

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* SP. E *SACCHAROMYCES* SP. DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DO FRUTO AMAZÔNICO (PUPUNHA) COM POTENCIAL PROBIÓTICO E BIOTECNOLÓGICO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS ALIMENTÍCIOS



Revista
Desafios

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

Isolation and identification of Lactobacillus sp. and Saccharomyces sp. from spontaneous fermentation of amazonian fruit (pupunha) with probiotic and biotechnological potential for the development of new food products

Aislamiento e identificación de Lactobacillus sp. y Saccharomyces sp. de la fermentación espontánea de la fruta amazónica (pupunha) con potencial probiótico y biotecnológico para el desarrollo de nuevos productos alimenticios

Wilson Lopes Miranda^{*1}, Breno Gomes de Souza¹, Juliana Fonseca Moreira Da Silva², Geovanka Marcelle Aguiar Leão³

¹Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Aluno do Curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins, Palmas - To, Brasil.

²Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Orientadora do Curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins, Palmas - To, Brasil.

³ Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Aluna de mestrado, Universidade Federal do Tocantins, Palmas - To, Brasil.

*Correspondência: Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, UFT, Av. NS 15, 109 Norte, Palmas, Tocantins, Brasil. CEP:77.010-090. e-mail: julianafmsilva@uft.edu.br

Artigo recebido em 27/06/2021 aprovado em 29/10/2021 publicado em 03/11/2021.

RESUMO

A Amazônia detém enormes reservas nativas, ricas em frutas que apresentam grande importância social e econômica, dentre as quais destaca-se a Pupunha (*Bactris gasipaes*). Por meio da biotecnologia pode-se fazer uso de microrganismos com potencial probiótico associados a esses frutos regionais e disponíveis nessa região. Assim, o trabalho teve como objetivo isolar linhagens microbianas (*Lactobacillus* sp. e *Saccharomyces* sp.) com potencial probiótico e biotecnológico, obtidas da fermentação espontânea do fruto Pupunha. Os frutos, obtidos em feiras livres de Manaus, foram submetidos a fermentação espontânea durante 15 dias. Após este período isolou-se 185 microrganismos que foram caracterizados quanto a sua morfologia, teste de catalase, coloração de gram, e alguns testes de potencial probiótico como o antagonismo frente a enteropatógenos e teste de temperatura. Os isolados foram agrupados em 4 morfotipos diferentes apresentando coloração de gram +, catalase – e micromorfologia de cocobacilos sendo sugestivos de *Lactobacillus* sp.. Todos apresentaram resistência a altas temperaturas e os morfotipos I e II apresentaram maior potencial antagonista frente as cepas patogênicas. Durante todo o processo de fermentação espontânea da Pupunha não foram observados isolados das leveduras do gênero *Saccharomyces* sp..

Palavras-chave: Pupunha, agregação de valor, potencial tecnológico.

ABSTRACT

The Amazon holds enormous native reserves, rich in fruits that have great social and economic importance, among which stands out the Pupunha (Bactris gasipaes). Through biotechnology it is possible to make use of microorganisms with probiotic potential associated with these regional fruits and available in this region. Thus, this work aimed to isolate microbial strains (Lactobacillus sp. and Saccharomyces sp.) with probiotic and

biotechnological potential, obtained from spontaneous fermentation of the Pupunha fruit. The fruits, obtained from free markets in Manaus, were submitted to spontaneous fermentation for 15 days. After this period 185, microorganisms were isolated and characterized regarding their morphology, catalase test, gram staining, and some probiotic potential tests such as antagonism against enteropathogens and temperature test. The isolates were grouped into 4 different morphotypes presenting gram + staining, catalase - and coccobacilli micromorphology suggestive of *Lactobacillus* sp. All showed resistance to high temperatures, and morphotypes I and II presented a greater antagonist potential against pathogenic strains. During the whole process of spontaneous Pupunha fermentation, no isolates of yeasts of the genus *Saccharomyces* sp. were observed.

Keywords: Pupunha, value addition, technological potential.

