: taides.santos@ufnt.edu.br
Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5107-7970>
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0619959327505427>

Fabricio Luiz Tulini

Doutor em Ciências
Instituição: Universidade Federal do Oeste da Bahia
E-mail: fabricio.tulini@ufob.edu.br
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0242-2835>
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1376824797910581>



Aurizangela Oliveira de Sousa

Doutora em Genética e Biologia Molecular

Instituição: Universidade Federal do Oeste da Bahia

E-mail: aurizangela.sousa@ufob.edu.br

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9669-7890>Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9568436688304062>

RESUMO

A pesquisa visa encontrar alternativas às fontes tradicionais de probióticos, como os produtos lácteos, além de preencher a lacuna de informações sobre a microbiota de frutos nativos do Cerrado, especialmente na Bahia. O objetivo central do estudo foi isolar, caracterizar e identificar as cepas de BALs presentes do maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast), avaliando sua viabilidade como probióticos na indústria de alimentos e sua conformidade com critérios de segurança estabelecidos pela Anvisa. Para tanto, foram coletadas amostras de flores e folhas para identificação da espécie, e frutos submetidos à fermentação espontânea. Os isolados foram caracterizados por testes de catalase, coloração de Gram, coagulase, gelatinase, DNase, resistência ao baixo pH e identificado através do sequenciamento do gene 16S ribossomal. Adicionalmente, foram realizados ensaios de suscetibilidade a antibióticos e de atividade antimicrobiana. No total, 590 isolados foram obtidos, dos quais 6 se mostraram Gram-positivos e catalase negativos. Destes, 3 apresentaram resultados negativos para coagulase, gelatinase e DNase. Entre eles, uma cepa demonstrou resistência significativa à acidez gástrica, sensibilidade a três antibióticos e inibição expressiva contra quatro patógenos distintos. A análise molecular identificou o gênero *Enterococcus*, com similaridade à espécie *E. faecium*. Os resultados indicam que a cepa isolada de maracujá-do-mato possui potencial probiótico promissor, ressaltando a importância de frutos nativos do Cerrado como fontes alternativas de BALs e evidenciando o potencial biotecnológico e sustentável desse bioma. Ensaio adicionais são necessários para confirmar seus benefícios à saúde.

Palavras-chave: Cerrado. Frutos Nativos. Fermentação Espontânea. Cepas Funcionais.**ABSTRACT**

The research aims to find alternatives to traditional sources of probiotics, such as dairy products, and to fill the information gap on the microbiota of native fruits of the Cerrado, especially in Bahia. The main objective of the study was to isolate, characterize, and identify the LAB strains present in the wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast), assessing their viability as probiotics in the food industry and their compliance with the safety criteria established by Anvisa (Brazilian Health Regulatory Agency). To this end, flower and leaf samples were collected for species identification, as well as samples from fruits subjected to spontaneous fermentation. The isolates were characterized by catalase, Gram staining, coagulase, gelatinase, DNase, and low pH resistance tests, and identified through 16S ribosomal gene sequencing. Additionally, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity tests were performed. A total of 590 isolates were obtained, of which 6 were Gram-positive and catalase-negative. Of these, three tested negative for coagulase, gelatinase, and DNase. Among them, one strain demonstrated significant resistance to gastric acidity, sensitivity to three antibiotics, and significant inhibition against four distinct pathogens. Molecular analysis identified the genus *Enterococcus*, with similarity to the species *E. faecium*. The results indicate that the isolated wild passion fruit strain has promising probiotic potential, highlighting the importance of native Cerrado



fruits as alternative sources of LAB and demonstrating the biotechnological and sustainable potential of this biome. Additional trials are needed to confirm its health benefits.

Keywords: Cerrado. Native Fruits. Spontaneous Fermentation. Functional Strains.

RESUMEN

La investigación busca alternativas a las fuentes tradicionales de probióticos, como los lácteos, y cubrir la falta de información sobre la microbiota de las frutas nativas del Cerrado, especialmente en Bahía. El objetivo principal del estudio fue aislar, caracterizar e identificar las cepas de bacterias lácticas bacterianas (BAL) presentes en la maracuyá silvestre (*Passiflora cincinnata* Mast), evaluando su viabilidad como probióticos en la industria alimentaria y su cumplimiento de los criterios de seguridad establecidos por la Anvisa (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria). Para ello, se recolectaron muestras de flores y hojas para la identificación de especies, así como muestras de frutas sometidas a fermentación espontánea. Los aislados se caracterizaron mediante pruebas de catalasa, tinción de Gram, coagulasa, gelatinasa, DNasa y resistencia a bajo pH, y se identificaron mediante secuenciación del gen ribosomal 16S. Además, se realizaron pruebas de susceptibilidad a antibióticos y actividad antimicrobiana. Se obtuvieron 590 aislados, de los cuales 6 fueron grampositivos y catalasa-negativos. De estas, tres dieron negativo en las pruebas de coagulasa, gelatinasa y DNasa. Entre ellas, una cepa demostró resistencia significativa a la acidez gástrica, sensibilidad a tres antibióticos e inhibición significativa contra cuatro patógenos distintos. El análisis molecular identificó el género *Enterococcus*, con similitud con la especie *E. faecium*. Los resultados indican que la cepa aislada de maracuyá silvestre tiene un potencial probiótico prometedor, lo que resalta la importancia de las frutas nativas del Cerrado como fuentes alternativas de BAL y demuestra el potencial biotecnológico y sostenible de este bioma. Se requieren ensayos adicionales para confirmar sus beneficios para la salud.

Palabras clave: Cerrado. Frutas Nativas. Fermentación Espontánea. Cepas Funcionales.



1 INTRODUÇÃO

Os probióticos desempenham um papel essencial na promoção da saúde humana, especialmente por sua capacidade de melhorar a microbiota intestinal. A manutenção desse microambiente saudável é fundamental para o equilíbrio fisiológico e a preservação da saúde do organismo (Raizel *et al.*, 2011).

São caracterizados como probióticos, microrganismos vivos não digeríveis, capazes de resistir às condições adversas do estômago e, ao aderir ao epitélio intestinal, coloniza o intestino, mesmo que de forma temporária (Oliveira *et al.*, 2002). A seleção de bactérias probióticas é baseada em critérios específicos estipulados pela Anvisa (2018; 2021), que incluem a ausência de patogenicidade, capacidade de produzir compostos antimicrobianos, ser metabolicamente ativas no intestino e capacidade de inibir bactérias patogênicas.

Nesse contexto, nota-se um avanço significativo no uso biotecnológico de Bactérias Ácido-Láticas (BALs) em diversos setores da indústria alimentícia (Kieliszek *et al.*, 2021). Este grupo exerce função probiótica e é amplamente reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA), possuindo o status de "*Generally Recognized As Safe*" (GRAS). De acordo com a Embrapa (2011), as BALs são classificadas como Gram-positivas, catalase negativas, possuindo metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo. As suas propriedades permitem o uso extensivo dessas bactérias na produção de alimentos, confirmando a promoção da saúde digestiva (Raizel *et al.*, 2011).

As BALs podem ser isoladas de fontes não convencionais, como alimentos fermentados de origem animal e vegetal. Esses microrganismos refletem a microbiota do ambiente de produção e, quando avaliados quanto às suas propriedades probióticas e de segurança, podem oferecer uma alternativa viável às bactérias intestinais. Para indivíduos com intolerância à lactose, alternativas aos probióticos derivados de alimentos fermentados não lácteos, incluindo os frutos, estão sendo investigadas como fontes potenciais (Sionek *et al.*, 2023). Portanto, a utilização de uma fonte de fermentação adequada é crucial para o eficiente isolamento desses microrganismos.

O maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) surge como um substrato adequado para o isolamento de BALs, pois além de apresentar características fermentescíveis como o pH da polpa que varia entre 2 e 3 (EMBRAPA, 2009), a espécie é altamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de hipertensão arterial, tratamento de colesterol e como ansiolíticos e sedativos (Pereira *et al.*, 2023). O consumo dos frutos *in natura* está fortemente relacionado à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (Aguillón-Osma *et al.*, 2019). Diversos potenciais já foram identificados no maracujá-do-mato, como digestivo, terapêutico, anti-inflamatório, antibacteriano (Reis *et al.*, 2018), confirmando características aliadas ao efeito probiótico.

