



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**THAÍS COSTA SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE**  
**LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS AMAZÔNICOS PARA APLICAÇÃO EM**  
**ALIMENTOS**

**Palmas, TO**  
**2023**

**Thaís Costa Santos**

**Identificação e Avaliação do Potencial Probiótico de Leveduras Isoladas de Frutos  
Amazônicos para Aplicação em Alimentos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins (UFT), como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Juliana Fonseca Moreira da Silva

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Eskálath Morganna Silva Ferreira

**Palmas, TO  
2023**

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

---

C838i Santos, Thaís Costa.

Identificação e Avaliação do Potencial Probiótico de Leveduras Isoladas de Frutos Amazônicos para Aplicação em Alimentos. / Thaís Costa Santos. – Palmas, TO, 2023.

66 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2023.

Orientadora : Juliana Fonseca Moreira da Silva

Coorientadora : Eskálath Morganna Silva Ferreira

1. Leveduras. 2. Potencial probiótico. 3. Frutos amazônicos. 4. Liofilização.  
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).**

Thaís Costa Santos

**Identificação e Avaliação do Potencial Probiótico de Leveduras Isoladas de  
Frutos Amazônicos para Aplicação em Alimentos**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 02 de agosto de 2023, pela Banca  
Examinadora constituída pelos membros:

---

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins  
UFMG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Cristina Auler do Amaral Santos  
PPGCTA/ UFT

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Fonseca Moreira da Silva  
Orientadora- UFT

Palmas, TO  
2023

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Maria, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica. Sem eles nada disso seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me abençoa todos os dias com o dom da vida, que guia meus passos e jamais me abandona.

Aos meus pais, Antonio e Maria Neuza, que me deram a vida e lutaram desde sempre para que eu pudesse ter acesso à educação, privando-se em vários momentos para que eu pudesse ter as oportunidades que tive até o momento. Palavras não suficientes para expressar meu amor e gratidão por vocês.

Aos meus irmãos, Tauane, Marcelo e Mateus, por partilhar a vida comigo e que mesmo distantes sempre estiveram presentes, Agradeço a Deus e tenho orgulho de tê-los como irmãos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Catiele, Diana, Fabrícia e Paulo, vocês tornam os dias mais leves durante esta jornada.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica, Guilherme, Lucas e Artur, por toda ajuda. Vocês me ensinaram muito.

À minha querida e doce orientadora, Juliana, sou muito grata por toda ajuda, ensinamentos, conselhos e risadas durante esses dois anos de mestrado, a senhora tornou esta jornada mais agradável e leve.

À minha querida coorientadora, Morganna, que sempre se mostrou pronta a ajudar e ensinar, sem se importar com horário ou dia.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA), por ceder as leveduras utilizadas nesta pesquisa.

Ao professor Guilherme Nobre pela gentileza em ceder o espectrofotômetro, tornando possível a continuidade da minha pesquisa.

De forma geral, a toda equipe do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) por ser mais que uma equipe, uma família, meu muito obrigada.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA - UFT), seus docentes e coordenação.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD)

À banca examinadora, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (UFMG) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Cristina Auler do Amaral Santos UFT) por todas contribuições.

E por fim, à Universidade Federal do Tocantins pela instalação.

## RESUMO

Probióticos são considerados microrganismos que quando ingeridos em quantidades suficientes e adequadamente podem resultar em diversos benefícios à saúde do hospedeiro. Dentre os microrganismos que possuem esse potencial, as leveduras têm ganhado destaque quanto sua aplicação probiótica, e entre os gêneros, a levedura *Saccharomyces boulardii* é a mais conhecida e disponível comercialmente como probiótica. Bacupari (*Garcinia gardneriana*), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) e pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*), são frutos nativos da região amazônica, ricos em fibras, lipídios e carotenóides; apreciados principalmente pela população do Norte do país e apresentam grande potencial biotecnológico. Assim, a presente pesquisa identificou e avaliou o potencial probiótico de leveduras isoladas de frutos nativos da região amazônica para posterior aplicação na indústria alimentícia. Foram reativadas 418 leveduras previamente isoladas dos frutos supracitados, dessas, 321 estavam viáveis, seguiram para a análise morfológica e testes de crescimento a 37 °C, capacidade de sobreviver a ambiente ácido (pH 1-2, pepsina 3 g/L e NaCl 5 g/ L), resistência aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B, e atividade antagonista contra os seguintes patógenos: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (CDC EDL 1284-ATCC 43893), *Shigella sonnei* (ATCC 11060) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Foram realizados testes de tolerância a sais biliares (0,3%), capacidade de auto agregação e coagregação, fatores de virulência (lipase, gelatinase, DNase e atividade hemolítica) e preservação sob a forma de liofilização. Os resultados obtidos, mostram que das 321 leveduras submetidas ao teste de crescimento à temperatura corporal de mamíferos (37 °C) 288 apresentaram crescimento, dessas 213 conseguiram crescer em condições simuladas da acidez estomacal. Das 57 leveduras foram sensíveis a anfotericina B, 12 apresentaram atividade antagonista contra os patógenos testados. Além disso, todas as 12 leveduras testadas na presença de 0,3% de oxgall apresentaram viabilidade, porém, nos testes de auto agregação e coagregação apenas três leveduras foram selecionadas, essas foram submetidas aos testes de fatores de virulência e demonstraram estar aptas para seguir para liofilização utilizando três crioprotetores. Os resultados obtidos durante o processo de liofilização indicam que a levedura LTC 13 apresentou os melhores resultados, sendo que, dentre os crioprotetores utilizados, a glicose 10% apresentou o melhor desempenho durante o processo. Quanto à identificação molecular, as três leveduras pertencem às seguintes espécies: *Meyerozyma carpophila*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

**Palavras-chaves:** Leveduras. Potencial probiótico. Frutos amazônicos.

## ABSTRACT

Probiotics are considered microorganisms that, when ingested in sufficient and adequate amounts, can result in several benefits to the health of the host. Among the microorganisms that have this potential, yeasts have gained prominence in terms of their probiotic application, and among the genera, the yeast *Saccharomyces boulardii* is the best known and commercially available as a probiotic. Bacupari (*Garcinia gardneriana*), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) and pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*), are fruits native to the Amazon region, rich in fiber, lipids and carotenoids; appreciated mainly by the population of the North of the country and have great biotechnological potential. Thus, the present research identified and evaluated the probiotic potential of yeasts isolated from native fruits of the Amazon region for later application in the food industry. 418 yeasts previously isolated from the aforementioned fruits were reactivated, of which 321 were viable, followed for morphological analysis and growth tests at 37°C, ability to survive an acidic environment (pH 1-2, pepsin 3 g/L and NaCl 5 g/L), resistance to fluconazole and amphotericin B antifungals, and antagonistic activity against the following pathogens: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (CDC EDL 1284-ATCC 43893), *Shigella sonnei* (ATCC 11060) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Bile salt tolerance tests (0.3%), self-aggregation and coaggregation capacity, virulence factors (lipase, gelatinase, DNase and hemolytic activity) and preservation in the form of lyophilization were performed. The results obtained show that of the 321 yeasts submitted to the growth test at mammalian body temperature (37°C) 288 showed growth, of which 213 were able to grow in simulated conditions of stomach acidity. Of the 57 yeasts that were sensitive to amphotericin B, 12 showed antagonistic activity against the tested pathogens. In addition, all 12 yeasts tested in the presence of 0.3% oxgall showed viability, however, in the self-aggregation and coaggregation tests, only three yeasts were selected, which were submitted to virulence factor tests and demonstrated to be able to follow for lyophilization using three cryoprotectants. The results obtained during the lyophilization process indicate that the yeast LTC 13 presented the best results, and, among the cryoprotectants used, glucose 10% presented the best performance during the process. As for molecular identification, the three yeasts belong to the following species: *Meyerozyma carophila*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Rhodotorula mucilaginosa*.

**Key-words:** Yeasts. Probiotic potential. Amazonian fruits.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Leveduras com potencial probiótico</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Microbiota intestinal</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Fontes de isolamento e caracterização de leveduras probióticas</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Identificação de novos microrganismos</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Aplicações biotecnológicas</b>	<b>18</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Objetivo geral:</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Objetivos específicos:</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Reativação de leveduras isoladas de diferentes frutos da região da Amazônia Legal</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Avaliação das propriedades funcionais</b>	<b>204.2.1 Crescimento a 37 °C</b>
21	
4.2.2 Tolerância ao ácido estomacal	21
4.2.3 Tolerância a sais biliares	21
<b>4.3 Resistência a antifúngicos</b>	<b>22</b>
<b>4.4 Avaliação do antagonismo contra patógenos</b>	<b>23</b>
<b>4.5 Teste de capacidade de auto agregação</b>	<b>23</b>
<b>4.6 Teste de capacidade de coagregação</b>	<b>24</b>
<b>4.7 Fatores de virulência</b>	<b>25</b>
4.7.1 Gelatinase	25
4.7.2 Produção de lipase	25
4.7.3 DNase	25
4.7.4 Atividade hemolítica	26
<b>4.8 Identificação molecular de leveduras isoladas de frutos da região da Amazônia Legal</b>	<b>26</b>
4.8.1 Extração de DNA	26
4.8.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	27
4.8.3 Sequenciamento	27

<b>4.9</b>	<b>Propriedades tecnológica</b>	<b>SUMÁRIO</b>	<b>27</b>
4.9.1	Liofilização e armazenamento das leveduras		27
<b>4.10</b>	<b>Análise estatística</b>		<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>		<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização morfológica das leveduras isoladas de diferentes frutos da região da Amazônia Legal</b>		<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Crescimento a 37 °C das leveduras isoladas de diferentes frutos da região da Amazônia Legal</b>		<b>30</b>
<b>5.3</b>	<b>Resistência a pH ácido</b>		<b>31</b>
<b>5.4</b>	<b>Atividade antifúngica</b>		<b>33</b>
<b>5.5</b>	<b>Atividade antagonista</b>		<b>37</b>
<b>5.6</b>	<b>Tolerância a sais biliares</b>		<b>39</b>
<b>5.7</b>	<b>Teste de auto agregação</b>		<b>41</b>
<b>5.8</b>	<b>Teste de coagregação</b>		<b>43</b>
<b>5.9</b>	<b>Fatores de virulência</b>		<b>46</b>
<b>5.10</b>	<b>Liofilização e viabilidade celular</b>		<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b>		<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Trabalhos futuros</b>		<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b>		<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que desempenham algum tipo de benefício à saúde dos hospedeiros se consumido regularmente e em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2002). De forma geral, as bactérias são frequentemente mais utilizadas e reconhecidas como agentes probióticos, e dentre os gêneros *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. são os mais reconhecidos, em função dos efeitos benéficos apresentados não somente no sistema digestório, como também na saúde em geral (MACENA et al., 2022; TERHAAG et al., 2020).

Todavia, com os avanços das pesquisas em busca de microrganismo que apresentem características benéficas para saúde humana, foram observados efeitos probióticos resultantes de leveduras como a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* que está disponível comercialmente (TERHAAG et al., 2020). Esta linhagem é capaz de crescer e se manter viável no trato gastrointestinal de mamíferos, podendo auxiliar no equilíbrio da microbiota intestinal (ANSARI et al., 2023). Estudos vêm sendo realizados e sugerem que *S. cerevisiae* var. *boulardii* pode ajudar na prevenção e/ou tratamento de infecções intestinais, como, por exemplo, diarreias infecciosas causadas por *Salmonella* ou *Escherichia coli* (SOUSA et al., 2021; RAVAGILA et al., 2019; MACHADO et al., 2020). Ademais, tal levedura pode ser capaz de agir no tratamento de outras condições gastrointestinais, a exemplo da síndrome do intestino irritável ou mesmo na colite ulcerativa (ROCHA et al., 2022).

Outros autores descrevem estas características em leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces* sp., como, por exemplo, as da espécie *Meyerozyma caribbica* (MENDONÇA, 2021; AMORIM et al., 2018). As *Debaryomyces hansenii* e *Pichia kudriavzevii*, associam-se além dos benefícios a saúde intestinal a modulação do sistema imunológico, porém, mais estudos são necessários para assegurar a eficácia probiótica destas espécies (GURKAN et al., 2022; HELMY et al., 2019; STANISZEWSKI et al., 2021).

Segundo Guimarães (2015) às linhagens de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* que apresentam potencial probiótico, não oferecem perigos para a saúde humana, sendo considerado um microrganismo Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS). Tal característica é importante para selecionar microrganismos que serão utilizados como probióticos, uma vez que, o objetivo da utilização é que haja benefícios à saúde do hospedeiro.