RESUMEN

La Amazonia alberga enormes reservas autóctonas, ricas en frutos de gran importancia social y económica, entre los que destaca la Pupunha (*Bactris gasipaes*). Mediante la biotecnología, se pueden utilizar microorganismos con potencial probiótico asociados a estas frutas regionales y disponibles en esta región. Así, este trabajo tuvo como objetivo aislar cepas microbianas (*Lactobacillus* sp. y *Saccharomyces* sp.) con potencial probiótico y biotecnológico, obtenidas a partir de la fermentación espontánea del fruto de Pupunha. Las frutas, obtenidas en mercados libres de Manaus, fueron sometidas a fermentación espontánea durante 15 días. A partir de ahí, se aislaron 185 microorganismos y se caracterizaron en cuanto a su morfología, prueba de catalasa, tinción de Gram y algunas pruebas de potencial probiótico como el antagonismo contra enteropatógenos y la prueba de temperatura. Los aislados se agruparon en 4 morfotipos diferentes que presentaban tinción Gram +, catalasa - y micromorfología de cocobacilos siendo sugestivos de *Lactobacillus* sp. Todos mostraron resistencia a las altas temperaturas y los morfotipos I y II mostraron un mayor potencial antagonista contra las cepas patógenas. Durante todo el proceso de fermentación espontánea de Pupunha no se observaron aislamientos de las levaduras del género *Saccharomyces* sp.

Descriptor: Pupunha, valor añadido, potencial tecnológico

INTRODUÇÃO

A região Amazônica é detentora de enormes reservas nativas e ricas em frutas que apresentam uma grande importância social e econômica, dentre as quais podemos destacar a Pupunha (*Bactris gasipaes*). A pupunheira (*B. gasipaes* Kunth) é uma espécie de palmeira nativa da América Latina tropical, sendo encontrada com elevada abundância na Amazônia Ocidental e sul da América Central e cultivada principalmente por pequenos agricultores que buscam explorar o seu palmito e ou o seu fruto de diferentes formas (CARVALHO et al., 2013; GRAEFE et al., 2013). Os frutos desta palmeira apresentam-se em forma de cachos com formato e coloração variada: redondas, ovóides ou cônicas e cores vermelha, amarela, alaranjada e até mesmo verde, sendo considerados de alto valor energético, nutricional e pró-vitamínico (BRASIL, 2002).

A biotecnologia de alimentos fornece ferramentas importantes para caracterização e

beneficiamento desses frutos, agregando valor e tornando-os disponíveis o ano todo. Por meio da biotecnologia pode-se fazer uso de microorganismos com potencial probiótico associados a frutos regionais como os disponíveis na região amazônica (SILVA et al, 2015; CHANG et al., 2018).

Segundo Oliveira et al., (2017) um alimento funcional possui componentes bioativos em sua formulação como por exemplo, alguns peptídeos, proteínas, fibras, fitoquímicos, vitaminas, minerais, ervas, ácidos graxos (ômega 3, ômega 6 entre outros) e os probióticos.

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) como: “microorganismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem um benefício à saúde do hospedeiro”.

Para que um microrganismo seja considerado um probiótico ele precisa possuir algumas características específicas, tais como: resistência ao ambiente ácido estomacal, a sais biliares e as enzimas pancreáticas; variações de pH, adesão às células da mucosa intestinal; e produção de substâncias antimicrobianas contra patógenos, entre outras (OLIVEIRA et al, 2017). Os microrganismos mais comumente utilizados como probióticos, são bactérias e leveduras. Basicamente, um gênero de levedura (*Saccharomyces* sp.) e quatro gêneros bacterianos são a base para a maioria dos probióticos: *Saccharomyces* sp (levedura), *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Escherichia* (bactérias) (SAAD et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho atuou no estudo biotecnológico do fruto Amazônico (Pupunha) com intuito de isolar, identificar e caracterizar, bioquímico e morfologicamente, linhagens microbianas (*Lactobacillus* sp. e *Saccharomyces* sp.) com potencial probiótico e biotecnológico, obtidas da fermentação espontânea do fruto Pupunha (*Bactris gasipaes*), para futuramente serem utilizados no desenvolvimento de novos alimentos funcionais suplementados com probióticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DO FRUTO

Obteve-se os frutos da pupunha nas feiras livres da cidade de Manaus, sendo posteriormente armazenados em caixa isotérmica refrigerada, para manutenção da microbiota presente, e enviados ao laboratório de Microbiologia geral e aplicada da UFT. Após coleta e envio, todas as amostras foram selecionadas de acordo com critérios relacionados à ausência de danos e podridões visuais. Em seguida, os frutos foram higienizados com água corrente e imersos

em solução clorada a 10 ppm por 10 minutos, seguido de enxague com água corrente e lavagem, por duas vezes, com água destilada. Após a higienização, manteve-se os frutos em sacos plásticos estéreis e macerados para fermentarem espontaneamente durante 15 dias a 25°C (NASCIMENTO et.al, 2017).