Assim, este estudo investigou o potencial do maracujá-do-mato, como uma fonte de isolados de BALs, abrindo novas oportunidades para futuras aplicações industriais alimentícias. Para alcançar



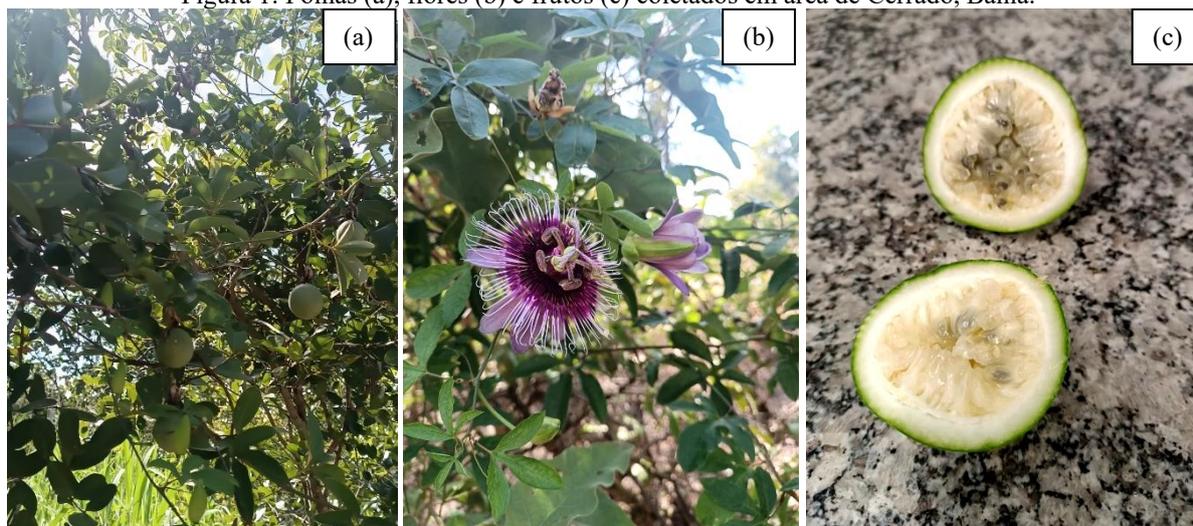
este objetivo, microrganismos foram isolados a partir dos frutos, identificados e caracterizados, sendo avaliados conforme os critérios da Anvisa, que compreendem testes específicos para validar sua identidade e segurança.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras coletadas foram folhas, flores e frutos de maracujá-do-mato (Figura 1), obtidas assepticamente em área de Cerrado, localizada entre as cidades de Barreiras e Luís Eduardo Magalhães, Bahia. O procedimento de coleta foi realizado seguindo os procedimentos do Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (INCT, 2013). As folhas e flores foram coletadas com o intuito de realizar a identificação da espécie frutífera, e os frutos foram direcionados para o isolamento de microrganismos. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos hermeticamente fechados em condições higiênicas e armazenados sob refrigeração para posterior análise.

Figura 1: Folhas (a), flores (b) e frutos (c) coletados em área de Cerrado, Bahia.



Fonte: Própria (2023).

2.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

Para a identificação da espécie, quatro etapas foram executadas, descritas pelo Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (INCT, 2013): produção de prensa, montagem de exsicata, acesso a chaves de identificação e registro das exsicatas. Para a prensa, folhas e flores foram direcionadas para o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA), *campus* Barreiras, e dispostas sob camadas de jornal e papelão. Após, pallets foram dispostos nas camadas superiores e inferiores e, então, a prensa foi encaminhada para secagem em estufa automática à 40°C por 2 dias. A prensa foi direcionada para o herbário da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) *campus* Barreiras (BRBA - UFOB) para a produção das exsicatas.



As amostras desidratadas foram costuradas em cartolina rígida e branca. Após, chaves de identificação foram buscadas através do Herbário virtual, <https://reflora.jbrj.gov.br/>. O gênero e a espécie encontrados foram escritos sob a cartolina contendo as amostras secas. O registro biológico da exsicata produzida foi realizado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

2.3 PREPARO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os frutos foram direcionados para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Oeste da Bahia (CMLEM/UFOB), *campus* Luís Eduardo Magalhães, e higienizados com 1L de água filtrada para 15mL de hipoclorito de sódio, seguindo procedimento proposto pela Resolução nº 216/2004 da ANVISA.

Dois procedimentos foram realizados separadamente, dividindo os frutos em grupos distintos: A e B. Para o grupo A, os frutos foram cortados em sua forma integral (polpa, casca e semente) e processados com auxílio de mixer e solução salina (50 mL de solução para 25g de fruto). As amostras, denominadas de fruto verde (FV) correspondendo ao tempo 0, foram filtradas para obtenção de caldo homogêneo com auxílio de peneira. Após, foram submetidas à diluição seriada, sendo: extrato bruto, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} .

O grupo B foi subdividido em dois: Amostras denominadas de fruto maduro (FM) foram preparadas após armazenamento integral dos frutos em sacos hermeticamente fechados em condições higiênicas durante 3 dias após a coleta (dac), sendo estas processadas, diluídas para obtenção de caldo homogêneo e diluição seriada, conforme citado anteriormente.

O outro grupo foi processado e armazenado à temperatura de 25°C em sacos hermeticamente fechados em condições higiênicas e submetidos à fermentação espontânea, em três tempos distintos, sendo as amostras denominadas de: Fermentado 1 (FT1) - 6 dac; Fermentado 2 (FT2) – 9dac; e Fermentado 3 (FT3) – 12 dac. Em cada tempo de fermentação, as amostras foram diluídas para obtenção de caldo homogêneo e diluição seriada, conforme mencionado.

2.4 TRIAGEM, ISOLAMENTO E CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Todas as amostras, após diluição seriada, foram inoculadas em placas de petri contendo meio específico, Man, Rogosa e Sharpe e ágar //(MRS-ágar), em quantidade de 100 µL e incubadas por 48h à 37°C em anaerobiose. Após verificar crescimento, foi realizado novo plaqueamento por semeadura por esgotamento em meio MRS-ágar. Foi utilizado um contador de colônias digital para a contagem das colônias crescidas em placas com número entre 1 a 290 colônias. O cálculo foi expresso em Unidade Formadora de Colônias (UFC) por grama (g) de fruto (UFC/g).



2.5 COMPROVAÇÃO DE IDENTIDADE DAS CEPAS - MORFOLOGIA

Os isolados foram primeiramente submetidos ao teste de catalase. Em seguida, ao teste de coloração de Gram, conforme a metodologia descrita por Trindade *et al.* (2022) e recomendações da Anvisa (2018) e Anvisa (2021). O teste de catalase possibilitou a distinção entre os microrganismos não produtores da enzima catalase daqueles catalase positivos. A coloração de Gram foi realizada para distinguir os microrganismos Gram-positivos e negativos, além de caracterizá-los quanto à forma.

Para o teste catalase, uma única colônia isolada foi selecionada e estriada em uma lâmina de vidro adicionada de uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Como resultado, devia-se observar a ausência de efervescência imediata do oxigênio, denotando uma resposta negativa ao teste de catalase. Para as colônias que apresentaram resultados negativos, foi realizado um repique em placa com MRS líquido para a obtenção de isolados puros.

A coloração de Gram foi realizada para os mesmos isolados envolvendo quatro etapas: (1) fixação da colônia com esfregaço em lâmina; (2) coloração com cristal violeta, de cor roxa; (3) fixação da cor pelo lugol/iodo; (4) descoloração por solvente (álcool); (5) contra-coloração, utilizando corante safranina, de cor vermelha e (6) visualização em microscópio óptico com óleo de imersão. Foram classificadas como bactérias Gram-positivas aquelas que retiveram o corante cristal violeta e bactérias Gram-negativas as que não retiveram o corante cristal violeta.