A obtenção de microrganismos probióticos de maneira geral é realizada por meio do isolamento da microbiota de hospedeiros saudáveis ou de produtos lácteos (SHERWANI; BUKHARI, 2022; BAZIREH et al., 2020). Porém, é possível isolar microrganismos com esta característica por meio de outras fontes, como: frutos, grãos, bebidas fermentadas, sucos de frutas e vegetais, devido a sua composição nutricional que favorece o crescimento de tais microrganismos benéficos (SILVA et al., 2021; SOUSA et al., 2021; CORRÊA, 2019).

Microrganismos probióticos podem ainda ser obtidos a partir de fontes não convencionais, como de substratos oriundos de locais extremos ou ainda poucos explorados como: habitats da região Antártica, solos e plantas (briófitas), uma vez que os microrganismos que habitam esses locais, são, em grande maioria, capazes de sobreviver a condições extremas devido às vias metabólicas incomuns que se adaptam a estas condições e podem apresentar boas características para a seleção de novos agentes probióticos (COUTINHO et al., 2021; DAMIÁN et al., 2022).

Para avaliar a capacidade de um microrganismo possuir características probióticas para uso em mamíferos é necessário realizar diversos ensaios *in vitro* e *in vivo*, (FONSECA et al., 2020) submetendo os microrganismos isolados ao estudo das condições simuladas do sistema gastrointestinal, resistência a variadas faixas de pHs, aos sais biliares, produção de substâncias benéficas e dessa forma realizar a caracterização das propriedades funcionais, segurança e eficácia de novas linhagens (BONET, 2016; KRAUSOVA et al., 2019).

Além dos testes realizados *in vitro*, é importante realizar ensaios em modelos animais ou humanos (PRADHAN; MALLAPA; 2020). Algumas das análises realizadas em ensaios *in vivo*, são: análise do efeito no microbiota intestinal, no sistema imunológico, dentre outros efeitos fisiológicos relevantes à saúde humana (BIANCHI et al., 2020). Testes de segurança também se fazem necessários em tal processo, na literatura, destacam-se os seguintes testes: avaliação da toxicidade e patogenicidade, capacidade de transferência de genes de resistência a antibióticos e dentre outros (FERNANDEZ-PACHECO, 2022).

Os frutos da região amazônica possuem alto potencial biotecnológico, sendo explorados em processos de produção de enzimas microbianas, elaboração de alimentos funcionais, isolamento de microrganismos, e diversas outras aplicações biotecnológicas. A obtenção de microrganismos provenientes de frutos amazônicos tem sido instigada em diversos trabalhos devido à crescente demanda da população por alimentos que ofereçam mais que a função de nutrir, e conseqüentemente a demanda da indústria alimentícia por novos produtos que atendam

às exigências dos consumidores (CARVALHO et al., 2013; COSTA et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Dentre a ampla variedade de frutos nativos da região amazônica, destacam-se o bacupari, tucumã e a pupunha. Esses frutos, de forma geral, apresentam potencial medicinal, nutricional, são ricos em fibras, lipídios e carotenóides (CARVALHO et al., 2013; COSTA et al., 2016). Assim, o bacupari (*Garcinia gardneriana*) é fruto do bacuparizeiro, pertencente à família da *Clusiaceae*. Os seus frutos são bagas de coloração alaranjada a esverdeada, medindo de 3 a 4 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, apresentam frutos saborosos, e bem apreciados na região amazônica, sendo comumente consumidos *in natura* (PINTO, 2013).

O tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), também conhecido como tucumã-da-Amazônia ou tucumã-do-Pará, são frutos que possuem coloração amarelo-alaranjado, ricos em fibras, vitamina A, ácidos graxos saturados e lipídios (SINGH, 2015; SILVA, 2016). E a pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*) é um fruto que faz parte da alimentação da população do Norte do país, é da família das palmáceas, rica em carboidratos, lipídios e carotenóides biodisponíveis (SINGH, 2015).

Esses frutos podem ser potenciais fontes para o isolamento de microrganismos probióticos e para sua aplicação, como, por exemplo, alimentos funcionais. Os alimentos funcionais contendo microrganismos probióticos possuem objetivos múltiplos como: função nutritiva, podem melhorar as condições gerais do organismo auxiliando no sistema fisiológico, atuam na redução do colesterol e na prevenção de algumas doenças (CONTRERAS-RODRIGUEZ et al., 2020; GURPILHARES, 2019).

Dentre os microrganismos probióticos já amplamente estudados, leveduras vêm ganhando destaque. O que levanta a questão de saber se outras espécies de levedura possuem propriedades probióticas (AMORIM et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2022). E, dessa forma, estudos têm investigado o potencial probiótico de espécies de leveduras não-*Saccharomyces* (KODCHASEE et al., 2023).

Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo identificar e avaliar o potencial probiótico de linhagens de leveduras isoladas dos frutos bacupari, tucumã e pupunha.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leveduras com potencial probiótico

A preocupação da população com a saúde e estética vem aumentando no decorrer dos últimos anos (TRIPATHI et al., 2019). Dessa forma, é possível observar a busca dos consumidores por alimentos que ofereçam mais que a função de nutrir, como, por exemplo, alimentos com propriedades probióticas e, conseqüentemente, o interesse da indústria de alimentos, que está em constante evolução e modernização, em criar novos produtos que atendam a demanda de mercado, resultando em um aumento das pesquisas visando escolher novas linhagens com características probióticas (CHUGH; ELDIN et al., 2020).

A partir de buscas bibliográficas, é possível observar um aumento progressivo da importância das leveduras no âmbito comercial. Esse progresso é creditado à extensa diversidade de aplicações industriais das leveduras, as quais têm sido utilizadas em setores variados, tais como a indústria alimentar, veterinária, cosmética, farmacêutica e dentre outros (RAHEEM et al., 2021; PUEBLA-BARRAGAN; REID, 2021; ZHOU et al., 2020; ZHAO et al., 2019). O aumento do interesse por essas leveduras é principalmente atribuído às suas propriedades fermentativas, probióticas e capacidade de inibição do crescimento de outros microrganismos (GALLI et al., 2022; MALKA et al., 2021).

As leveduras são microrganismos que pertencem ao reino Fungi e apresentam características morfológicas distintas. Elas possuem uma parede celular rígida, formato oval ou esférico, núcleo organizado com membrana nuclear e são capazes de se reproduzir tanto por métodos sexuais quanto assexuais, utilizando células especializadas conhecidas como esporos e brotamento (MOREIRA et al., 2019).

Dentre os inúmeros gêneros e espécies de leveduras já registradas, as do gênero *Saccharomyces* sp. merecem destaque especial devido ao seu amplo uso como fermento na indústria cervejeira. Em particular, a espécie *S. cerevisiae*, comumente conhecida como "levedura de cerveja" ou até mesmo "levedura de padeiro", devido à sua aplicação na indústria de panificação (PONTES et al., 2020).

A espécie *S. cerevisiae* é uma das áreas de estudo mais amplamente investigadas entre os organismos eucarióticos, devido à sua natureza unicelular, o que significa que suas funções biológicas compartilham semelhanças com a maioria dos outros eucariotos (PARAPOULI et al., 2020). Um aspecto adicional de destaque é a *S. cerevisiae* var. *boulardii*, que atualmente é

a única levedura probiótica disponível comercialmente para ser utilizada em alimentos e/ou na indústria farmacêutica para seres humanos (ANSARI et al., 2023; ABASSI et al., 2023).

Segundo o estudo realizado por Kazmierczak-Siedlecka et al. (2020), *S. cerevisiae* var. *boulardii* é capaz de desempenhar efeitos antiinflamatórios e tróficos na mucosa intestinal, além de aderir e eliminar microrganismos enteropatogênicos e suas toxinas, entre outros benefícios. Além disso, observa-se na literatura que tal levedura apresenta evidências promissoras no tratamento de determinadas doenças gastrointestinais (MARTINS et al., 2010; TIAGO et al., 2012; MARTINS et al., 2013). No levantamento bibliográfico realizado por Czeruka e Rampal (2019), observa-se que a administração correta da *S. boulardii* CNCM I-745 em hospedeiros que apresentam algum tipo de doença associada a infecções intestinais, por exemplo, ou mesmo doenças inflamatórias, pode resultar na restauração da microbiota intestinal de forma mais ágil. Dahiya e Nigam (2023), estudaram em seu trabalho a relação entre a restauração da mucosa intestinal, ora desequilibrada devido ao uso exacerbado de antibióticos, a condição equilibrada pelo consumo de alimentos probióticos. Os autores, afirmam que o equilíbrio da microbiota intestinal resulta no bem-estar físico e saúde mental, gerando uma melhor qualidade de vida.

Em 2017, em uma pesquisa desenvolvida por McFarland et al. (2017), onde realizou uma busca bibliográfica, observou-se que ao longo de 39 anos, foram conduzidos cerca de 90 ensaios controlados com a *S. cerevisiae* var. *boulardii*, abrangendo 15 tipos diferentes de doenças. Esses estudos indicaram que *S. cerevisiae* var. *boulardii* é eficaz no tratamento da diarreia aguda em crianças e na prevenção da diarreia associada a antibióticos. Desde a década de 50, essa levedura é comercializada como probiótico na forma liofilizada, sendo utilizada tanto em crianças como em adultos para prevenir e tratar a diarreia (YI et al., 2016). Os principais mecanismos de ação atribuídos a essa espécie são os seguintes: efeitos benéficos na mucosa intestinal, inibição da atividade de patógenos bacterianos e modulação das vias de sinalização do hospedeiro relacionadas a doenças intestinais, tanto inflamatórias como não inflamatórias (RIBEIRO, 2020).

*S. cerevisiae* var. *boulardii* é capaz de remover toxinas do lúmen intestinal, impedir a aderência patogênica, regular a microbiota normal e manter a fisiologia intestinal. Além disso, ela tem a capacidade de restaurar indiretamente o equilíbrio normal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), aumentar os níveis de imunoglobulina A secretora (IgA s) e funcionar como um regulador imunológico, alterando os níveis de citocinas (McFarland, 2010). Esses benefícios mostram a grande capacidade dessa levedura como probiótico.

A administração de probióticos pode ser realizada tanto em forma de medicamento (seja na forma liofilizada ou em cápsulas) auxiliando no tratamento ou prevenção de diarreias, como também por meio de alimentos probióticos, a exemplo: leite fermentado, kefir, kombucha e entre outros, resultando na manutenção da microbiota intestinal. Assim, corroborando com o avanço das pesquisas sobre aplicação de leveduras em produtos probióticos, as leveduras não-*Saccharomyces* apresentam alto potencial na aplicação em diversos produtos (CASSANEGO, 2015). Uma vez que podem reduzir a presença de micotoxinas no intestino e/ou em alimentos, são capazes de produzir vitaminas e normalmente são resistentes a antibacterianos, fazendo-se necessário a manutenção da microbiota intestinal em períodos de tratamento (ARÉVALO-VILLENA et al., 2018).

Na Tabela 1 a seguir, estão destacadas as principais espécies de leveduras não-*Saccharomyces* com potencial probiótico já estudadas.

Tabela 1 - Principais leveduras, não-*Saccharomyces* potencialmente probióticas isoladas de diferentes substratos

<b>Nome da espécie</b>	<b>Fonte de isolamento</b>	<b>Referência</b>
<i>Pichia kluyveri</i>	Cacau	Menezes et al. (2020)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Peixe, carne e queijo	Jeong et al. (2022)
<i>Candida vini</i>	Vinícola	Fernandez-Pacheco et al. (2021)
<i>Meyerozyma caribbica 9 C e 9 D</i>	Polpa de abacaxi fermentada	Amorim et al. (2018)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kefir	Merchán et al. (2020)
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Vinícola	Fernandez-Pacheco et al. (2021)
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Destilaria	Fernandez-Pacheco et al. (2021)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Vinícola	Fernandez-Pacheco et al. (2021)
<i>Pichia membranifaciens</i>	Kombucha	Oliveira (2022)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Flores e/ou frutos endêmicos	Fernandez-Pacheco et al. (2021)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Intestino e comida de peixe	Chang et al. (2016)



Uma das características que faz com que haja um avanço nos estudos utilizando leveduras como probióticos é que tais microrganismos são naturalmente resistentes a antibacterianos, visto que o principal mecanismo de ação dos antibacterianos é a adesão a células procariotas, afetando mais especificamente as células de bactérias (NOGUEIRA et al., 2016), e esta é uma característica considerada importante, pois a grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Assim, os efeitos destes microrganismos devem ser basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano (SHRUTHI et al., 2022; SANTOS et al., 2022).