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICROORGANISMOS

A metodologia utilizada para o isolamento foi a proposta por Ribeiro (2012) com modificações. Para o isolamento, adicionou-se 25 g do fruto em 225 mL de solução salina peptonada estéril (SILVA; JUNQUEIRA, 1995) e posteriormente agitada em Shaker durante 02 min a 127 rpm. Em seguida, realizou-se sucessivas diluições seriadas chegando até 10^{-10} . A partir dessas diluições, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada com alça de Drigalski na superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe – Difco) e subsequentemente foram incubadas a 25 °C, até 72 horas em microaerofilia. O isolamento foi realizado em 0, 3, 6, 9, 12 e 15 tempos (dias) de fermentação. Todo este experimento foi realizado em duplicata e com duas repetições.

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram categorizadas de acordo com suas características morfológicas, realizando-se a contagem total de isolados de cada morfotipo encontrado, identificando o fruto, tempo e diluição. Após a obtenção desses isolados realizou-se a confirmação da pureza através das características bioquímicas de coloração de Gram e Catalase. Além disso, os microrganismos foram classificados de acordo com a sua micromorfologia e posteriormente transferidos para tubos contendo meio ágar MRS inclinado e cobertos com óleo mineral estéril

(RHODES, 1957). Todos os tubos foram acondicionados em geladeira, a temperatura de aproximadamente de 4°C, para realização dos próximos testes.

TESTES DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO

- Tolerância de crescimento a altas temperaturas

Todos os microrganismos isolados foram submetidos ao crescimento a 37°C, os isolados que desenvolveram nessa temperatura tornaram-se aptos para prosseguir com os testes e conseqüentemente foram categorizados como tolerantes ao crescimento em altas temperaturas.

- Teste de antagonismo frente a enteropatógenos

Inicialmente os isolados acondicionados no tubo inclinado de meio ágar MRS foram repicados em caldo MRS e incubados a 37°C por 72 hrs. Após este período, o caldo inoculado, foi centrifugado obtendo o sobrenadante livre de células (SLC). Posteriormente, com o auxílio de Swab estéril, placas de petri contendo o meio ágar Mueller Hinton tiveram suas superfícies semeadas com cepas patogênicas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella entérica subsp.*

typhimurium (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (INCQS 00219). Em seguida, perfurou-se poços 5 mm de diâmetro e adicionou-se 50 µL do SLC, obtidos de cada morfotipo isolado da pupunha, aos poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em microaerofilia. Após o período foi realizada a leitura visual do halo para classificação em inibição ou redução do patógeno, quando comparado ao controle positivo. (VITALI et al., 2012 com modificações).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontra-se a relação dos morfotipos isolados a partir da fermentação espontânea da Pupunha (*Bactris gasipaes*) de acordo com o tempo e as diluições testadas. Observa-se que no tempo 0 e 3 encontrou-se o crescimento de morfotipos apenas nas diluições 10⁻⁷ apresentando 1 morfotipo e 10⁻⁶ apresentando 2 morfotipos respectivamente. Por outro lado, nos tempos (6, 9, 12 e 15 dias), observamos a presença de morfotipos em no mínimo 3 diluições com a presença gradativa, no decorrer dos dias de fermentação do fruto, de morfotipos em diluições menores.

Tabela 1. Quantidade de morfotipos isolados da Pupunha (*Bactris gasipaes*) de acordo com as diluições e tempo (dias) de fermentação espontânea.

Diluições	Tempo (dias)					
	0	3	6	9	12	15
10 ⁻¹	-*	-*	-*	-*	-*	-*
10 ⁻²	-*	-*	-*	-*	-*	-*
10 ⁻³	-*	-*	-*	-*	-*	-*
10 ⁻⁴	-*	-*	-*	-*	-*	-*
10 ⁻⁵	-*	-*	1 MF	2 MF	-*	-*
10 ⁻⁶	-*	2 MF	3 MF	3 MF	2 MF	-*
10 ⁻⁷	1 MF	-**	3 MF	3 MF	3 MF	1 MF
10 ⁻⁸	-**	-**	-**	1 MF	2 MF	1 MF
10 ⁻⁹	-**	-**	-**	1 MF	2 MF	1 MF
10 ⁻¹⁰	-**	-**	-**	-**	3 MF	-**

* Diluições com morfotipos incontáveis; ** Diluições em que não ocorreram crescimento; MF = morfotipos.