2.6 COMPROVAÇÃO DE IDENTIDADE DAS CEPAS – TESTES BIOQUÍMICOS

Todos os isolados foram reativados em meio MRS líquido em triplicata e, como amostra controle, foi utilizado o *Lactobacillus acidophilus* (L-05) adquirido no comércio local da cidade de Barreiras (BA). Para esta etapa, testes de identificação de enzimas patogênicas, como coagulase, gelatinase e DNase, além da resistência ao baixo pH, foram executados conforme procedimentos de Trindade *et al.* (2022).

2.6.1 Teste de coagulase

Inicialmente, 0,3 mL de cada isolado, com ajuste de suspensão bacteriana para $D.O_{655nm} = 0,5$ (correspondente a 6–7 log UFC/mL), foi adicionado em tubos de ensaio estéreis em contato com 0,3 mL de plasma de coelho (New Prov). A incubação foi realizada por 6h a 36°C (± 1 °C). Caso ocorresse coagulação do meio, o isolado caracteriza-se como coagulase positivo. Sem a coagulação, coagulase negativo. Os isolados coagulase negativos foram direcionados para o próximo teste.

2.6.2 Teste de gelatinase

Foram adicionados peptona de carne bacteriológica a 0,1% e extrato de carne contendo 12% de gelatina bovina à um tubo de ensaio estéril acrescido dos isolados bacterianos. A incubação foi



realizada a 37°C por 24h. Os tubos com crescimento das colônias foram submetidos à refrigeração por 30 minutos à 4°C. Caso ocorresse a liquefação do meio, os isolados eram caracterizados como gelatinase positiva. Se as amostras continuassem sólidas, preservando as propriedades de gelatina, eram consideradas gelatinase negativa. Os isolados gelatinase negativos foram direcionados para o próximo teste.

2.6.3 Teste de DNase

Em placas de petri contendo ágar teste DNase com azul de toluidina a 0,1%, foram inoculados por gota, 1 µL de cada isolado e incubados à 37°C durante 48h. Caso houvesse formação de halo rosado ao redor das colônias, considerou-se DNase positivo. Caso não houvesse, DNase negativo. Os isolados DNase negativos foram direcionados para o próximo teste.

2.6.4 Teste de resistência ao baixo pH

Inicialmente, ajustou-se a suspensão bacteriana para 6–7 log UFC/mL ($D.O_{655nm} = 0,5$). Após, uma solução de HCl 1 M com pH de 2,0 foi preparada para serem adicionadas às culturas. Cada isolado foi colocado em contato com o meio líquido ácido em dois tempos distintos: 0 e 3 horas.

No tempo de 0h, os isolados foram imediatamente semeados por esgotamento em MRS-ágar e incubados a 37°C entre 48-72h, correspondendo ao contato imediato com o meio ácido. No tempo de 3h, as alíquotas, em contato com o meio ácido, foram direcionadas para banho maria e, após 3 horas, foram semeadas por esgotamento em MRS-ágar e incubadas a 37°C entre 48-72h. Todas as placas obtidas após o crescimento das colônias foram submetidas à contagem em contador digital.

2.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS

A identificação molecular foi realizada em laboratório especializado, MicrobiomeX Biotecnologia e Soluções Bacterianas LTDA localizado em São Paulo. Para isso, os isolados em meio MRS líquidos foram centrifugados e descartado o sobrenadante para obtenção de pellets. Estes foram secos em estufa automática e, então, enviados.

A extração do DNA foi realizada com o Kit DNeasy PowerLyzer Microbial da Qiagen, e os fragmentos de DNA foram amplificados com o auxílio do kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Para o sequenciamento, a amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando o analisador genético Applied Biosystems 3500 e oito primers específicos que flanqueiam regiões internas do gene 16S rRNA: 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 357R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'), 704F (5'-GTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3'), 704R (5'-TCTACGSATTCACCSCTAC-3'), 1114R (5'-



GGGTYKCGCTCGTTGC-3'), 1110R (5'-GGGTTGCGCTCGTTGC-3') e 1494R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGAC-3') (Lane *et al.*, 1991).

Todos os procedimentos do sequenciamento foram realizados conforme determinação dos fabricantes. A qualidade das sequências e a montagem dos “contigs” foram avaliadas com os programas Phred e Phrap (Gordon; Abajian; Green, 1998), utilizando um Phred quality score com $Q > 20$. A anotação taxonômica foi realizada comparando as sequências com o banco de dados EZTaxon (Chun *et al.*, 2007).

2.8 COMPROVAÇÃO DE SEGURANÇA DAS CEPAS

Dois ensaios foram executados baseados nas recomendações da Anvisa (2018) e Anvisa (2021), utilizando como controle negativo o *Lactobacillus acidophilus*, L-05, ambos realizados em triplicata.

2.8.1 Inibição frente à antibióticos

A indicação de suscetibilidade à antibióticos foi conduzida utilizando o método de disco-difusão em ágar MRS, seguindo as diretrizes estabelecidas pelas Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2003). Os antibióticos foram selecionados de acordo com as recomendações do Guia de Antimicrobianos (2012), cloranfenicol (CLO) (30 µg), vancomicina (VAN) (30 µg), tetraciclina (TET) (30 µg), ciprofloxacina (CIP) (5 µg), gentamicina (GEN) (10 µg) e eritromicina (ERI) (15 µg).

Para início do teste, os isolados bacterianos com $D.O_{655nm} = 0,5$ (correspondente a 6–7 log UFC/mL) foram inoculados por espalhamento com alça de drigalski em placas contendo MRS-ágar. Os discos com cada antibiótico, previamente umedecidos com soro fisiológico estéril, foram colocados sobre as placas. Cada placa recebeu seis discos de diferentes antibióticos, posicionados a distâncias adequadas. As placas foram então incubadas a 37°C por um período de 48 horas.

Como resultado, houve o desenvolvimento dos halos de inibição, sendo estes classificados com o seu tamanho em milímetros (mm). Para verificação, os halos foram medidos com auxílio de um paquímetro utilizando as diretrizes do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2022), categorizados, portanto, como sensíveis (S), de suscetibilidade intermediária (I) ou resistentes (R) para cada antibiótico testado. É relevante mencionar que os resultados variam dependendo do grupo bacteriano.

A interpretação dos diâmetros de inibição pode ser encontrada na Tabela 1.



Tabela 1: Susceptibilidade de *Enterococcus spp.* e *Lactobacillus spp.* aos agentes antimicrobianos medida por diâmetros de halos de inibição (mm) através do método de difusão em disco sobre MRS-ágar. Fonte: CLSI (2022); Charteris *et al.* (1998).

Grupo	Antibiótico		<i>Enterococcus spp.</i>			<i>Lactobacillus spp.</i>		
	Nome	Concentração do disco (µg)	Interpretação do diâmetro de inibição (mm)			Interpretação do diâmetro de inibição (mm)		
			R	I	S	R	I	S
Fenicóis	CLO	30	≤ 12	13-17	≥ 18	≤ 13	14-17	≥ 18
Glicopeptídeos	VAN	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≤ 14	15-16	≥ 17
Tetraciclina	TET	30	≤ 14	15-18	≥ 19	≤ 14	15-18	≥ 19
Fluoroquinolonas e quinolonas	CIP	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≤ 13	14-18	≥ 19
Aminoglicosídeos	GEN	10	6	7-9	≥ 10	≤ 12	-	≥ 13
Macrolídeos	ERI	15	≤ 13	14-22	≥ 23	≤ 13	14-17	≥ 18

CLO – Cloranfenicol; VAN – Vancomicina; TET – Tetraciclina; CIP – Ciprofloxacina; GEN - Gentamicina; ERI – Eritromicina; µg – Micrograma; mm – Milímetro.

Fonte: Autores.