## **2.2 Microbiota intestinal**

A microbiota intestinal é um complexo ecossistema composto por milhões de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal. Essa comunidade microbiana é dinâmica e diversificada, e sua composição pode variar significativamente entre indivíduos e ao longo da vida. Essas variações são influenciadas por diversos fatores, como estilo de vida, idade, dieta e estado de saúde geral (FASSARELLA et al., 2021).

Pesquisas recentes têm evidenciado que a desregulação da microbiota intestinal, também conhecida como disbiose, está associada a uma ampla gama de doenças (KAUR et al., 2021). Entre elas, incluem-se as doenças inflamatórias intestinais, obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Essas descobertas ressaltam a importância de manter um equilíbrio saudável na microbiota intestinal como uma estratégia para prevenir e tratar essas condições (KORF et al., 2022; RUEDA-RUZÁFA et al., 2020; BRYNIARSKI et al., 2019). No entanto, é importante ressaltar que a relação entre a microbiota intestinal e as doenças é complexa e continua sendo estudada em profundidade (KHAN et al., 2019). Dessa forma, mais pesquisas são necessárias para compreender de melhor forma os mecanismos subjacentes e desenvolver abordagens terapêuticas específicas que possam modular a microbiota de forma eficaz.

Entre os componentes da microbiota intestinal, as bactérias têm sido objeto central de pesquisa até o momento (GOMES et al., 2020). No entanto, evidências emergentes apontam para o papel relevante das leveduras, na saúde intestinal (UNDERHILL et al., 2022). As leveduras são microrganismos unicelulares eucarióticos que podem ser encontrados em diversos habitats, incluindo o trato gastrointestinal humano (SHERWANI; BUKHARI, 2022).

Algumas espécies de leveduras têm sido identificadas como potenciais probióticos, essa descoberta é importante, pois destaca a necessidade de ampliar o escopo de estudos microbiológicos para além das bactérias, além disso, compreender a diversidade e o papel funcional das leveduras no ecossistema intestinal pode contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais abrangentes e eficazes, direcionadas à modulação da microbiota visando promover a saúde intestinal (SAMBRANI et al., 2021).

### **2.3 Fontes de isolamento e caracterização de leveduras probióticas**

Em geral, leveduras são microrganismos que estão presentes em uma variedade de habitats, incluindo, entre outros, frutos, flores, folhas, algas, leite e seus derivados, grãos, solos e outros ambientes (MOZZACHIODI et al., 2022; ABID et al., 2022; LAZO-VELEZ et al., 2018). Tais microrganismos são considerados de fácil isolamento, e para isso, são utilizadas técnicas microbiológicas para esse fim, como, por exemplo, o cultivo em meios seletivos (WILSON et al., 2016). O procedimento básico para isolamento envolve suspender uma amostra do substrato desejado em solução salina estéril e, em seguida, semear a amostra em um meio de cultura específico aplicando métodos de semeadura “*Spread plate*” (método por espalhamento/distensão) ou “*Pour plate*” (método por profundidade/disseminação) (CROUS et al., 2009).

Em termos de aplicação biotecnológica, as leveduras apresentam um papel importante, sendo utilizadas em algumas aplicações, como na síntese de enzimas, produção de alimentos fermentados, a exemplo da cerveja, vinho e pão, e como probiótico (KIELISZEK et al., 2019; ADESULU- DAHUNSI et al., 2020). No cenário atual, pesquisas sobre leveduras selvagens apresentam grande relevância, uma vez que podem aperfeiçoar o desempenho dos produtos obtidos por meio de procedimentos biotecnológicos (ALENCAR et al., 2023).

Evidências encontradas na literatura sugerem que o isolamento de leveduras presentes em frutos é promissor, uma vez que a composição nutricional dos frutos, de maneira geral, oferece condições favoráveis para a proliferação de tais microrganismos (SOUSA et al., 2021; CORRÊA, 2019). Os frutos autóctones da região amazônica possuem múltiplos compostos, com potencial para contribuir com o bem-estar humano (CHANG et al., 2018). Devido às suas propriedades nutricionais e biotecnológicas, esse tipo de fruto tem despertado grande interesse de diversos setores da indústria (SANTOS et al., 2018). No estudo realizado por Menezes et al. (2018), um total de 31 linhagens de leveduras derivadas de frutos amazônicos foram isoladas e caracterizadas, e suas capacidades biotecnológicas foram examinadas com rigor científico,

apontando potencialidade para aplicações. No entanto, não foram realizados testes para avaliar o potencial probiótico dessas linhagens.

Como já dissertado anteriormente, dentre os frutos utilizados como fonte de isolamento, os da região amazônica têm ganhado destaque (MENEZES et al., 2018). Estudos recentes apontam o isolamento de leveduras selvagens utilizando os seguintes frutos: tucumã, bacupari e pupunha (SANTOS et al., 2018; MENEZES et al., 2018).

#### **2.4 Identificação de novos microrganismos**

Após a obtenção e isolamento de leveduras de uma fonte específica, segue-se o processo de identificação e classificação desses microrganismos, que pode ser realizado utilizando métodos fenotípicos ou moleculares (ANSARI et al., 2019). Os métodos fenotípicos, embora mais antigos, são menos utilizados atualmente devido à necessidade de profissionais qualificados e ao tempo prolongado exigido em comparação aos métodos moleculares (FRANCO-DUARTE et al., 2019). No entanto, esses métodos ainda são relevantes para pesquisas, pois permitem a caracterização e classificação das leveduras com base em características morfológicas e bioquímicas, usando reações enzimáticas. Freydiere et al. (2018) analisaram vários testes bioquímicos disponíveis comercialmente para a identificação de leveduras, especialmente do gênero *Candida*, e alguns se destacaram por sua rapidez, tempo de execução inferior a 5 horas, e baixo custo. No entanto, esses métodos são mais relevantes em laboratórios, pois requerem reações enzimáticas ou imuno-histoquímicas específicas.

Por outro lado, o método morfológico, utilizado por Miranda et al. (2021), Sousa et al. (2021) e Amorim et al. (2018), envolve a avaliação macroscópica das leveduras após o plaqueamento, levando em consideração a forma, elevação, margem, cor, brilho, textura e tamanho, para classificação dos isolados em morfotipos, bem como a avaliação microscópica (CROUS et al., 2009; KURTZMAN et al., 2010). No entanto, a precisão desse método depende da experiência e qualificação do operador, e variáveis como tempo de armazenamento das amostras, condições de incubação e a expressão variável de características em uma mesma espécie podem afetar os resultados (FRANCO-DUARTE et al., 2019).

Por outro lado, os métodos moleculares analisam o material genético das leveduras isoladas, permitindo a identificação e caracterização do seu DNA, o que possibilita avaliar a variabilidade genotípica dos isolados da mesma espécie (PIETROWSKI, 2011) e compará-los com dados em bancos genéticos internacionais. Esses métodos dependem principalmente de processos automatizados, exigindo recursos tecnológicos mais avançados em comparação com

a intervenção humana, o que resulta em custos mais elevados, embora tenham se tornado mais acessíveis ao longo do tempo, mas também oferecem alta reprodutibilidade e precisão, tornando-os cada vez mais importantes para a pesquisa. Esses métodos exigem inicialmente a extração e isolamento do DNA de cada cultura, seguidos pela amplificação da região de interesse do DNA isolado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (CROUS et al., 2009). Após isso, assim como realizado por Fernández-Pacheco et al. (2021, 2021) e Dey et al. (2017), ocorre o sequenciamento do fragmento amplificado e sua comparação com sequências previamente identificadas e publicadas.

## 2.5 Aplicações biotecnológicas

As leveduras probióticas são principalmente identificadas pelo gênero *Saccharomyces*, com destaque para a espécie *S. cerevisiae* var. *boulardii* (ANSARI et al., 2023). Essas leveduras têm sido amplamente pesquisadas devido às suas propriedades probióticas (SHRUTHI et al., 2022). Tais microrganismos têm apresentado vantagens em aplicações biotecnológicas. A exemplo, Terhaag et al., (2020) em seu estudo demonstrou que leveduras probióticas podem ser amplamente utilizadas na produção de bebidas probióticas não lácteas. A adição de linhagens de *S. cerevisiae* var. *boulardii* em formulações probióticas pode contribuir para a saúde gastrointestinal, ajudando na regulação da microbiota intestinal e melhorando a função imunológica (SIQUEIRA et al., 2021).

Estudos demonstraram que leveduras potencialmente probióticas também são utilizadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais (AZEVEDO et al., 2021; SILVA et al., 2019). *S. cerevisiae* var. *boulardii*, por exemplo, tem sido utilizada no tratamento de diarreias associadas ao uso de antibióticos, síndrome do intestino irritável e doença inflamatória intestinal (ABREU et al., 2020). A capacidade das leveduras probióticas em competir com patógenos, modular a resposta imunológica e fortalecer a barreira intestinal contribui para esses efeitos benéficos (SANTOS et al., 2022).

Além disso, tais leveduras também são valorizadas por sua capacidade de produzir enzimas e compostos de interesse biotecnológico. Como, por exemplo, na produção de enzimas como lipases, proteases e amilases, que encontram aplicação em diferentes indústrias, como a alimentícia, têxtil e farmacêutica (MOUSA et al., 2022; RAGAVAN et al., 2019).

Sua aplicação na produção de alimentos funcionais também é evidenciada, a indústria de alimentos tem explorado as leveduras potencialmente probióticas para a produção de alimentos funcionais, podendo ser utilizados como agentes fermentadores na produção de

iogurtes, queijos, pães e cervejas, podendo conferir benefícios à saúde (TAMANG; LAMA 2022; RAI et al., 2019). Além disso, as leveduras probióticas podem sintetizar e secretar compostos bioativos, como vitaminas do complexo B, antioxidantes e metabólitos de interesse terapêutico, que podem enriquecer os alimentos com propriedades nutricionais adicionais (COMITINI et al., 2023).

A aplicação biotecnológica de leveduras probióticas em alimentos envolve o uso desses microrganismos benéficos para melhorar a qualidade, segurança e valor nutricional dos produtos alimentícios (RIZOU et al., 2022; ARSENE et al., 2021). Ao incorporar leveduras probióticas em alimentos por meio de técnicas biotecnológicas, é possível obter produtos alimentícios com valor agregado em termos de benefícios à saúde (KUNYEIT et al., 2023).

No entanto, é importante ressaltar que o desenvolvimento de alimentos probióticos requer cuidados específicos para garantir a sobrevivência e a viabilidade dos microrganismos durante o processamento, armazenamento e consumo.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral:**

- Identificar e avaliar o potencial probiótico de leveduras isoladas de frutos da região amazônica.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Reativar e purificar as leveduras isoladas a partir dos frutos: bacupari (*Garcinia gardneriana*), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) e pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*);
- Avaliar o potencial probiótico *in vitro* dos isolados obtidos;
- Avaliar os fatores de virulência dos isolados;
- Realizar identificação molecular das leveduras potencialmente probióticas;
- Realizar liofilização das leveduras com potencial probiótico utilizando diferentes crioprotetores.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reativação de leveduras isoladas de diferentes frutos da região da Amazônia Legal

Foram reativadas e purificadas 418 leveduras previamente isoladas dos frutos: bacupari (*Garcinia gardneriana*), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) e pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*), pertencentes ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) localizado na Universidade do Tocantins (RODRIGUES, 2021; OLIVEIRA, 2021). Foi utilizado meio de cultura ágar YPD (1% de extrato levedura, 2% de dextrose, 2% de peptona e 2% de ágar), a 25 °C por 48h. Após o crescimento e a verificação da pureza, as leveduras foram novamente incubadas por 48h a 25 °C, em caldo GYMP (1% de glicose, 0,5% extrato levedura, 0,3% extrato malte e 0,2% fosfato de potássio), e 1 mL desse caldo foi transferido para tubos criogênicos estéreis com adição de 20% de glicerol estéril. Esses tubos foram estocados em ultra freezer a uma temperatura de 80 °C negativos, na Coleção de Microrganismos Carlos Augusto Rosa, presente no Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) da Universidade Federal do Tocantins (FERREIRA et al., 2019).