Notou-se, também, um maior número de morfotipos isolados no tempo 9 e 12, presente em um maior número de diluições. Justifica-se tal achado pela possibilidade que esse período de tempo e temperatura, tenha influenciado no processo fermentativo favorecendo o desenvolvimento dos *Lactobacillus sp.*

Destaca-se que não foi possível realizar o isolamento das leveduras do gênero *Saccharomyces* em função da ausência de crescimento desses microorganismos

A Tabela 2 consta a relação de todos os morfotipos encontrados e agrupados, segundo suas características morfológicas, e também a quantificação dos isolados em cada grupo. No total, identificou-se 4 morfotipos diferentes durante os 6 tempos de fermentação, totalizando 185 colônias isoladas da Pupunha. Observa-se que a forma circular foi a predominante, estando presente em todos os

morfotipos. Apenas o morfotipo IV apresentou borda ondulada correspondente a 8 isolados. Todos os isolados apresentaram brilho e textura cremosa. Não foram observadas uma predominância para as características morfológicas elevação e cor.

Tratando-se do tamanho dos morfotipos, por meio da Tabela 2, percebe-se que os morfotipos variaram dos tamanhos: 0,2 a 0,5 cm. É importante destacar que o morfotipo I e II expuseram uma maior prevalência dentre os outros, 94 e 56 isolados respectivamente, representando aproximadamente 81,10% dos isolados encontrados no trabalho. Esta informação, aliada a outros testes, pode ajudar a traçar o perfil das principais bactérias ácido lácticas presentes neste fruto, evidenciando o potencial probiótico que esse fruto amazônico pode ofertar na disponibilidade de microrganismos que beneficiam a saúde humana.

Tabela 2. Caracterização morfológica dos morfotipos isolados da Pupunha (*Bactris gasipaes*).

Morfotipo	Características morfológicas							Nº total de isolados
	Forma	Elevação	Margem	Cor	Brilho	Textura	Tamanho (cm)	
I	circular	plana	Inteira	creme	presente	cremosa	0,2 a 0,5	94
II	circular	convexa	Inteira	amarelo claro	presente	cremosa	0,2 a 0,5	56
III	circular	elevada	Inteira	branca	presente	cremosa	0,2 a 0,5	27
IV	circular	papilada	Ondulada	bege	presente	cremosa	> 0,5	8
Total de isolados								185

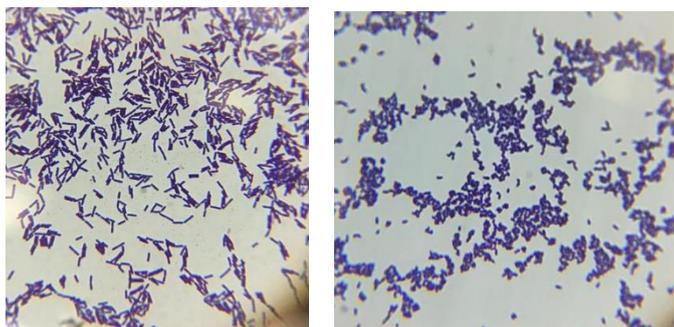
Ao reativarmos os isolados obtivemos uma perda de aproximadamente 19%, isso pode ter ocorrido devido a quedas de energia constante nas dependências da Universidade. Assim, o trabalho foi dado continuidade com 149 isolados. Dos 149 microorganismos isolados todos foram submetidos

aos testes de catalase, coloração de Gram e análise microscópica para a confirmação da morfologia.

No teste da catalase 136 isolados apresentaram resultados negativos, ou seja, nenhum deles conseguiram produzir oxigênio quando em contato com o peróxido de oxigênio, indicando a

ausência dessa enzima (catalase). Em relação a coloração de Gram todos os morfotipos se mostraram Gram positivos e 124 evidenciaram a presença de cocobacilos. A figura 1 representa a microfotografia dos morfotipos, destacando as características aqui apontadas.

Figura 1. Imagem da microscopia óptica dos morfotipos isolados da Pupunha (*Bactris gasipaes*), após técnica de coloração de gram.



Nos testes de resistência a altas temperaturas, dos 124 *Lactobacillus* isolados, 95 mostraram-se competentes, pois estes microrganismos se desenvolveram a 37°C por 72 horas, desta forma iniciamos outros testes para a verificação do potencial probiótico.