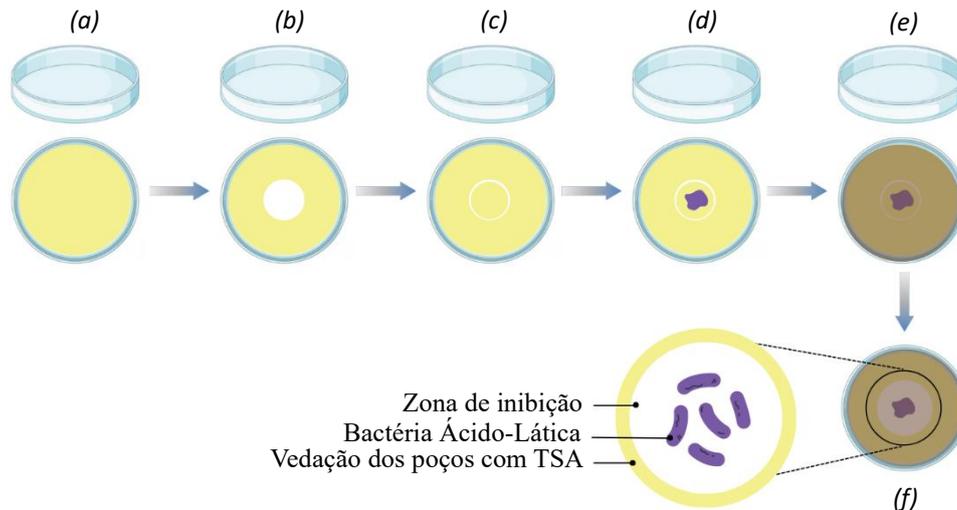
2.8.2 Inibição frente à patógenos

A indicação de resistência à patógenos foi conduzida utilizando uma técnica adaptada de "spot on the lawn assay with wells", descrita por Rao *et al.* (2016), conforme ilustrado na Figura 2. Inicialmente, o caldo MRS foi inoculado com os isolados de BALs e incubado a 37°C por 48 horas. Paralelamente, culturas de bactérias patogênicas foram cultivadas em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) nas mesmas condições. As bactérias patogênicas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (S. aureus) (NCTC 12493), *Listeria monocytogenes* (L. monocytogenes) (NCTC 136270), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (S. enteritidis) (NCTC 6676), *Klebsiella pneumoniae* (K. pneumoniae) (NCTC 13368), *Escherichia coli* (E. coli) (NCTC 11954) e *Enterococcus faecalis* (E. faecalis) (NCTC 12967).

A seguir, foram preparadas placas de ágar BHI (a), e após, foi realizada uma única perfuração na placa para preparo do poço, sendo esta de 5 mL (b). O poço foi selado com 150 µL de ágar Tryptic Soy Agar (TSA) (c), e adicionado sobre ele, 60 µL das culturas de BALs (d). As placas foram incubadas a 37°C por 3 horas. Posteriormente, os poços foram cobertos com um meio BHI semissólido, semeado com 200 µL das culturas dos patógenos (e). Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Como resultado, foi observado o crescimento de halos (f). A interpretação do diâmetro de inibição (mm) está apresentada na Tabela 2, segundo Aslim *et al.* (2005).



Figura 2: Método realizado para indicação da inibição de isolados bacterianos frente à patógenos.



Fonte: Própria (2024).

Tabela 2: Patogenicidade de isolados bacterianos, medida por diâmetros de halos de inibição (mm) através do método adaptado de "spot on the lawn assay with wells".

Interpretação do diâmetro de inibição (mm)			
(-) Neutro	(+) Fraco	(++) Intermediário	(+++) Forte
Não houve inibição	8-10	10-20	20-30

mm – Milímetro.

Fonte: Aslim *et al.* (2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

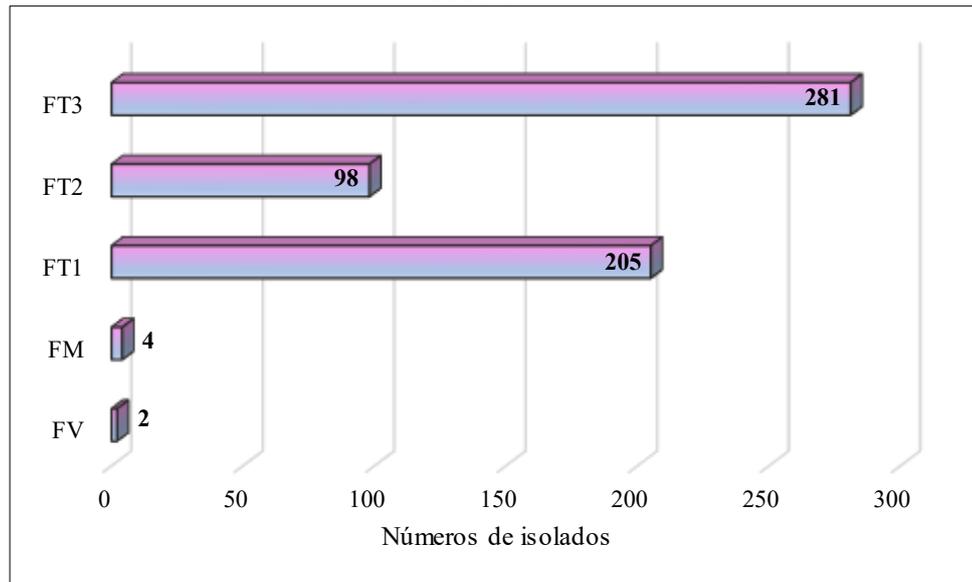
As amostras de folhas e flores foram identificadas como: Família: Passifloraceae; Gênero: Passiflora e Espécie: *Passiflora cincinnata* Mast. A identificação foi incluída no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

3.2 TRIAGEM, ISOLAMENTO E CONTAGEM DAS COLÔNIAS

As placas apresentaram cobertura bacteriana nas diluições de extrato total, 10^{-1} , 10^{-2} , não sendo possíveis de serem contadas. A diluição de 10^{-6} não apresentou crescimento de colônias. Assim, o Gráfico 1 apresenta o resultado de isolados contados, considerando a relação entre tempo x fermentação espontânea na diluição de 10^{-4} . Ao total, foram obtidos um número de 590 isolados, correspondendo à 236.000 UFC/g de fruto ou $(2,36 \times 10^5 \text{ UFC/g})$.



Gráfico 1 - Número de colônias isoladas a partir de amostras de maracujá-do-mato preparadas e processadas na diluição de 10^{-4} .



FV - fruto verde recém coletado; FM - fruto maduro 3dac; FT1 - fruto fermentado 6dac; FT2 - fruto fermentado 9dac; FT3 - fruto fermentado 12 dac.

Fonte: Própria (2023).

A população microbiana em frutas e vegetais varia em aproximadamente 10^5 a 10^7 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), com BALs compondo cerca de 10^2 a 10^4 UFC/g desses microrganismos (Medeiros *et al.*, 2024). No presente estudo, o valor encontrado mostrou-se condizente com a faixa reportada na literatura, situando-se acima do limite indicado para BALs. Isso destaca a significativa presença de BALs na microflora de frutas e vegetais, o que é consistente com o papel ecológico desses microrganismos em ambientes vegetais (Wicaksono *et al.*, 2023). Cascas e sementes de frutos, como laranja e maracujá em meio específico para crescimento, como MRS-ágar ou caldo, também indicaram crescimento de uma diversidade de bactérias (Vieira *et al.*, 2017).

Observou-se neste estudo, maior crescimento de colônias nas amostras fermentadas espontaneamente, bem como variações entre os tempos de fermentações FT1, FT2 e FT3. Considerando o primeiro dado, a fermentação espontânea surge de competições entre diversos microrganismos autóctones, naturalmente encontrados em determinados ambientes, no qual, aqueles que se adaptam de maneira mais eficaz tornam-se predominantes nesse tipo de processo (Aguiar, 2010). As BALs demonstram boa capacidade de adaptação às propriedades naturais dos alimentos frescos (Rodriguez *et al.*, 2009), sendo identificadas em diferentes frutos, como açaí (Sato *et al.*, 2021), cereja, pitaya de polpa branca (Xu *et al.*, 2018) e bacupari (Brito, 2021) por meio da fermentação espontânea.