### 4.2 Avaliação das propriedades funcionais *in vitro* das leveduras isoladas de diferentes frutos da região da Amazônia Legal

#### 4.2.1 Crescimento a 37 °C

Primeiramente, as leveduras isoladas foram coletadas na fase estacionária (18h) de crescimento, inoculadas em caldo YPD e submetidas a temperatura de crescimento de 37 °C pelo período de 48/72h, em banho Maria e em microaerofilia. A escolha da temperatura foi realizada visando atender o objetivo da pesquisa de selecionar leveduras potencialmente probióticas para uso em mamíferos. Após esse período, foi observada a formação de biomassa e turvação do meio de cultura, estas características indicam o crescimento das leveduras a 37 °C. As leveduras que, após esse processo, apresentaram crescimento foram submetidas aos posteriores testes (COUTINHO et al., 2021; REHAIEM et al., 2014).

#### 4.2.2 Tolerância ao ácido estomacal

As linhagens que cresceram a 37 °C foram submetidas ao efeito da exposição às condições simuladas da acidez estomacal na presença de pepsina (3 g/L) e NaCl (5 g/L). As

leveduras foram inoculadas em placas contendo ágar YPD e incubadas a 37 °C por até 48h. Após este procedimento, foram retiradas de 3 a 5 colônias de cada linhagem de levedura e diluídas em 3 mL de solução salina (0,85%). A turbidez da suspensão celular foi ajustada com auxílio da escala de McFarland 5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente, 900µL do caldo YPD com pH ajustado para 1,0 e 2,0 utilizando HCl 1M, foi transferido para tubos do tipo *eppendorff* e adicionados 100µL de suspensão celular já ajustada para escala 5 de McFarland, e incubado a 37°C em *shaker* por 120 min com agitação de 150 rpm. Um controle composto por solução salina estéril submetida às mesmas condições foi utilizado. Foram coletadas alíquotas após 1h e 2h de incubação, repicadas em placas contendo ágar YPD e incubadas novamente a 37°C por 48/72h (COUTINHO et al., 2021; AMORIM et al., 2018). Este experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

#### 4.2.3 Tolerância a sais biliares

Para a realização do teste, foi primeiramente ajustada a concentração celular de cada isolado para uma suspensão com  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, seguindo o padrão da escala de McFarland. Em seguida, 1 mL dessa suspensão foi inoculado em 9 mL de caldo YPD contendo 0,3% de sais biliares (Bacto-Oxgall, Difco®, EUA), conforme descrito por Sánchez et al. (2015) com modificações. As linhagens de leveduras em caldo com sais biliares foram incubadas a 37°C em condições de microaerofilia, utilizando filme plástico para vedação, por períodos de 0, 2, 4 e 6 horas. Após cada período de incubação, uma alíquota de 10 µL dos caldos foi inoculada em placas de Petri contendo ágar YPD. As placas foram então incubadas a 37 °C por até 48h em condições de microaerofilia, vedadas com filme plástico. Após a incubação, o número de células viáveis foi determinado utilizando o contador automático de colônias Flash & Go (IUL Instrumentos, Barcelona, Espanha) (SILVA et al., 2015).

A taxa de sobrevivência foi calculada utilizando a seguinte equação (1), descrita a seguir, conforme aplicado por Bao et al. (2010). Os isolados que apresentaram uma taxa de sobrevivência igual ou superior a 80% durante o tempo de incubação foram considerados aptos para os próximos testes (Bao et al., 2010).

Equação 1:

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

Onde N1 corresponde à contagem de células viáveis após 6h de incubação e N0 corresponde ao tempo 0h de incubação. Todo o experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

### 4.3 Resistência a antifúngicos

A resistência a antifúngicos foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Augustusco (2022) com adaptações. As leveduras que sobreviveram aos testes anteriores foram testadas com relação à sua susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B nas concentrações (0,07, 0,5 e 2µg/mL) e fluconazol nas concentrações (4, 64 e 128µg/mL), como soluções controle foram utilizadas nistatina 100.000 UI/mL e solução DMSO a 10% como controle positivo e negativo respectivamente. Os ensaios foram preparados utilizando o método de difusão em ágar, onde foram preparadas placas de petri (140 x 15 mm) contendo ágar YPD. Cada linhagem de levedura foi diluída em solução salina (0,85%) até atingir a escala de McFarland 5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Após isso, cada levedura foi semeada na superfície das placas com auxílio de um *swab* estéril, feitos poços de 5mm, e adicionado 50µl dos antifúngicos e soluções controle. As leveduras foram incubadas a 37°C por 48h. A leitura do teste foi realizada observando a formação de halos de inibição em volta dos poços, estes foram medidos com auxílio de um paquímetro digital (AUGUSCO, 2020; OLIVEIRA et al., 2016). O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

### 4.4 Avaliação do antagonismo contra patógenos

As leveduras sensíveis aos antifúngicos testados foram submetidas a avaliação do antagonismo contra patógenos, realizada utilizando o ensaio de difusão em ágar de dupla camada. Nesta etapa, as leveduras foram cultivadas em ágar YPD a 37 °C por 48h em microaerofilia (SOUSA et al., 2013; COUTINHO et al., 2021). Cada linhagem foi ajustada a escala 5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), posteriormente, foi realizada a técnica de microgota, onde uma alíquota de 10µL foi transferida para placas de petri contendo ágar YPD e incubadas em microaerofilia a 37 °C por 48h.

Para o ensaio de antagonismo, foram utilizadas como indicador linhagens bacterianas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli*



(CDC EDL 1284-ATCC 43893), *Shigella sonnei* (ATCC 11060) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Essas linhagens foram cultivadas em caldo BHI (Difco) a 37°C por 18h sem agitação, após o período de inoculação, cada patógeno foi ajustado a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), adicionado 10µl em tubos de ensaio contendo 3,5 mL de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) semi sólido (0,75% p/v), após este procedimento verteu-se sobre a placa com o crescimento das leveduras e incubadas a 37 °C por 24h em microaerofilia (COUTINHO et al., 2021).

A atividade antagonista foi verificada com auxílio de um paquímetro, pela formação de halo de inibição ao redor dos *spots*. O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

#### 4.5 Teste de capacidade de auto agregação

A capacidade de auto agregação foi avaliada utilizando a metodologia baseada no trabalho de Kos et al. (2003). Os inóculos de cada levedura foram cultivados em caldo YPD e incubados a 37 °C por 24h. Após o período de incubação, as células foram submetidas ao processo de centrifugação a 5.000 rpm durante 10 minutos, à temperatura ambiente, seguidas por duas lavagens com subsequente ressuspensão em 4,0 mL de tampão fosfato salino (PBS - pH 7,2). As suspensões celulares foram homogeneizadas em um agitador tipo vórtex (RODRIGUES, 2018).

As suspensões celulares foram ajustadas para uma densidade óptica inicial (DOinicial) de 0,5 a 600 nm. Os tubos contendo as suspensões foram incubados a 37 °C, sem agitação, por um período de 2h. Após a incubação, a absorbância da camada superior foi medida a 600 nm (DOfinal) utilizando um espectrofotômetro.

A porcentagem de auto agregação de cada levedura foi determinada utilizando a seguinte equação:

Equação 2:

$$\text{Auto Agregação\%} = [1 - (\text{DOfinal}/\text{DOinicial})] \times 100$$

Onde:

DOfinal = Densidade óptica final após duas horas de incubação

DOinicial = Densidade óptica inicial no momento zero da incubação

Tabela 2 - Escores utilizados para interpretação dos resultados da auto agregação

Resultado	Agregação %
-	≤ 60
+	<80 >60
++	≥80

Fonte: Kos et al. (2003).

#### 4.6 Teste de capacidade de coagregação

A preparação das suspensões de leveduras para coagregação seguiu o mesmo procedimento descrito para o ensaio de auto agregação, conforme metodologia de Kos et al. (2003). Foram utilizadas quatro bactérias patogênicas, descritas a seguir: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (CDC EDL 1284-ATCC 43893), *Shigella sonnei* (ATCC 11060) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Para cada microrganismo patogênico, foi realizado um cultivo em caldo BHI e incubado a 37°C por 24h. Em seguida, cada cultura foi centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em tampão PBS (pH 7,2). Posteriormente, foram realizadas diluições com a mesma solução tampão para ajustar a concentração final tanto das leveduras quanto das bactérias a DO<sub>600 nm</sub> = 0,7. Após esse processo, volumes iguais (2,0 mL) de leveduras e de bactérias patogênicas foram misturados em tubos estéreis, homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados a 37 °C durante 2h sem agitação. Em seguida, o sobrenadante da mistura descrita acima (DOMix) e dos tubos controle com suspensões de leveduras (DOlevedura) e bactérias (DOPatógeno) tiveram a absorbância medida a 600 nm. Para determinação da porcentagem de coagregação foi aplicada a fórmula descrita a seguir:

Equação 3:

$$\text{Co-agregação\%} = [1 - \text{DOMix} / (\text{DOPatógeno} + \text{DOlevedura} / 2)] \times 100$$

Onde: DOMix= Densidade ótica da mistura levedura + patógeno;

DOPatógeno= Densidade ótica do patógeno;

DOlevedura= Densidade ótica da levedura.

## 4.7 Fatores de virulência

### 4.7.1 Gelatinase

A detecção da produção de gelatinase foi realizada de acordo com Marra et al. (2007). As leveduras em estudo foram inoculadas em tubos contendo 4 mL de caldo YPD suplementado com 12% de gelatina por 48h a 37°C. Após a incubação, os tubos foram destinados ao banho de gelo por um período de 30 minutos, sem agitação. Foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). O resultado foi interpretado como negativo: meio sólido ou positivo: meio líquido. O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

### 4.7.2 Produção de lipase

A produção de lipase foi realizada de acordo com Barbosa et al. (2010). Alíquotas de 2 µL do sobrenadante bruto de cada cultura foram semeados pontualmente em placas contendo Ágar YPD suplementado com 2g/L de Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e 10g/L de Tween 80 e, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C pelo período de 48h. A atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias. O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

### 4.7.3 DNase

A atividade de DNase foi testada como descrita por Bannerman (2003), com adaptações, utilizando o Ágar DNase (Oxoid, São Paulo, Brasil). Os isolados foram estriados diretamente na placa contendo Ágar DNase e incubados a 37°C por 24h. Após o tempo de incubação a placa foi coberta com ácido clorídrico 1N por 3 min. A formação de halo claro em torno das colônias foi considerada indicativo de resultado positivo. Foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

### 4.7.4 Atividade hemolítica

As linhagens foram testadas quanto à atividade hemolítica segundo Foulquié-Moreno et al. (2003), utilizando Ágar Sangue (7% v/v de sangue de cavalo) e incubação a 37°C por 48h. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma: α-hemólise= linhagens que produziram zonas verdes em torno das colônias; γ-hemólise= não produziram qualquer efeito sobre as placas de Ágar Sangue (foram consideradas não hemolíticas). Linhagens, que

apresentaram zonas de lise de sangue ao redor das colônias, foram classificadas como  $\beta$ -hemólise (hemolíticas). O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

#### **4.8 Identificação molecular de leveduras isoladas de frutos da região da Amazônia Legal**

Todos os isolados que apresentaram potencial probiótico foram identificados com auxílio de técnicas de biologia molecular.

##### **4.8.1 Extração de DNA**

A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo de extração de DNA com clorofórmio: álcool isoamílico. Os isolados foram inoculados em Ágar YPD a 37°C por 48h. Após, foram ressuspensos em 100  $\mu$ L de tampão de lise (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M e SDS 10%), incubados em banho-maria a 65°C por 30 min. Decorrido esse tempo foram adicionados 200 $\mu$ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) aos tubos e posteriormente centrifugados a 14000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi retirado por inversão e aos tubos foi adicionado isopropanol (v/v). Os tubos foram deixados em repouso por 15 min para a precipitação do DNA. Após esse período, os tubos foram novamente centrifugados a 14000 rpm por 10 min e o sobrenadante retirado por inversão; 200  $\mu$ L de etanol 70% gelado foram adicionados aos tubos, mais uma etapa de centrifugação a 14000 rpm por 10 min e o etanol descartado por inversão. Os tubos foram deixados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Concluída essa etapa, o DNA foi ressuspensado em 50  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5 M, pH 8,0) e estocado em freezer a 20 °C negativos (FERREIRA et al., 2019; FERREIRA et al., 2018).