Os 95 *Lactobacillus* isolados foram submetidos ao teste de antagonismo frente as bactérias enteropatogênicas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

Todos os 95 isolados foram submetidos ao teste de antagonismo pela metodologia do poço, dentre estes isolados, 89 apresentaram alguma redução ou inibição frente aos enteropatógenos testados.

Na tabela 03 são apresentados os resultados dos morfotipos isolados, exceto o morfotipo IV, que todos os isolados não sobreviveram ao teste de altas temperaturas.

Analisando a tabela 03, observamos que todos os morfotipos reduziram a concentração do enteropatógeno *S. aureus*, sendo que o morfotipo I foi o que apresentou um maior número de isolados. Em relação a *Sal. typhimurium*, verificamos que 10 isolados do morfotipo I e 1 isolado do morfotipo II inibiram este enteropatógeno. Para a *L. monocytogenes* apenas 5 isolados do morfotipo I inibiu o seu crescimento. Apenas 13 isolados, 4 representantes do morfotipo I e 9 do morfotipo II, inibiram a bactéria *E. coli*.

A diversidade na microbiota da Pupunha corrobora com o já descrito por vários autores que confirmam o potencial existente em frutos no tangente ao isolamento de potenciais probióticos. Os *Lactobacillus* têm grande distribuição pela natureza, predominando nos alimentos ricos em proteínas, carboidratos e vitaminas, e por apresentarem características fisiológicas específicas na utilização de substrato, capacidade metabólica e propriedades probióticas, podem ser amplamente utilizados em alimentos fermentados (LÓPEZ-DIAS et al., 2000; RODRÍGUEZ et al., 2009; RIBEIRO, 2012).

Isso mostra que a Pupunha, mesmo em isolamentos prévios como o realizado nesse trabalho, já revela uma variedade de morfotipos e isolados, demonstrando uma microbiota muito rica. Tal informação é evidenciada no estudo de Almeida et al., (2005) que identificaram a presença de 7 fungos (*Fusarium* sp., *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum*) presentes em isolados realizados apenas dos ápices caulinares de pupunheiras saudáveis cultivadas no campo.

Os morfotipos isolados no estudo apresentam características compatíveis com o gênero *Lactobacillus*, no entanto a confirmação precisa da

espécie só poderá ocorrer por meio do sequenciamento genético, mas tais achados já representam o potencial que o fruto possui na oferta de possíveis probióticos (RIBEIRO, 2012).

Isso é reforçado com os testes de avaliação de potencial probiótico onde as cepas estudadas mostraram resultados positivos sugestivos tanto na resistência as altas temperaturas quanto ao antagonismo frente aos patógenos. Embora alguns testes adicionais ainda precisam ser realizados.

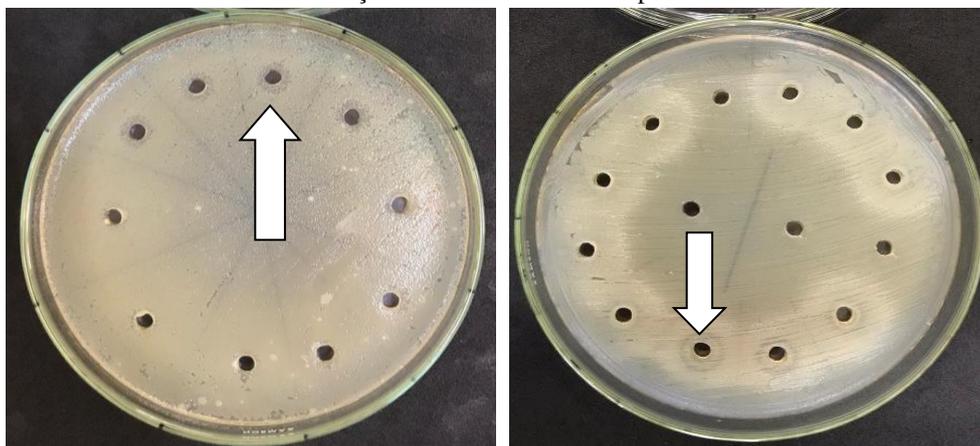
Portanto, todas os resultados e informações aqui apresentadas retomam o grande potencial existente nesse fruto (Pupunha) que é comum em nosso país e região, reiterando as expectativas com a finalização dos testes restantes e etapas futuras de projetos seguintes para a identificação dos *Lactobacillus* e desenvolvimento de novos alimentos funcionais suplementados com esses potenciais probióticos.

Tabela 03. Antagonismo dos morfotipos isolados da Pupunha (*Bactris gasipaes*) frente as cepas bacterianas enteropatogênicas.