Acerca do segundo dado, a composição da microbiota de frutos pode variar significativamente dependendo de fatores como a espécie da planta hospedeira, o ambiente de crescimento, a sazonalidade, além de fatores como umidade, temperatura, diversidade microbiana no solo e práticas de manejo (Anastácio *et al.*, 2020). O estado fisiológico das células é influenciado pelo ambiente em



que crescem e pela exposição às condições de estresse, o que afeta significativamente o número de células viáveis ao decorrer do tempo (Pla *et al.*, 2015). Sendo assim as variações entre os tempos de fermentações encontradas neste estudo podem ser um reflexo de combinações entre a microbiota inicial dos frutos, as condições ambientais e os estados fisiológicos dos microrganismos durante o processo.

3.3 COMPROVAÇÃO DE IDENTIDADE DAS CEPAS – MORFOLOGIA

Dos 590 isolados previamente encontrados, 6 obtiveram característica morfológica desejável provenientes das fermentações FT1 e FT2, com característica catalase negativos, Gram-positivos e formato de cocos. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização morfológica dos isolados provenientes de maracujá-do-mato quanto aos testes de catalase e coloração de Gram.

	FV	FM	FT1	FT2	FT3	Número total de isolados
Catalase negativo e Gram-positivos	0	0	4	2	0	6
Catalase positivo e Gram-negativos	2	4	201	96	281	584

FV - fruto verde recém coletado; FM - fruto maduro 3 dac; FT1 - fruto fermentado 6 dac; FT2 - fruto fermentado 9 dac; FT3 - fruto fermentado 12 dac.

Fonte: Própria (2023).

A detecção de enzimas, como a catalase, e a identificação de Gram-positivos são características típicas de BALs (EMBRAPA, 2011). A técnica de Gram é amplamente utilizada na área da microbiologia para a observação de diferentes espécies bacterianas indicadas por sua parede celular, permitindo a identificação da forma, cor e textura de colônias (Gouveia, 2012). Já o teste de catalase é utilizado para identificar a presença da enzima catalase em bactérias. A catalase é responsável por decompor o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigênio (O₂). Este teste é frequentemente utilizado para diferenciar gêneros de bactérias, como distinguir estafilococos (catalase-positivos) de estreptococos (catalase-negativos) (Silva, 2008).

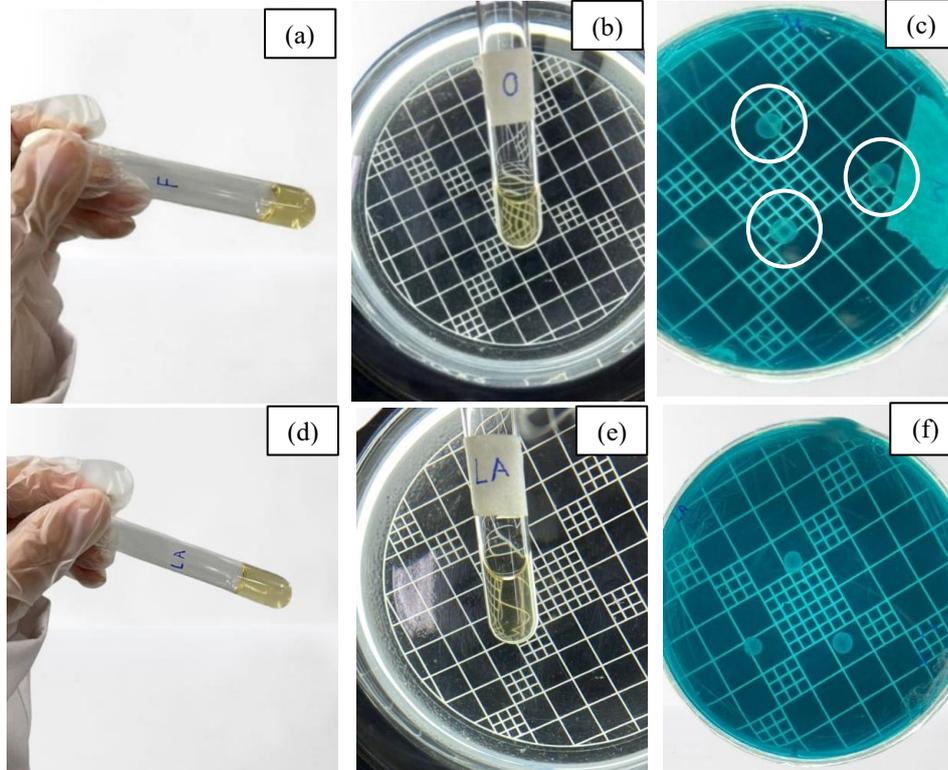
Cepas com características catalase negativo e Gram-positivas também foram encontradas em bananas (Yang; Tan; Cai, 2016), e em frutos do Cerrado, como o Bacupari do Cerrado, Gabiroba, Guapeva, Mangaba, Pequi e Puçá Amarelo (Trindade *et al.*, 2022). Esses achados são consistentes com as propriedades morfológicas de diversas BALs, como *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, e *Enterococcus spp.* (EMBRAPA, 2011).



3.4 COMPROVAÇÃO DE IDENTIDADE DAS CEPAS – TESTES BIOQUÍMICOS

Após 6 isolados serem selecionados nos testes de catalase e coloração de Gram, 3 demonstraram resultados negativos para os testes de gelatinase, coagulase e DNase, apresentando similaridade com a amostra controle (Figura 3).

Figura 3: Resultados negativos dos testes de gelatinase (a), coagulase (b) e DNase (c) para os isolados provenientes de maracujá-do-mato e gelatinase (d), coagulase (e) e DNase (f) para a amostra controle (*Lactobacillus acidophilus*).



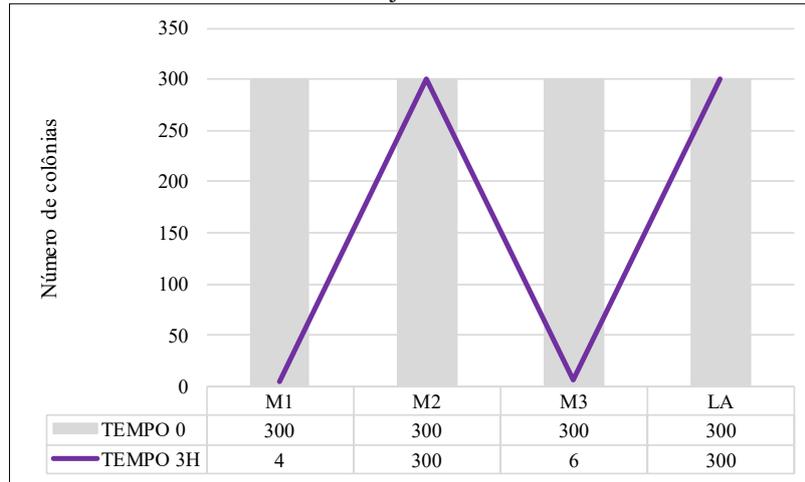
Fonte: Própria (2023).

A avaliação do perfil de patogenicidade das BALs requer análise de atividades enzimáticas, como coagulase, gelatinase e DNase (ANVISA, 2021). As BALs isoladas de frutos do mandacaru do gênero *Pediococcus* apresentaram um perfil enzimático característico das BALs (Medeiros *et al.*, 2024), o que sugere a ausência das atividades associadas aos fatores de virulência. De forma similar aos resultados obtidos, o açaí amazônico também indicou ausência de coagulase, gelatinase e DNase entre cepas de *Lactiplantibacillus* e *Pediococcus* (Sato *et al.*, 2020).

Após, das 3 estirpes previamente selecionadas, 1 apresentou resistência ao pH de 2,0 (M2), com crescimento em placa superior a 300 colônias, tanto no tempo 0, quanto no tempo de 3h, apresentando similaridade com a amostra controle. As estirpes M1 e M3 obtiveram sensibilidade ao baixo pH, exibindo um número de colônias de 4 e 6, respectivamente, crescidas no tempo de 3h. Os resultados podem ser observados no Gráfico 2.



Gráfico 2 – Resultados para o teste de resistência em pH de 2,0, nos tempos 0h e 3h de colônias provenientes de maracujá-do-mato.