##### **4.8.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**

Os perfis genéticos das leveduras foram obtidos pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os primers NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), que se anelam nos domínios D1-D2 na região do gene 28S que é um gene conservado utilizado para identificar espécies. Essa técnica é utilizada para facilitar a identificação das espécies de leveduras a nível específico. Para a PCR foram utilizados 5  $\mu$ L de tampão 10X e 3,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (Sinapse®), 2  $\mu$ L de dNTP 10 mM (Invitrogen®), 1  $\mu$ L do iniciador NL-1 a 10 pmol e 1  $\mu$ L do iniciador NL-4 a 10 pmol (Sigma®), 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase a 5,0 u/ $\mu$ L (Sinapse®), DNA a 100-300 ng/ $\mu$ L e

água ultrapura para obter volume final de 50 µL. A reação foi realizada sob desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 54 °C por 25 s e extensão a 72 °C por 20 s, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5% a 100 V durante 30 min. O DNA foi corado com solução de *Gelred* e visualizado sob luz ultravioleta por meio de um sistema de captura de imagem (FERREIRA et al., 2019).

#### 4.8.3 Sequenciamento

As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa ACTgene Análises moleculares. As seqüências de DNA foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (FERREIRA et al., 2019).

### 4.9 Propriedades tecnológica

#### 4.9.1 Liofilização e armazenamento das leveduras

A biomassa de levedura a ser submetida ao processo de liofilização foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 min, lavada e ressuspensa em 5mL de água destilada estéril e em seguida, adicionados os seguintes crioprotetores: glicose, quitosana, a qual foi diluída utilizando ácido acético até atingir pH 3 sob agitação constante, e leite desnatado utilizando uma concentração de 10% (p/V), após isso, a mistura foi homogeneizada por agitação em vórtex durante 3 min. A solução resultante foi fracionada em frascos de vidro adequados para liofilização, em volumes de 5 mL.

Os frascos, tipo penicilina, contendo a levedura e a solução crioprotetora foram congelados utilizando nitrogênio líquido (NL 2) seguidos pela liofilização utilizando os procedimentos descritos por Kirsop (1984) e Chang e Elander (1986). O processo de liofilização ocorreu a uma temperatura de -40 °C, durante 46h, utilizando o equipamento Enterprise I (Terroni equipamentos científicos).

Após a conclusão da liofilização, os frascos foram hermeticamente fechados e armazenados sob refrigeração, a uma temperatura de 5 °C, até o momento de utilização. A viabilidade celular foi avaliada antes do congelamento, após o congelamento, 24h da liofilização, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 30 dias realizando-se a diluição das células liofilizadas em solução salina e inoculação em placas de Petri contendo Ágar YPD, a 37 °C por 48h e em seguida realizada a contagem das colônias formadas (VIGANÓ et al., 2012; FREITAS et al.,

2017). Esta parte do experimento foi realizada em triplicata em dois experimentos independentes.

#### **4.10 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey ao nível de confiança de 95%, utilizando o *software* estatístico Sisvar.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Caracterização morfológica das leveduras isoladas de diferentes frutos da região da Amazônia Legal**

Um total de 418 linhagens de leveduras foram submetidas ao processo de reativação, dessas, 321 apresentaram crescimento e viabilidade, e seguiram para etapa de verificação da pureza e caracterização morfológica, resultando em uma perda de 23,21% (97), que pode ser justificada pelo tempo que as leveduras estavam acondicionadas e a mudança de temperatura devido a quedas de energia nas dependências da Universidade. Além disso, leveduras, como qualquer outro microrganismo, tendem a perder viabilidade após o armazenamento prolongado devido a várias razões, a exemplo do envelhecimento celular, danos causados ao DNA, estresse oxidativo, condições inadequadas de armazenamento e o acúmulo de subprodutos metabólicos tóxicos, os quais podem afetar sua capacidade de reprodução e atividade metabólica. No

entanto, é possível minimizar a perda de viabilidade por meio de boas práticas de armazenamento e técnicas de preservação adequadas (CASTRO et al., 2020; HAS et al., 2020).

Os resultados desta etapa estão apresentados na Tabela 3, e conforme as características observadas, pode-se constatar diferença entre cada característica morfológica

A tabela apresentada a seguir, representa as características da forma das colônias, o formato que predominou foi a circular para todos os isolados, representando 48,31% (57), 62,18% (97) e 91,49% (43) das leveduras isoladas dos frutos pupunha, tucumã e bacupari, respectivamente. Em relação à margem, 43,59% (68) e 95,74% (45) das leveduras isoladas do tucumã e bacupari apresentaram margem de característica inteira, somente os isolados da pupunha apresentaram divergência, correspondendo a 51,69% (61) a característica ondulada. Por outro lado, quanto ao tipo de elevação, pode-se observar que a predominância do tipo de elevação plana prevaleceu nas leveduras do tucumã (LTC) e nas leveduras da pupunha (LPC), já nas leveduras do bacupari (LBC) prevaleceu o tipo elevada.

Segundo a tabela a cor a branca foi a de maior ocorrência em todos os isolados, o aspecto opaco foi predominante nos isolados LTC e LPC, enquanto, para os isolados LBC a predominância foi do aspecto brilhante, com relação ao formato celular, o ovoidal foi predominante em todos os isolados. Os tamanhos das colônias variaram entre 0,2 - 0,5 cm, para os isolados dos três frutos.

Tabela 3 - Referente às características morfológicas, forma, margem, elevação, cor, aspecto, formato celular e tamanho das leveduras isoladas dos frutos tucumã, pupunha e bacupari.

Leveduras	Características (%)											
	Forma		Margem		Elevação		Cor		Aspecto		Formato	Tamanho
	Circular	Inteira	Ondulada	Plana	Elevada	Branca	Opaco	Brilhante	Ovoidal	0,2 - 0,5 cm		
LTC	62,18	43,59	-	57,05	-	96,79	59,62	-	65,38	100,00		
LPC	48,31	-	51,69	70,34	-	98,31	94,92	-	50,00	100,00		
LBC	91,49	95,74	-	-	80,85	78,72	-	85,11	82,98	100,00		

LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC: leveduras isoladas do bacupari. (-) = não se aplica.

Moreira e colaboradores (2015) em seu estudo sobre análise dos parâmetros morfológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol obtiveram resultados semelhantes quanto às características cor e margem. De forma geral, a maioria das leveduras eram macroscopicamente brancas e possuíam margens inteiras. No estudo sobre leveduras selvagens, isoladas do caldo de cana com perfil para produção de enzimas, realizado por Barbosa e colaboradores (2019) mostra que houve uma diferença quanto ao tamanho das colônias dos isolados, na faixa entre 0,1 a 1 cm. De forma simplista, as características morfológicas representam um dado importante, possibilitando a observação da diversidade entre as leveduras, as quais estão diretamente ligadas ao comportamento morfológico, fisiológico e bioquímico (MOREIRA et al., 2015).

Dessa forma, com base nas características macroscópicas e microscópicas pode-se observar diferença entre os isolados (LTC, LPC e LBC), porém, se faz necessário a averiguação

das características fisiológicas e/ou bioquímicas, além disso, para assegurar a correta identificação das leveduras estudadas é imprescindível a realização de testes moleculares.

## 5.2 Crescimento a 37 °C das leveduras isoladas de diferentes frutos da região da Amazônia Legal

As 321 leveduras reativadas foram submetidas a temperatura de 37 °C por 48h, no qual foi possível observar que 85,91% (130) das leveduras isoladas do tucumã apresentaram capacidade de crescimento à temperatura testada. Já as leveduras isoladas do bacupari e pupunha apresentaram crescimento em 87,23% (35) e 99,15% (123) respectivamente.

Tabela 4 - Porcentagem de leveduras isoladas dos frutos tucumã, pupunha e bacupari capazes de crescerem a temperatura corporal de mamíferos (37 °C)

Leveduras	Crescimento 37 °C (%)
LTC	85,91
LPC	99,15
LBC	87,23

LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC: leveduras isoladas do bacupari.

Como pode ser observado na tabela 4, 288 leveduras cresceram a 37 °C, e tal resultado pode ser explicado pelas condições nas quais estes microrganismos foram isolados, uma vez que, os frutos utilizados como fonte de isolamento são de clima tropical (quente e seco), como também o processo de fermentação pode ter contribuído para o crescimento de microrganismos nesta temperatura. Uma vez que nem todas as leveduras são capazes de crescer a essa temperatura, algumas espécies podem ser mais tolerantes ao calor do que outras (JOHANSSON et al., 2021). Além disso, fatores como a disponibilidade de nutrientes, pH e outras condições ambientais também podem influenciar o crescimento das leveduras (BENEVIDES; MARINHO,2015)

Oliveira et al. (2021) em sua pesquisa sobre avaliação do potencial probiótico de leveduras isoladas de abacaxi (*Ananas comosus*) obtiveram resultados semelhantes, onde, uma porcentagem considerável dos isolados foram capazes de crescer à temperatura corporal de



mamíferos, observou-se também que os melhores resultados concerniam às leveduras do gênero *S. cerevisiae*.

No trabalho desenvolvido por Menezes et al. (2019), observou-se que das 116 leveduras submetidas a crescimento a esta temperatura, um percentual de 71,55% (83) foi capaz de crescer nesta condição. Tal resultado era esperado, uma vez que as leveduras foram isoladas por meio de fermentação espontânea de alimentos que podem ser acondicionados à temperatura ambiente (20-25°C).

Este teste é importante para avaliar o potencial probiótico de um novo microrganismo, uma vez que, para desempenhar efeitos benéficos, devem ser capazes de sobreviver e se manter viáveis em temperatura corporal de mamíferos (37 °C), e tal característica é considerado um pré-requisito para que os microrganismos probióticos manifestem seus efeitos benéficos no trato gastrointestinal humano (GIL-RODRÍGUEZ et al., 2015; MENEZES et al., 2019).

### **5.3 Resistência a pH ácido**

Como pode ser observado na tabela a seguir, as linhagens das leveduras estudadas foram submetidas a condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI), e um total de 64% (79), 77,69% (101) e 93,33% (33) dos isolados dos frutos pupunha, tucumã e bacupari apresentaram capacidade de sobreviver e permanecer viáveis nas condições testadas de pH 1,0 e 2,0, além da presença de pepsina (3 g/L) e NaCl (5 g/L). Foi utilizada a *S. cerevisiae* var. *boulardii* como controle.

Das leveduras testadas nas condições simuladas do TGI, 213 foram capazes de sobreviver e foram submetidas a testes posteriores. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Santos et al. (2016), no qual avaliou o potencial probiótico de leveduras isoladas de azeitona de mesa.

A capacidade de sobreviver a ambiente ácido é um fator determinante quando o objetivo é a identificação de um novo microrganismo com propriedades probióticas, uma vez que, o pH estomacal varia entre 1,0 - 2,0 (MORAES et al., 2017). Ademais, a exposição prévia *in vitro* de tais microrganismos às condições gástricas é indispensável para discriminar microrganismos que apresentam potencial probiótico. Tais resultados encontrados na presente pesquisa corroboram para o prosseguimento com os demais testes.

Tabela 5 - Percentual das leveduras isoladas dos frutos tucumã, pupunha e bacupari resistentes a ambiente ácido.

<b>Leveduras</b>	<b>Crescimento pH ácido (%)</b>
LTC	77,69
LPC	64,00
LBC	93,33

LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC: leveduras isoladas do bacupari.

A acidez é um dos principais fatores que afeta o desempenho de um probiótico, o ambiente estomacal, caracterizado pela produção de ácido clorídrico, representa a primeira barreira significativa após a ingestão de probióticos. É essencial que os microrganismos probióticos possam sobreviver e alcançar sua função alvo de forma viável e ativa (AZHAR; ABDUL 2019).

Embora o pH do ácido clorídrico secretado no estômago seja de cerca de 0,9, após a ingestão de alimentos, o pH geralmente varia entre 1 a 2 (AZHAR; ABDUL 2019). Portanto, o pH 2 tem sido considerado um valor apropriado para a seleção de leveduras que demonstrem resistência aos ácidos.

O processo de trânsito alimentar através do estômago normalmente requer um período de cerca de 2 a 4h (LINHARES; GEWANDSZNAJDER; PACCA, 2018), por este motivo, foi utilizado o tempo de 2h como tempo final.

#### **5.4 Atividade antifúngica**

Das 213 leveduras testadas quanto a resistência à presença dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B como pode ser observado nas tabelas 6, 7 e 8 que 73,24% (57) foram sensíveis a anfotericina B. Foram utilizados nistatina 100.000 UI/mL como controle positivo e DMSO 10% como controle negativo.