Morfotipo	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Esquecichia coli</i>	
	I	R	I	R	I	R	I	R
I	0	34	10	0	5	0	4	0
II	0	22	1	0	0	0	9	0
III	0	4	0	0	0	0	0	0

I = Inibição; R= Redução; 0 = não apresentou halo

Figura 2. Inibição e redução de enteropatógenos frente aos morfotipos isolados da Pupunha (*Bactris gasipaes*). A: halos de inibição de *E. coli* indicado pela seta; B: halos de redução de *S. aureus* indicado pela seta.



CONCLUSÃO

- Os tempos 6, 9 e 12 apresentaram uma maior variedade e quantidade de morfotipos;
- Obteve-se 4 morfotipos e 185 isolados da fermentação espontânea da Pupunha;

- A forma circular, margem inteira, brilho presente, textura cremosa, tamanho de 0,2 a 0,5 cm foram os mais presentes;
- Os possíveis *Lactobacillus* sp. isolados apresentaram resistência e algum tipo de ação redutora ou inibitória frente aos enteropatógenos estudados.

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil e de todos os integrantes do LMGGA em especial a orientadora prof^a. Dra. Juliana Fonseca Moreira da Silva e a mestranda Geovanka Marcelle Aguiar Leão.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. V. DE; YARA, R.; ALMEIDA, M. DE. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n. 5, p.467-470, May 2005. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100204X2005000500007&lng=en&nrm=iso> . access on 20 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000500007>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Alimentos regionais brasileiros. **Ministério da Saúde: Brasília**, 2002.
- CARVALHO, A. V.; BECKMAN, J. C.; MACIEL, R. A.; FARIAS NETO, J. T. Características físicas e químicas de Frutos de pupunheira no estado do Pará. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 763-768, 2013.
- CHANG, L.S.; KARIM, R.; MOHAMMED, A.S.; GHAZAI, H.M. Characterization of enzyme-liquefied soursop (*Annona muricata* L.) puree. **LWT - Food Science and Technol.**, v. 94, p. 40–49, 2018.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Evolution of health and nutritional properties of probiotics in food including power milk with live lactic acid bacteria. **Cordoba, Spain: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization**. 2001. 34 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf> Acesso em 05 de Set. de 2020.
- GRAEFE, S.; DUFOUR, D.; ZONNEVELD, M. V.; RODRIGUEZ, F.; GONZALEZ, A. Peach palm (*Bactris gasipaes*) in tropical Latin America: implications for biodiversity conservation, natural resource management and human nutrition. **Biodiversity and Conservation**, v. 22, p. 269–300, 2013.
- LÓPEZ-DIAS, T.M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCIA-LÓPEZ, M.L.; MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a ham-made blue cheese. **Food Microbiology**, v.17, p.23-32, 2000.
- NASCIMENTO OLIVEIRA F, F. M. F.; SOUZA, A. J.; GOMEZCACERES, P. L.. Factors that interfere in the process of natural fermentation of the cubiu slices. **Revista Colombiana Ciencia Animal**;v. 9, n 1.;p. 81-88, 2017.
- OLIVEIRA, J. L. O.; ALMEIDA, C.; BOMFIM, N. S.. A importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unoesc e Ciência - ACBS**, v. 8, n. 1, p. 7-12, 2017.
- RIBEIRO, M. C. O. R. **Caracterização do *Pediococcus acidilactici* b14 quanto às propriedades probióticas e sua associação com *Lactobacillus acidophilus* atcc 4356 com aplicação em sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, J.A.; LANDETE, J.M.; RIVAS, B. DE; FELIPE, F.; L. DE; GÓMEZCORDOVÉS, C.; MANCHEÑO, J.M.; MUÑOZ, R. Foods phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.79-90, 2009.
- RHODES, M. E. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 20, n. 1, p.108–118, apr. 1957.
- SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos**. 1º Ed – São Paulo: Livraria Varela, 2011.
- SILVA, J. F. M.; PELUCIO, J M.; PRADO, G.; MADEIRA, J. E. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; PIMENTA, R. S.; NICOLI, J. R.. Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.J. Métodos de análise microbiológica de alimentos: manual técnico n° 14. **Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1995. p.17-19.

SIVAKUMAR, N.; RAJAMANI; SAIF, A.B. Partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus*

acidilactici. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.1177-1184, 2010.

VITALI, B.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G., SPISNI, E.; MACCAFERRI, S.; BRIGIDI, P.; GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, p. 116-125, 2012.