M – Isolados selecionados de amostras de maracujá-do-mato; LA - *Lactobacillus Acidophilus* (amostra controle).
 Fonte: Própria (2023).

A capacidade de resistir a condições de baixo pH é um dos critérios essenciais na caracterização de microrganismos com potencial probiótico, uma vez que a sobrevivência no trato gastrointestinal exige tolerância à acidez do estômago, cujo pH varia entre 2,5 e 3,5, podendo atingir 1,5 em jejum e elevar-se até 4,5 após a alimentação (Trindade *et al.*, 2022).

Semelhante aos resultados encontrados, cepas bacterianas de grãos de cacau dominicanos fermentados mostraram-se resistentes ao pH entre 3,0 a 6,5, demonstrando uma boa capacidade de sobreviver e crescer em baixo pH (Korcari *et al.*, 2022). Três cepas de *Bacillus cereus* também mostraram-se persistentes no trato gastrointestinal por um período de até 18 dias após a administração, evidenciando a capacidade desses organismos de colonizar o ambiente intestinal, e sugerindo potenciais benefícios probióticos (Duc *et al.*, 2004).

3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS

O isolado M2 foi identificado com similaridade à espécie *Enterococcus faecium* (*E. faecium*). Os dados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Identificação taxonômica de isolados provenientes de maracujá-do-mato.

Nome	Taxonomia	Cepa de destaque	Similaridade (%)	Comprimento (pb)	Completo (%)
M2	<i>Enterococcus faecium</i>	LMG 11423	99.86	1.523 pb	100.0

M2 – Isolado selecionado de amostra de maracujá-do-mato.

Fonte: Própria (2024).

Esses microrganismos, gram-positivos, catalase-negativos, caracterizado pela produção de ácido láctico como principal produto da fermentação (metabolismo homofermentativo), constituem uma fração relevante das BALs, incluindo alguns dos gêneros mais reconhecidos, como *Lactobacillus*,



Lactococcus, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (EMBRAPA, 2009).

Enterococcus podem ser considerados patógenos oportunistas e ocupam o segundo lugar como causa mais frequente de infecções adquiridas em ambientes hospitalares, afetando especialmente o trato urinário, feridas e tecidos. Por esse motivo, há uma ampla discussão sobre a patogenicidade desse gênero (Araújo *et al.*, 2021) e a sua utilização em aplicações alimentares (Giraffa, 2003). Por isso, a segurança dessas bactérias deve ser garantida (Franz *et al.*, 2011).

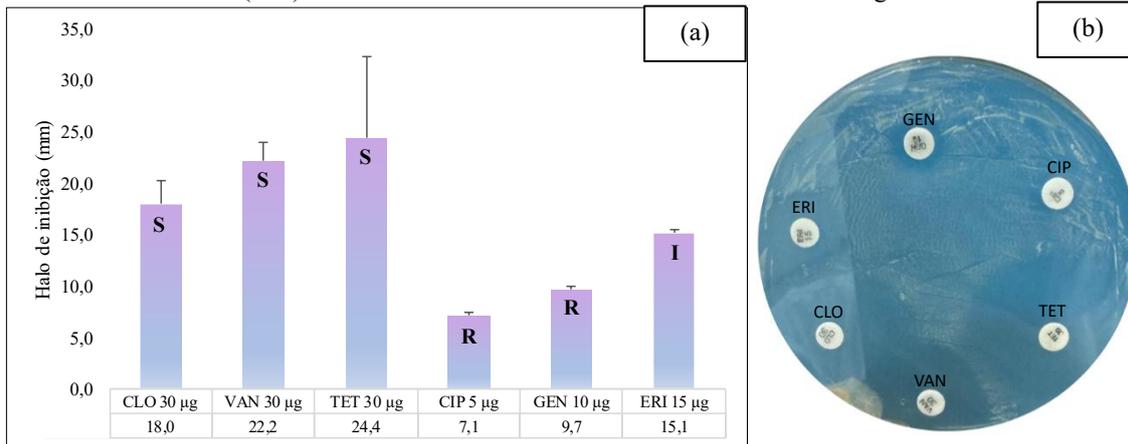
Os fatores de virulência devem ser elementos ausentes dos *Enterococcus* adicionados à alimentos. O tema da segurança alimentar é abordado em relação aos efeitos positivos das cepas em preparações farmacêuticas, para tratar diarreia, síndrome do intestino irritável, reduzir colesterol e melhorar a imunidade. Em animais, esses probióticos auxiliam na prevenção de diarreia, estimulam a imunidade e promovem o crescimento. Além disso, demonstram elevado potencial devido à sua participação na degradação e fermentação de alimentos (Franz *et al.*, 2011). Foram encontrados *Enterococcus faecium* isolados de carnes de ovelhas, cabras, bovinos e bezerros (Shahveh *et al.*, 2023) e queijos artesanais (Nieto-Arribas *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2017), sendo os queijos os alimentos mais frequentemente associados a essa espécie (EMBRAPA, 2009). Essa é, até onde conhecemos, a primeira descrição desse isolado em frutos, sendo, portanto, um relevante achado para a pesquisa em biotecnologia de alimentos e áreas relacionadas.

3.6 COMPROVAÇÃO DE SEGURANÇA DAS CEPAS

Como referência, utilizou-se *Enterococcus spp.* para a interpretação dos resultados de *E. faecium* (CLSI, 2022) e *Lactobacillus spp.* foi utilizado como padrão (Charteris *et al.* (1998). A estipe M2 foi verificada quanto ao teste de inibição frente aos antibióticos variados. Os resultados podem ser verificados no Gráfico 3 e Figuras 4. Já os resultados referentes à amostra controle são apresentados no Gráfico 4 e Figura 5, demonstrando 100% de similaridade com M2. Ambas exibiram sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol, vancomicina e tetraciclina, resistência à ciproflaxicina e gentamicina e resistência intermediária à eritromicina.

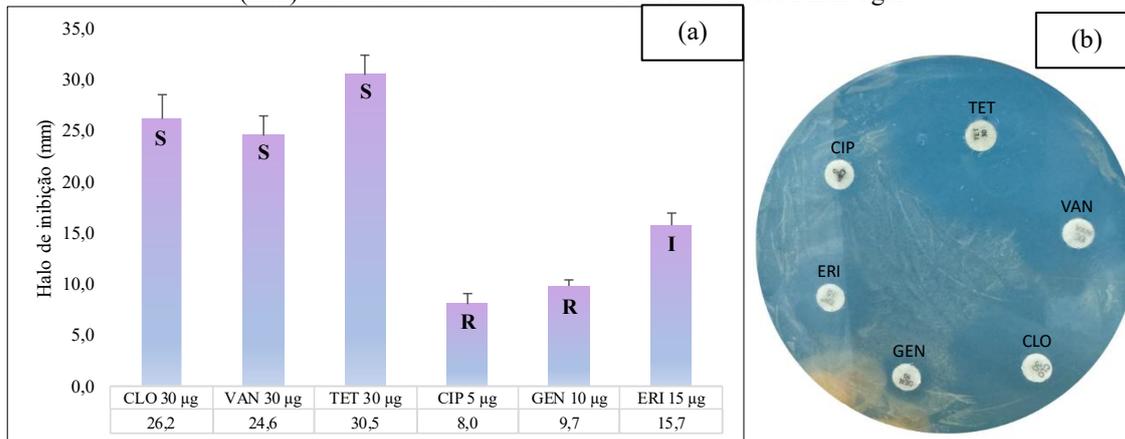


Gráfico 3 e Figura 4: Susceptibilidade de M2 aos agentes antimicrobianos medida por diâmetros de halos de inibição (mm) através do método de difusão em disco sobre MRS-ágar.



S – suscetível; I – suscetibilidade intermediária; R – resistente. CLO – Cloranfenicol; VAN – Vancomicina; TET – Tetraciclina; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; ERI – Eritromicina.
Fonte: Própria (2024).

Gráfico 4 e Figura 5: Susceptibilidade de LA aos agentes antimicrobianos medida por diâmetros de halos de inibição (mm) através do método de difusão em disco sobre MRS-ágar.