Tabela 6 - Linhagens de leveduras isoladas do fruto tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) submetidas a suscetibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

Leveduras	Antifúngicos						
	Anfotericina B			Fluconazol			Nistatina
	0,07 µg/mL	0,5 µg/mL	2 µg/mL	6 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	1000IU
LTC 44	0±0,0	0±0,0	11,28±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,16±0,2
LTC 31	0±0,0	0±0,0	10,03±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,86±0,2
LTC 24	0±0,0	0±0,0	8,57±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	8,44±0,1
LTC 117	0±0,0	0±0,0	11,09±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,83±0,2
LTC 103	0±0,0	0±0,0	10,69±0,4	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,66±0,1
LTC 55	0±0,0	0±0,0	12,43±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	12,32±0,2
LTC 13	0±0,0	0±0,0	6,58±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	6,45±0,2
LTC 58	0±0,0	0±0,0	10,85±0,5	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,22±0,2
LTC 21	0±0,0	0±0,0	9,83±0,5	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,72±0,1
LTC 66	0±0,0	0±0,0	10,74±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,45±0,1
LTC 104	0±0,0	0±0,0	10,93±0,4	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,79±0,2
LTC 87	0±0,0	0±0,0	12,52±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	12,22±0,3
LTC 62	0±0,0	0±0,0	8,71±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	8,56±0,2
LTC 120	0±0,0	0±0,0	10,33±0,4	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,25±0,2
LTC 128	0±0,0	0±0,0	10,14±0,4	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,95±0,2
LTC 126	0±0,0	0±0,0	9,57±0,4	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,23±0,3
LTC 130	0±0,0	0±0,0	10,17±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,86±0,2
LTC 144	0±0,0	0±0,0	9,84±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,79±0,2
LTC 108	0±0,0	0±0,0	13,57±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	13,47±0,1
LTC 146	0±0,0	0±0,0	11,15±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,86±0,2
LTC 151	0±0,0	0±0,0	11,09±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,98±0,2

LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã. Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições.

Tabela 7 - Linhagens de leveduras isoladas do fruto pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*) submetidas a suscetibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

Leveduras	Antifúngicos						
	Anfotericina			Fluconazol			Nistatina
	0,07 µg/mL	0,5 µg/mL	2 µg/mL	6 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	1000IU
LPC 80	0±0,0	0±0,0	8,29±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	8,1±0,2
LPC 8	0±0,0	0±0,0	11,89±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,82±0,1
LPC 105	0±0,0	0±0,0	11,11±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,09±0,1
LPC 101	0±0,0	0±0,0	11,72±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,69±0,1
LPC 72	0±0,0	0±0,0	10,61±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,46±0,2
LPC 70	0±0,0	0±0,0	11,45±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,41±0,1
LPC 14	0±0,0	0±0,0	9,38±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,03±0,3
LPC 4	0±0,0	0±0,0	9,82±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,59±0,2
LPC 9	0±0,0	0±0,0	9,71±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,62±0,2
LPC 30	0±0,0	0±0,0	11,360,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,2±0,2
LPC 55	0±0,0	0±0,0	9,39±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,09±0,3
LPC 79	0±0,0	0±0,0	13,79±01	0±0,0	0±0,0	0±0,0	13,32±0,1
LPC 60	0±0,0	0±0,0	11,71±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,44±0,2
LPC 58	0±0,0	0±0,0	11,21±,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	11,16±0,2
LPC 39	0±0,0	0±0,0	13±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	12,48±0,3
LPC 91	0±0,0	0±0,0	11,18±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,84±0,2
LPC 35	0±0,0	0±0,0	12,48±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	12,4±0,1
LPC 27.7	0±0,0	0±0,0	9,39±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,2±0,1
LPC 11.3	0±0,0	0±0,0	8,27±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	8,13±0,2
LPC 59.3	0±0,0	0±0,0	10,32±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,29±0,3

Leveduras	Antifúngicos						
	Anfotericina			Fluconazol			Nistatina
	0,07 µg/mL	0,5 µg/mL	2 µg/mL	6 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	1000IU
LPC 15.3	0±0,0	0±0,0	8,06±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	7,91±0,3
LPC 53.3	0±0,0	0±0,0	8,57±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	8,4±0,4
LPC 31.3	0±0,0	0±0,0	9,17±0,4	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,16±0,2
LPC 14	0±0,0	0±0,0	8,98±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	8,76±0,2
LPC 56	0±0,0	0±0,0	9,58±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,38±0,2
LPC 26	0±0,0	0±0,0	10,58±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,44±0,2
LPC 16.3	0±0,0	0±0,0	9,89±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,43±0,1
LPC 35.2	0±0,0	0±0,0	10,14±0,4	0±0,0	0±0,0	0±0,0	9,72±0,1

LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha. Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições.

Tabela 8 - Linhagens de leveduras isoladas do fruto bacupari (*Garcinia gardneriana*) submetidas a suscetibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

Leveduras	Antifúngicos						
	Anfotericina			Fluconazol			Nistatina
	0,07 µg/mL	0,5 µg/mL	2 µg/mL	6 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	1000IU
LBC 1	0±0,0	0±0,0	8,17±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	8,03±0,1
LBC 13.1	0±0,0	0±0,0	7,36±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	7,34±0,1
LBC 17.2	0±0,0	0±0,0	10,84±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	10,6±0,2
LBC 39	0±0,0	0±0,0	7,18±0,3	0±0,0	0±0,0	0±0,0	6,98±0,1

Leveduras	Antifúngicos						
	Anfotericina			Fluconazol			Nistatina
	0,07 µg/mL	0,5 µg/mL	2 µg/mL	6 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	1000IU
LBC 44.1	0±0,0	0±0,0	6,87±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	6,71±0,1
LBC 49.1	0±0,0	0±0,0	6,28±0,2	0±0,0	0±0,0	0±0,0	6,19±0,1
LBC 77.1	0±0,0	0±0,0	6,82±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	6,73±0,2
LBC 93.1	0±0,0	0±0,0	6,29±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0	6,07±0,2

LBC: leveduras isoladas do bacupari. Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições.

Conforme a tabela 6, 21 leveduras apresentaram sensibilidade ao antifúngico anfotericina B na concentração de 2µg/mL, e não apresentaram formação de halo de inibição referente ao antifúngico fluconazol em nenhuma das concentrações testadas. O mesmo foi observado nas tabelas 7 e 8, onde estão apresentados os resultados das leveduras isoladas dos frutos pupunha e bacupari, 28 e 8 das leveduras testadas foram sensíveis a anfotericina B (2µg/mL), e não apresentaram susceptibilidade em nenhuma das concentrações testadas para fluconazol (6µg/mL, 64µg/m e 128µg/mL), respectivamente.

Em contrapartida, Fernández-Pacheco et al. (2021) em sua pesquisa sobre avaliação de segurança de leveduras com potencial probiótico observou que as leveduras isoladas de diferentes alimentos apresentaram menor resistência a fluconazol, o que vai em desacordo com a presente pesquisa. Já Gonçalves et al. (2017), obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde, todas as 20 leveduras analisadas apresentaram resistência a fluconazol e cerca de 17 a anfotericina B.

Realizar testes de resistência a antifúngicos é uma etapa crucial para avaliar a sensibilidade das leveduras a antifúngicos e assim, determinar sua segurança como probióticos. Tais testes possibilitam identificar quais linhagens de leveduras probióticas são mais resistentes ou susceptíveis, ajudando a combater o crescimento excessivo desses microrganismos

patogênicos, são importantes no fornecimento de informações sobre a diversidade genética das leveduras e a capacidade de desenvolver resistência ao longo do tempo (KOSGEY et al., 2019).

Ao realizar esses testes, é possível selecionar linhagens mais adequadas e seguras, colaborando para o desenvolvimento de terapias probióticas mais seguras e eficazes.

### 5.5 Atividade antagonista

Quanto à capacidade antagonista, somente 21,05% (12) das leveduras apresentaram halo de inibição frente aos patógenos testados. Ou seja, das 57 leveduras, 45 não apresentaram formação de halo de inibição, isto é, não foram capazes de apresentar inibição ou redução perante as bactérias patogênicas testadas.

Tabela 9 - Leveduras antagonistas frente a diferentes bactérias patogênicas.

Leveduras	Bactérias patogênica			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella sonnei</i>
C	20,86±0,12a	20,60±0,08a	20,85±0,14a	20,80±0,06a
LBC 13	15,14±0,02b	16,04±0,01b	16,81±0,01a	16,19±0,01b
LPC 15	18,30±0,01a	17,68±0,05a	16,91±0,01a	19,14±0,01a
LBC 17	16,03±0,01b	18,20±0,01a	16,80±0,01a	17,01±0,02a
LTC 24	17,43±0,02a	18,30±0,01a	18,00±0,01a	17,65±0,02a
LPC 27	15,39±0,01b	15,78±0,02b	19,51±0,02a	16,59±0,02ba
LPC 30	16,70±0,02a	17,76±0,01a	17,68±0,08a	17,85±0,01a
LPC 35	17,77±0,01a	16,70±0,01b	17,52±0,01a	14,29±0,01b
LTC 58	14,99±0,01b	16,71±0,02b	17,45±0,04a	17,22±0,03a
LTC 66	15,22±0,01b	16,75±0,02b	17,11±0,01a	15,74±0,02b

Leveduras	Bactérias patogênicas			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella sonnei</i>
LBC 77	17,70±0,02a	18,43±0,02a	20,83±0,02a	18,30±0,01a
LTC 126	20,13±0,08a	18,69±0,02a	17,47±0,06a	17,55±0,04a
LTC 151	19,50±0,03a	16,00±0,01b	16,75±0,03a	16,02±0,06b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições. C = controle (*S. cerevisiae* var. *boulardii*). Médias referentes à formação de halo expressa em mm. LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC: leveduras isoladas do bacupari.

Os resultados expressos na tabela acima, é possível observar que todas as leveduras testadas frente aos enteropatógenos, apresentaram halo de inibição menor que o controle, sendo que a maioria apresentou diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ). Em relação a *E. coli*, as amostras LBC 13, LBC 17, LPC 27, LTC 58 e LTC 66 apresentaram diferença significativa a 5%, entre as demais leveduras e o controle, porém, para as demais bactérias patogênicas, estas leveduras apresentaram diferença estatística significativa, exceto para *S. aureus* e *S. sonnei*. O menor halo de inibição foi apresentado pela amostra LPC 35, a qual apresentou halo de inibição para *S. sonnei* de 14,29mm. Já o maior halo de inibição (20,83mm) foi observado na levedura LBC 77, referente ao patógeno *S. aureus*.

A avaliação da atividade antagonista de uma levedura probiótica é característica importante uma vez que, tais microrganismos podem promover a saúde intestinal, equilibrando a microbiota e inibindo o crescimento de bactérias prejudiciais (SHRUTH et al. 2022). Podendo atuar na prevenção de infecções e melhorar a segurança alimentar (FIJAN et al. 2019). Além disso, a avaliação auxilia na seleção de novas linhagens probióticas mais eficazes para uso em produtos alimentares e suplementos.

Ozlu et al. (2022) em seu estudo sobre caracterização e determinação do potencial probiótico de leveduras isoladas de produtos lácteos, observaram atividade antagônica contra *E. coli*, apresentando zona de inibição de aproximadamente 14mm, demonstrando semelhança

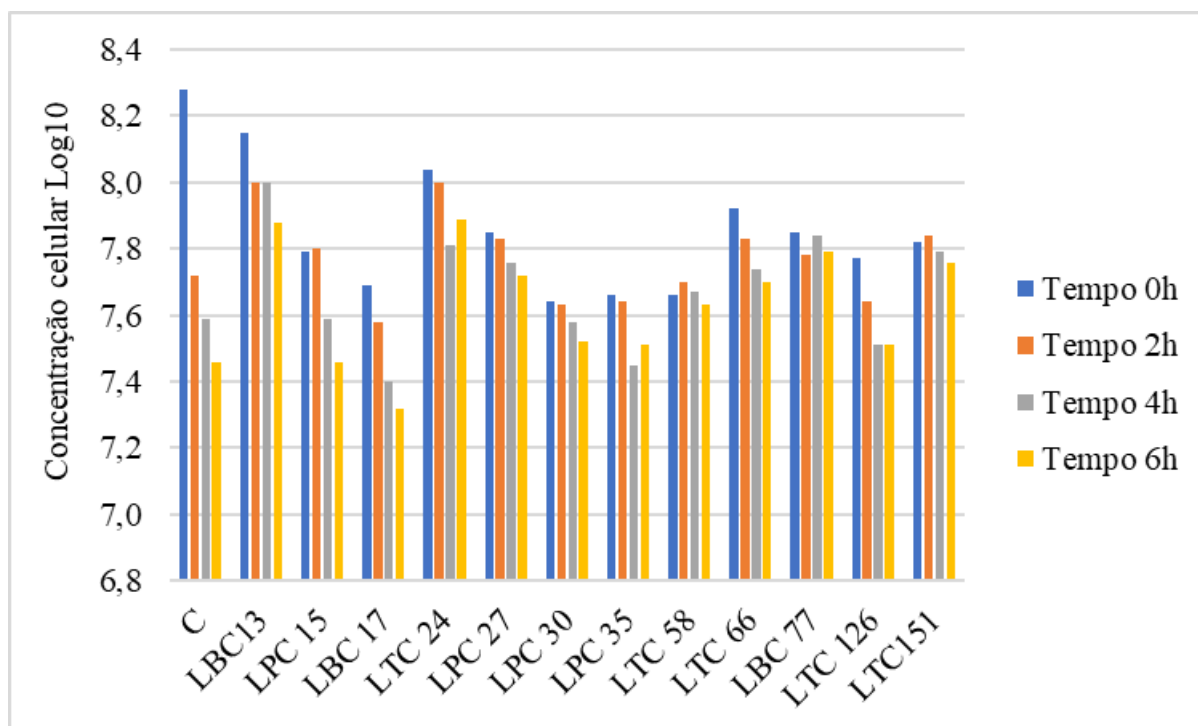


com o resultado encontrado na presente pesquisa. Já no trabalho de Ragavan e Das (2020), onde realizaram estudos *in vitro* sobre o potencial terapêutico de leveduras probióticas isoladas de várias fontes, concluíram que as leveduras testadas foram capazes de inibir o crescimento da *S. typhimurium*, corroborando com os resultados obtidos e expostos previamente ao decorrer do texto.