S – suscetível; I – suscetibilidade intermediária; R – resistente. CLO – Cloranfenicol; VAN – Vancomicina; TET – Tetraciclina; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; ERI – Eritromicina.
Fonte: Própria (2024).

Segundo a Anvisa (2021), é necessário garantir que os microrganismos não possuam genes de resistência a antibióticos que possam ser transferidos entre bactérias, o que facilitaria a propagação de características como resistência e virulência, além de não apresentarem fatores que possam prejudicar a saúde do consumidor. De acordo com a RDC nº 241/2018, as bactérias probióticas devem ser suscetíveis a pelo menos dois antibióticos (ANVISA, 2018, p. 4). Os resultados obtidos mostraram sensibilidade a três antibióticos, atendendo assim a exigência proposta.

Enterococcus faecium isolados de queijo demonstraram sensibilidade ao cloranfenicol, vancomicina e tetraciclina (Amaral *et al.*, 2017) e isolados de hortaliças demonstraram resistência à ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina (Ben *et al.*, 2016), semelhante aos resultados encontrados para os isolados provenientes de maracujá-do-mato do presente estudo. Os dados corroboram que, assim como existem cepas bacterianas resistentes a determinados antibióticos (Franz *et al.*, 2011),

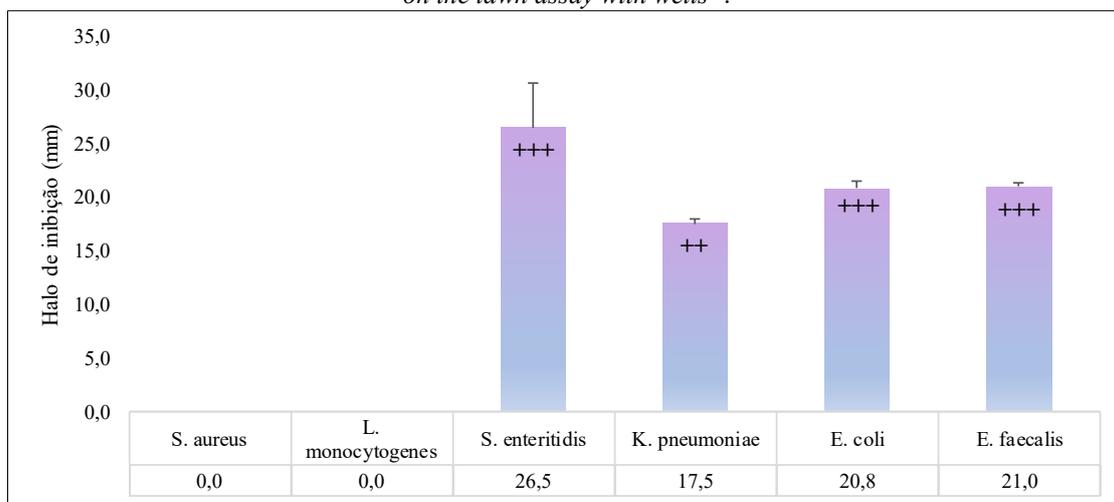


outras cepas apresentam sensibilidade, o que valida sua aplicação em produtos alimentares e assegura a segurança alimentar (FAO/WHO, 2002).

A resistência frente à ciprofloxacina, eritromicina e gentamicina pode estar associada à manifestação de forma intrínseca, quando as bactérias já possuem, em sua estrutura, características que as tornam resistentes, ou adquirida, quando um microrganismo recebe informações de outra célula, seja da mesma espécie ou de uma diferente, que podem levar a essa resistência. Essa informação pode ser, por exemplo, um fragmento de material genético (Abrantes e Nogueira, 2021).

Os resultados do teste de inibição frente à patógenos estão representados no Gráfico 5.

Gráfico 5: Patogenicidade de M2, medida por diâmetros de halos de inibição (mm) através do método adaptado de "spot on the lawn assay with wells".



-: não houve inibição ++: inibição intermediária; +++: forte inibição.

Fonte: Própria (2024).

Percebe-se a capacidade de forte inibição dos patógenos *S. enteritidis*, *E. coli* e *E. faecalis* e inibição intermediária para *K. pneumoniae*. A estirpe não demonstrou capacidade de inibição frente à *S. aureus* e *L. monocytogenes*. A amostra controle demonstrou inibição intermediária para os patógenos testados.

Os resultados encontrados para maracujá-do-mato, demonstraram a capacidade significativa da *E. faecium* para a inibição de patógenos intestinais. Paralelamente, *Enterococcus faecium* isolados de alimentos demonstraram efeito inibitório para *E. coli* (Tendenedzai *et al.*, 2022), *E. faecalis* (Reuben *et al.*, 2019), *S. enteritidis* (Huang *et al.*, 2022) e *K. pneumoniae* (Veetil & Chitra, 2022). Isso enfatiza o impacto inibitório de patógenos devido a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que são substâncias típicas do metabolismo de BALs, destacando a relevância e o valor do uso dessas bactérias, tanto em alimentos, quanto como parte da microbiota humana e animal (Costa *et al.*, 2012).

E. coli e *E. faecalis* são conhecidas por sua capacidade de causar diarreia e infecções intestinais graves, e a inibição de seu crescimento pode reduzir significativamente o risco de infecções



gastrointestinais (Palmela *et al.*, 2018; Barnes *et al.*, 2017). Da mesma forma, *S. enteritidis* é uma causa frequente de gastroenterite (Ricke, 2003). A *K. pneumoniae*, pode levar a infecções intestinais e sistêmicas (Kaur *et al.*, 2018). Portanto, os efeitos inibitórios são cruciais para a formulação de estratégias eficazes no controle e tratamento de infecções gastrointestinais.

4 CONCLUSÕES

A pesquisa realizada marca um avanço significativo por ser o primeiro estudo ao identificar bactérias com potencial probiótico nos frutos de maracujá-do-mato, coletados em área de Cerrado baiano. O método de fermentação espontânea utilizado para processar esses frutos foi crucial para o sucesso do isolamento das BALs.

Os resultados da análise molecular indicaram que o isolado encontrado pertence ao gênero *Enterococcus*, possuindo metabolismo homofermentativo. As avaliações *in vitro* revelaram que essa bactéria possui características que as alinham com os critérios de probióticos estabelecidos pela Anvisa, como a resistência a ambientes ácidos e a não produção de enzimas patogênicas. Além disso, a ausência de genes de resistência a antibióticos como vancomicina, cloranfenicol e tetraciclina é um aspecto positivo, além de demonstrar capacidade de inibir patógenos que podem causar infecções intestinais, sugerindo um potencial interessante para aplicações na indústria alimentícia.

Os achados deste estudo abrem novas possibilidades para alternativas aos probióticos lácteos, especialmente para aqueles que têm intolerância à lactose, promovendo a criação de opções alimentares mais saudáveis e inclusivas. Para validar os efeitos desses isolados na saúde, é fundamental realizar mais pesquisas que incentivem a exploração da microbiota associada ao fruto do maracujá-do-mato e que promovam práticas sustentáveis no bioma do Cerrado.



REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. A; NOGUEIRA, J. M. R. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos. RBAC. 2021;53(3):219-223. DOI: 10.21877/2448-3877.20210215.
- AGUIAR, F. S. Avaliação da fermentação espontânea dos frutos de euterpe oleracea durante o período pós-colheita e suas possíveis implicações sobre a atração de triatomíneos. 86f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
- AMARAL, D. M. F. Enterococcus faecium and Enterococcus durans isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. J Dairy Sci. 2017 Feb;100(2):933-949. DOI: 10.3168/jds.2016-11513.
- AGUILLÓN-OSMA, J et al. Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (Passiflora edulis) leaves and juice extracts. J Food Biochem. 2019 Jul;43(7):e12879. DOI: 10.1111/jfbc.12879.
- ANASTÁCIO, L. M et al. Microrganismos do fruto cafeeiro. Luzerna: Editora Ad Verbum, 2020. 23p.
- ANVISA. Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Resolução-RDC nº 216/2004. 3ªed. Brasília, 2004.
- ARAÚJO, A. J. G et al. Characterization of Enterococcus spp. isolated from a fish farming environment in southern Brazil. Braz. J. Biol., 2021, v. 81, n. 4 pp.954-961. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.232503>
- ASLIM, B et al. Determination of the bacteriocin like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT, v. 38, p. 691-694, 2005.
- BARNES, A. M. T et al. Enterococcus faecalis readily colonizes the entire gastrointestinal tract and forms biofilms in a germ-free mouse model. Virulence. 2017 Apr 3;8(3):282-296. DOI: 10.1080/21505594.2016.1208890.
- BEN, S. L et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of Enterococcus spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. J Sci Food Agric. 2016 Mar 30;96(5):1627-33. DOI: 10.1002/jsfa.7264.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 jul. 2018.
- BRASIL. Portaria nº 162, de 12 de março de 2021. Dispõe sobre as diretrizes e os procedimentos para melhoria da qualidade regulatória na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 mar. 2021.
- BRITO, Gabriela Fachine. Seleção e microencapsulação de bactérias ácido-láticas potencialmente probióticas obtidas de frutos do bacupari (Rheedia gardneriana). 72f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas. 2021.



COSTA, G. N et al. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “in vitro” *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, set./out. 2012.

CHARTERIS, W. P et al. Antibiotic susceptibility of potential probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.*,1998;61:1636–1643.

CHUN, J et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Oct;57(Pt 10):2259-2261. DOI: 10.1099/ijs.0.64915-0. PMID: 17911292.

CLSI. *Antibiograma – Interpretação das zonas de inibição e concentração inibitória mínima*. 2022. Disponível em:< <https://www.dme.ind.br/wp-content/uploads/Bula-de-Bancada-CLSI-2022.pdf>>. Acesso em: 28 de junho de 2024.

DUC, L. H et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Apr;70(4):2161-71. DOI: 10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004. PMID: 15066809; PMCID: PMC383048.

EMBRAPA. *Caracterização físico-química da polpa de maracujá do mato*. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, 2009. 3p.

EMBRAPA. *Microbiota láctica de queijos artesanais*. Laura Maria Bruno, Juliane Döering Gasparin Carvalho. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 30p.

EMBRAPA. *Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 15p.

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

FDA. 2019. *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. Disponível em:< <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>>. Acesso em: 17 de ago. 2024.

FRANZ, C. M et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol.* 2011 Dec 2;151(2):125-40. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, n. 2/3, p. 215-222, 2003.

GOUVEIA, C. K. *Isolamento e identificação de bactérias de cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931): avaliação da atividade de enzimas proteolíticas e amilolíticas*. 82f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012.

GORDON, D; ABAJIAN, C; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 1998 Mar;8(3):195-202. DOI: 10.1101/gr.8.3.195.

HUANG, S et al. Intestinal Mucosal Immunity-Mediated Modulation of the Gut Microbiome by Oral Delivery of *Enterococcus faecium* Against *Salmonella* Enteritidis Pathogenesis in a Laying Hen Model. *Front Immunol.* 2022 Mar 15;13:853954. DOI: 10.3389/fimmu.2022.853954.

INCT. *Manual de procedimentos para herbários*. Editora universitária UFPE: Recife, 2013.



- KAUR, C. P et al. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *J Dig Dis*. 2018 May;19(5):262-271. DOI: 10.1111/1751-2980.12595.
- KIELISZEK, M et al. Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules*. 2021 Mar 25;26(7):1858. DOI: 10.3390/molecules26071858.
- KORCARI, D et al. Exploration of *Lactiplantibacillus fabifermentans* and *Furfurilactobacillus rossiae* as potential cocoa fermentation starters. *J Appl Microbiol*. 2022 Sep;133(3):1769-1780. DOI: 10.1111/jam.15687.
- LANE, D. J et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991 Jan;173(2):697-703. DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.
- MEDEIROS, G. K. V et al. *Cereus jamacaru* DC. (mandacaru) fruit as a source of lactic acid bacteria with in vitro probiotic-related characteristics and its protective effects on *Pediococcus pentosaceus* during lyophilization and refrigeration storage. *Int J Food Microbiol*. 2024 Jun 2;417:110695. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110695.
- NIETO-ARRIBAS, P et al. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol*. 2011 Aug;28(5):891-9. DOI: 10.1016/j.fm.2010.12.005.
- NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. 6ed. Vol. 23 No. 2, 2003.
- OLIVEIRA, M. N et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002.
- PALMELA, C et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2018 Mar;67(3):574-587. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314903.
- PEREIRA, Z, C et al. Passion fruit (*Passiflora* spp.) pulp: A review on bioactive properties, health benefits and technological potential, *Food Research International*, v. 166, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112626>.
- PLA, M. L et al. Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. *Biomed Res Int*. 2015;2015:365025. DOI: 10.1155/2015/365025.
- RAIZEL, R et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciência & Saúde, Porto Alegre*, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.
- RAO, O et al. Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health. *IntechOpen*: 2016, 394p. DOI: 10.5772/63141.
- REIS, L. C. R et al. Stability of functional compounds and antioxidant activity of fresh and pasteurized orange passion fruit (*Passiflora caerulea*) during cold storage, *Food Research International*, v.106, 2018, p. 481-486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.019>.
- REUBEN, R. C et al. Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiol*. 2019,nov 12;19(1):253. DOI: 10.1186/s12866-019-1626-0.



RICKE, S. C. The gastrointestinal tract ecology of Salmonella enteritidis colonization in molting hens. *Poult Sci.* 2003 Jun;82(6):1003-7. DOI: 10.1093/ps/82.6.1003.

RODRIGUEZ, H.; CUIEL, J. A.; LANDETE, J. M.; RIVAS, B.; FELIPE, F. L.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MANCHEÑO, J. M.; MUÑOZ, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 132, p. 79-90, 2009.

SATO, A. S. T et al. Isolation and Genetic Identification of Endophytic Lactic Acid Bacteria From the Amazonian Açai Fruits: Probiotics Features of Selected Strains and Their Potential to Inhibit Pathogens. *Front Microbiol.* 2021 Jan 8;11: 610524. DOI: 10.3389/fmicb.2020.610524.

SHAHVEH, M et al. Molecular Characterization of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolated from a Meat Source in Shahrekord Local Markets, Iran. *Arch Razi Inst.* 2023 Aug 31;78(4):1387-1396. DOI: 10.32592/ARI.2023.78.4.1387.

SIONEK, B et al. Beneficial Bacteria Isolated from Food in Relation to the Next Generation of Probiotics. *Microorganisms* 2023, 11(7),1714. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071714>.

SILVA, M. R et al. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.6, p.1790- 1793, 2008.

TENDENEDZAI, J. T. Enterococcus spp. Cell-Free Extract: An Abiotic Route for Synthesis of Selenium Nanoparticles (SeNPs), Their Characterisation and Inhibition of Escherichia coli. *Nanomaterials (Basel)*. 2022 Feb 16;12(4):658. DOI: 10.3390/nano12040658.

TRINDADE, D. P. A et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria in fruit processing residues from the Brazilian Cerrado and its probiotic potential, *Food Bioscience*, v. 48, 2022, 101739.

VEETTIL, V. N; CHITRA, A. V. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* using Response Surface Methodology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2022 Jun 30;68(6):105-110. DOI: 10.14715/cmb/2022.68.6.17.

VIEIRA, A. D. S et al. The impact of fruit and soybean by-products and amaranth on the growth of probiotic and starter microorganisms. *Food Res Int.* 2017 Jul;97:356-363. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.04.026.

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. *Front Microbiol.* 2018;9:e--2539.

WICAKSONO, W. A et al. Impact of Cultivation and Origin on the Fruit Microbiome of Apples and Blueberries and Implications for the Exposome. *Microb Ecol.* 2023 Aug;86(2):973-984. DOI: 10.1007/s00248-022-02157-8.

YANG, J et al. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Banana and Its Application in Silage Fermentation of Defective Banana. *Microorganisms*. 2022 Jun 9;10(6):1185. DOI: 10.3390/microorganisms10061185.