## 5.6 Tolerância a sais biliares

A figura 1 apresenta as 12 leveduras que apresentaram resistência a presença de 0,3% de sais biliares, durante o período de incubação de 0h a 6h e com a concentração celular de 7,48 a 8,28 log<sub>10</sub> UFC/mL

Figura 1 - Perfil de tolerância dos microrganismos frente aos sais biliares Oxgall na concentração de 0,3% durante os quatro tempos de incubação.



C= *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições. LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC: leveduras isoladas do bacupari.

Na figura 1, pode-se observar que no tempo de 6h as leveduras apresentaram uma diminuição significativa na concentração celular. Esta redução mostrou-se mais expressiva nas amostras LPC 15 e LBC 17 com concentrações de 7,50 e 7,30 log<sub>10</sub> UFC/mL respectivamente,

se comparadas com a concentração celular da *S. cerevisiae* var. *boulardii* (controle) (7,5 log<sub>10</sub> UFC/mL).

A maior taxa de sobrevivência foi observada na levedura LTC 24, na qual apresentou um percentual de 99,50%. Seguida das leveduras LBC 77 e LPC 35, com taxas de sobrevivência de 99,24% e 99,14% respectivamente. Tais resultados podem ser examinados na tabela 10 descrita a seguir.

Tabela 10 - Taxa de sobrevivência das leveduras inoculadas em caldo suplementado com 0,3% de Oxgall durante incubação durante 6h a 37 °C.

<b>Leveduras</b>	<b>Taxa de sobrevivência (%)</b>
C	90,10a
LBC 13	98,16a
LPC 15	95,76a
LBC 17	96,23a
LTC 24	99,50a
LPC 27	98,85a
LPC 30	98,43a
LPC 35	99,14a
LTC 58	99,11a
LTC 66	97,73a
LBC 77	99,24a
LTC 126	97,43a

Leveduras	Taxa de sobrevivência (%)
LTC 151	99,13a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições. LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC: leveduras isoladas do bacupari; C= Controle (*S. cerevisiae* var. *boulardii*).

Ainda na tabela 10, pode ser observado que não houve diferença significativa entre as leveduras estudadas. Realizar testes de tolerância a sais biliares no estudo de novos microrganismos probióticos é importante e precisam ser capazes de sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal, incluindo a presença de sais biliares (DA SILVA et al. 2019). Os sais biliares podem ser prejudiciais e inibir o crescimento e podem afetar a capacidade de colonização dos microrganismos probióticos (VIEIRA et al. 2022).

Ao testar a tolerância aos sais biliares, é possível determinar se os microrganismos podem resistir a essas condições e se eles têm potencial terapêutico (DORTA et al. 2022). Estes testes ajudam na seleção das linhagens mais resistentes e eficazes, garantindo a viabilidade e efetividade dos probióticos no trato gastrointestinal.

### 5.7 Teste de auto agregação

A auto agregação é um atributo importante que indica a capacidade da levedura em aderir às células epiteliais da mucosa gastrointestinal. Essa característica é particularmente desejável em espécies probióticas, pois pode contribuir para a colonização e interação benéfica com o hospedeiro (MUZZOLON, 2018).

Os resultados da análise de auto agregação dos isolados obtidos estão resumidos na Tabela 11. Essa tabela apresenta os valores obtidos para cada levedura testada, refletindo a capacidade de auto agregação de cada uma delas. É importante ressaltar que a auto agregação é expressa como um valor numérico, o qual indica o grau de aderência das leveduras às células leveduriformes. Quanto maior o valor, maior é a capacidade de auto agregativa. Esses resultados são relevantes, pois fornecem informações significativas sobre as leveduras isoladas de diferentes frutos amazônicos, auxiliando na seleção de linhagens promissoras para estudos futuros, entre outras aplicações.

Tabela 11 - Porcentagem da capacidade de auto agregação das leveduras isoladas de diferentes frutos amazônicos

<b>Leveduras</b>	<b>DO600 T0</b>	<b>DO600 T2</b>	<b>Auto agregação (%)</b>	<b>Escore de agregação</b>
C	0,590±0,01	0,127±0,04	78,5a	+
LBC 13	0,550±0,01	0,189±0,02	65,64a	+
LPC 15	0,537±0,01	0,250±0,02	53a	-
LBC 17	0,573±0,01	0,299±0,01	48b	-
LTC 24	0,584±0,01	0,180±0,02	69,2a	+
LPC 27	0,531±0,01	0,293±0,01	44,8b	-
LPC 30	0,573±0,01	0,270±0,05	52,9a	-
LPC 35	0,530±0,01	0,240±0,01	54,7a	-
LTC 58	0,583±0,01	0,330±0,02	43,4b	-
LTC 66	0,530±0,01	0,284±0,01	46,42b	-
LBC 77	0,590±0,01	0,127±0,03	78,5a	+
LTC 126	0,549±0,02	0,247±0,01	55a	-
LTC 151	0,521±0,01	0,273±0,02	47,6b	-

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições.

LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC= leveduras isoladas do bacupari; C= Controle (*S. cerevisiae* var. *boulardii*). T0= 0h, T2= 2h.

Como pode-se observar, na tabela acima, as leveduras LBC 13, LPC 15, LTC 24, LPC 30, LPC 35, LBC 77 e LTC 126 não apresentaram diferença estatística entre si a 5% de significância e apresentam as maiores porcentagem de auto agregação, já as leveduras LBC 17, LPC 27, LTC 58, LTC 66 e LTC 151 diferem estatisticamente das demais leveduras testadas a 5% de significância, além de e representarem as menores taxas de auto agregação obtidas. Com relação à taxa de auto agregação, pode-se observar que os isolados LBC 13, LTC 24 e LBC 77 obtiveram taxas dentro do escore esperado para desempenharem a capacidade de auto agregar-se. A variabilidade na capacidade de auto agregação pode ser atribuída a diversos elementos, tais como, a origem geográfica e fonte na qual foram obtidas e as eventuais disparidades entre as espécies em consideração (SANTOS, 2020).

Resultados semelhantes foram encontrados na pesquisa de Lima et al. (2016), onde avaliaram a capacidade hidrofóbica e de auto agregação de leveduras isoladas após digestão *in vitro* de leite fermentado por grãos de kefir, onde as médias dos percentuais de auto agregação variaram entre 78% e 94% entre os intervalos de incubação de 2 e 4h, indicando que tais leveduras testadas possuem potencial probiótico.

Estes resultados mostram que nem todas as leveduras estudadas foram capazes de apresentar capacidade auto agregativa, além disso, os resultados obtidos indicam que as quais apresentaram tal capacidade são favoráveis para o prosseguimento na pesquisa de microrganismos potencialmente probióticos para utilização em contexto humanos.

## **5.8 Teste de coagregação**

A capacidade de microrganismos probióticos, em geral, em coagregar com bactérias patogênicas é um benefício importante, por exemplo, na prevenção de doenças, pois, tal característica é capaz de formar uma barreira que dificulta a adesão das células microbianas patogênicas no lúmen intestinal (ABBASILIASI et al., 2017). Os resultados da avaliação da capacidade de coagregação das leveduras estudadas no presente trabalho, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da coagregação bacteriana e da porcentagem da capacidade coagregativa entre as leveduras e as bactérias patogênicas testadas

Leveduras	Bactérias patogênicas			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella sonnei</i>
C	71,94a	67,73a	70,13a	69,13a
LBC 13	74,52a	62,94a	74,19a	63,06a
LPC 15	69,2a	54,15a	60,82a	60,99a
LBC 17	45,81b	49,2a	35,58b	42,59b
LTC 24	65,67a	63,02a	70,21a	68,31a
LPC 27	32,11b	28,28b	40,6b	49,87a
LPC 30	43,51b	25,52b	23,92c	41,13b
LPC 35	26,25c	24,31b	36,85b	45,97a
LTC 58	56,18a	49,21a	62,72a	49,27a
LTC 66	54,24a	53,11a	32,27b	51,1a
LBC 77	71,35a	74,74a	69,93a	70,69a
LTC 126	42,98b	64,76a	54,99a	60,8a

Leveduras	Bactérias patogênicas			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella sonnei</i>
LTC 151	52,07a	57,76a	29,39b	42,92b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições. LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC= leveduras isoladas do bacupari; C= Controle (*S. cerevisiae* var. *boulardii*).

As leveduras LBC 13, LPC 15, LTC 24, LTC 58, LTC 66, LBC 77 e LTC 151 em relação à capacidade de co agregação referente a bactéria patogênica *E. coli*, não obtiveram diferença significativa entre si e não diferiram estatisticamente do controle utilizado (*S. boulardii*), a 5% de significância. A coagregação referente a *S. typhimurium*, somente as amostras LPC 27, LPC 30 e LPC 35, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das demais leveduras estudadas e diferiram do controle. Em relação aos resultados obtidos para a capacidade de coagregação em *S. aureus*, as leveduras não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ), do controle, exceto as leveduras LBC 17, LPC 27 e LPC 35, LTC 66 e LTC 151, a levedura LPC 30 apresentou diferença estatística de todas as leveduras inclusive da *S. boulardii* utilizada como controle. Por último, as leveduras LBC 17, LPC 30 e LTC 151 apresentaram diferença significativa entre si e em relação ao controle para coagregação em *S. sonnei*.

Com base nos resultados expostos acima, as leveduras que apresentaram os melhores resultados foram: LBC 13, LTC 24, LTC 58, LBC 77 e LTC 126, ou seja, apresentaram habilidade de coagregação com os enteropatógenos testados. Observou-se ainda que, a habilidade das leveduras estudadas de coagregar com bactérias está diretamente relacionada à capacidade auto agregativa das mesmas, uma vez que, quanto maior a porcentagem de auto agregação, mais elevada foi a aptidão das leveduras para estabelecer uma barreira que possibilite a inibição da entrada de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal. Por este motivo, foi levando em consideração os resultados obtidos no teste de auto agregação, e foram selecionadas apenas as leveduras LBC 13, LTC 24 e LBC 77 para dar continuidade na pesquisa.

Na pesquisa realizada por Menezes et al. (2020), sobre leveduras isoladas de alimentos fermentados brasileiros na proteção contra infecção por bactérias alimentares patogênicas, as leveduras avaliadas também apresentaram capacidade de coagregação frente bactérias patogênicas.

### 5.9 Fatores de virulência

Os isolados que obtiveram escores significativos nos testes de capacidade de auto agregação e coagregação foram submetidos à avaliação dos seguintes fatores de virulência: produção de gelatinase, lipase DNase, além da capacidade de atividade hemolítica.

Tabela 13 - Testes de fatores de virulência das leveduras isoladas dos frutos tucumã e bacupari

Testes	Leveduras			C
	LBC 13	LTC 24	LBC 77	
Gelatinase	-	-	-	-
Lipase	-	-	-	NS
DNase	-	-	-	+
Atividade hemolítica	$\gamma$ -H	$\gamma$ -H	$\gamma$ -H	NS

LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LPC= leveduras isoladas do fruto pupunha; LBC: leveduras isoladas do bacupari. C = *S. cerevisiae* var. *boulardii* e *S. aureus*; (-) = negativo; (+) = positivo;  $\gamma$ -H =  $\gamma$ -hemólise;  $\beta$ -H =  $\beta$ -hemólise. NS = não se aplica.

No teste de hidrólise de gelatina, as leveduras LBC 13, LTC 24 e LBC 77, isoladas dos frutos bacupari e tucumã, respectivamente, foram testadas na presença de 12% de gelatina suplementada no caldo YPD, sendo utilizado *Staphylococcus aureus* como controle positivo. Após o período de incubação, observou-se que, todos os microrganismos descritos não foram



capazes de degradar a gelatina presente no meio de cultura utilizado, ou seja, as leveduras não secretaram as enzimas extracelulares (gelatinases) e o meio permaneceu sólido após o tratamento a frio, indicando um resultado negativo.

No teste de atividade lipolítica, as leveduras foram inoculadas no meio de cultura sólido de YPD suplementado com 2 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 10 g/L de tween 80, para identificar a produção de lipase, a qual é indicada pela presença de halo opaco em volta das colônias. Como exposto na tabela 13, após o período de incubação todos os isolados testados não apresentaram formação de halo, o que indica um resultado negativo para atividade lipolítica.

Já com relação ao teste produção de DNase, os microrganismos foram cultivados em ágar DNase e como controle positivo foi utilizado *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Após o período de incubação, observou-se um resultado negativo em relação ao comportamento das leveduras, ou seja, não foi observada a formação de halos ao redor das colônias estriadas. No teste de atividade hemolítica realizado, constatou-se que nenhum dos microrganismos testados foi capaz de degradar o ágar sangue, indicando que não houve formação de halos ao redor dos inóculos ( $\gamma$ -hemólise). Isso sugere que as linhagens avaliadas não foram capazes de apresentar atividade hemolítica.

Foram observados resultados congruentes na literatura, como exemplificado no estudo conduzido por Pereira et al. (2021), sobre avaliação *in vitro* do potencial probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* DABRP5 isolada de massa de bolo, um alimento fermentado tradicional de Goa, onde, após realizar os testes de segurança, observaram que nenhuma das leveduras testadas apresentaram resultados positivos para os testes de fatores de virulência avaliados (gelatinase, DNase e atividade hemolítica),

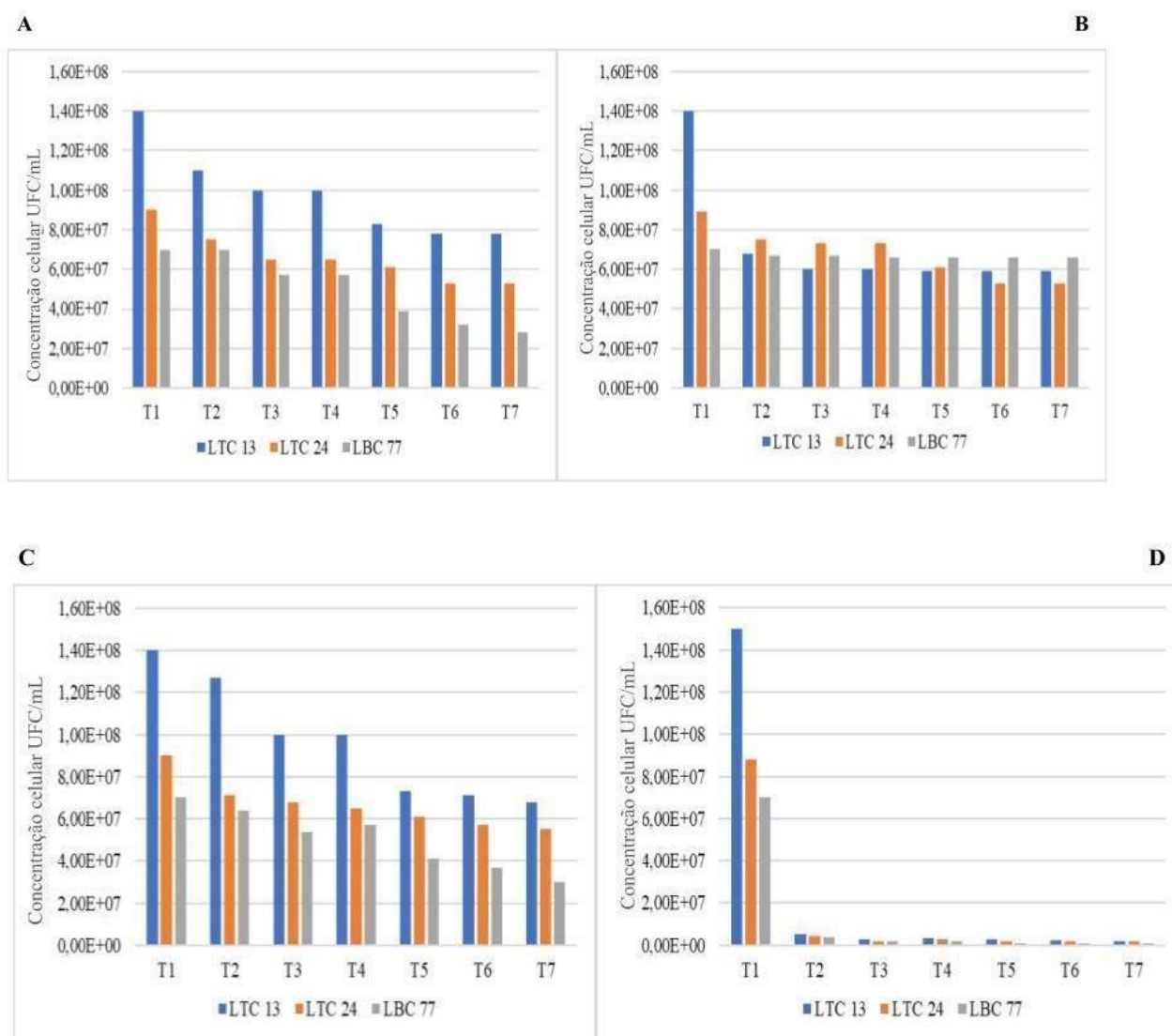
Testar leveduras que possam produzir gelatinase, lipase, DNase e/ou apresentar atividade hemolítica é importante para avaliar possíveis efeitos nocivos na saúde do hospedeiro, para assim, garantir a segurança do uso de leveduras como probióticos, auxiliando na sua caracterização e seleção adequada para usos específicos.

Com base nos resultados apresentados na tabela 13 e mencionados ao longo do texto supracitado, constatou-se que todos os isolados foram negativos em todos os testes. Portanto, todas as leveduras avançaram para as próximas etapas de testes e/ou análises posteriores.

## 5.10 Liofilização e viabilidade celular

A liofilização é uma técnica utilizada para conservar as células de microrganismos e manter suas características e viabilidade. Para esse procedimento, é possível empregar crioprotetores, que são substâncias que protegem as estruturas celulares durante o congelamento, descongelamento e desidratação. (CASAS-GODOY et al., 2021). A figura 2 a seguir apresenta os resultados alcançados no processo de liofilização das leveduras LTC 13, LTC 24 e LBC 77 com e sem os seguintes crioprotetores a 10%: glicose, quitosana e leite desnatado, nos diferentes tempos, antes e depois do congelamento em nitrogênio líquido, após 24h, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 30 dias de liofilização.

Figura 2 - Viabilidade em UFC/mL das três leveduras isoladas dos frutos tucumã e bacupari, utilizando ou não os seguintes crioprotetores a 10%: glicose, quitosana e leite desnatado



LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LBC: leveduras isoladas do bacupari. T1= antes do congelamento; T2= após o congelamento; T3= 24h após liofilização; T4= 7 dias após liofilização; T5= 14 dias após liofilização; T6= 21 dias após liofilização; T7= 30 dias após liofilização. A: glicose 10%; B: quitosana 10%; C: leite desnatado 10% e D: sem crioprotetor. Médias obtidas a partir de experimento realizado em triplicata com 2 repetições

Como pode-se observar nas figuras 2A, 2B, e 2C as leveduras apresentaram uma redução da concentração celular, logo após o congelamento em nitrogênio líquido independente do crioprotetor utilizado. A figura 2D, demonstra que as células dos microrganismos sem crioprotetor sofreram uma redução bastante significativa quando comparadas a concentração celular antes do congelamento demonstrando que, não seriam capazes de se manter viáveis após o processo de liofilização

O uso de crioprotetores nos processos de congelamento tem por objetivo proteger os microrganismos, impedindo a formação de cristais de gelo que possam surgir durante o congelamento, o que levaria ao rompimento da membrana plasmática da célula, e conseqüentemente, à uma diminuição da viabilidade celular e a morte do microrganismo.

A levedura LTC 13 foi a que apresentou maior viabilidade mesmo após 30 dias da liofilização. Com relação aos crioprotetores utilizados, o que apresentou melhor proteção das células leveduriformes antes, durante e após a liofilização foi a glicose 10%, seguido do leite desnatado na concentração de 10%. Tal resultado é relevante e promissor, uma vez que, a glicose é um produto de baixo custo e fácil acesso.

Na pesquisa realizada por Diguta et al. (2023), sobre avaliação *in vitro* de linhagens de leveduras com atributos probióticos para uso em aquicultura, o crioprotetor a base de glicose foi um crioprotetor eficiente e apresentou capacidade de preservar as células das leveduras quando comparado com o controle (sem uso de nenhum crioprotetor).

Freitas et al., (2020) observaram que os crioprotetores contendo glicose, trealose e quitosana, na concentração de 10%, apresentaram resultados satisfatórios para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por aproximadamente 60 dias.

A composição do meio empregado no congelamento é uma das condições para o êxito da criopreservação. Os agentes crioprotetores atuam para minimizar o estresse físico e químico causado pelo congelamento e pelo degelo das células (SAEKI et al., 2015; SILVA et al., 2014). Estudos demonstraram que os açúcares no geral, aumentam a tolerância à dessecação em diferentes microrganismos devido à estabilização de membranas e proteínas (TEOTÔNIO et al., 2021; CASTRO et al., 2020; SILVA et al., 2014). No presente estudo, essa relação ficou

evidenciada, uma vez que, a glicose a 10% mostrou ser eficiente para a preservação das leveduras estudadas.

### 5.11 Identificação molecular

As leveduras LBC 13, LTC 24 e LBC 77 foram selecionadas e submetidas para a identificação molecular e subsequente sequenciamento do genoma. Demonstraram uma correspondência genética de 100%, 99% e 98% com as seguintes espécies de leveduras depositadas no banco de dados GenBank: *Meyerozyma carpophila*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*, respectivamente. Como pode ser observado na tabela 14 a seguir.

Tabela 14 - Identificação molecular das três leveduras isoladas do bacupari e tucumã

Levedura	Similaridade	Espécie
LBC 13	100%	<i>Meyerozyma carpophila</i>
LTC 24	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
LBC 77	98%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

LTC= leveduras isoladas do fruto tucumã; LBC: leveduras isoladas do bacupari.

*Meyerozyma carpophila* é uma espécie de levedura, que, segundo a literatura, já foi isolada de outros frutos, a exemplo, na pesquisa realizada por Bastos (2022), sobre Produção de Invertases a Partir de Microrganismos Isolados de Frutos Amazônicos, observou-se que dentre os microrganismos isolados da pupunha, foi identificada a *Meyerozyma carpophila*.

*Meyerozyma guilliermondii* antigamente era conhecida como *Candida guilliermondii*, ou seja, um microrganismo oportunista, porém, ainda não se pode descartá-la uma vez que a mesma passou pelos testes realizados nesta pesquisa. Então, é sugerido realizar novos testes para que possa realmente descartá-la. No trabalho de Resende (2014), foi possível encontrar esta espécie de levedura a partir do isolamento de frutos associados a Macaúba.

Na literatura é possível encontrar estudos os quais evidenciam que *Rhodotorula mucilaginosa* foi isolada de frutos e outras fontes de matriz alimentar, além disso, estudos

comprovam as propriedades probióticas desta levedura (GRONDIN et al., 2015; MACIEL et al., 2013).

## 6. Conclusões

- Das 418 leveduras, no processo de reativação um total de 321 apresentaram crescimento e viabilidade.
- Os resultados obtidos quanto à morfologia das leveduras predominaram a forma circular, margem inteira, elevação plana, aspecto opaco, cor branca e tamanho de 0,2 - 0,5  $\mu\text{m}$ .
- No teste de capacidade de crescimento a 37 °C, das 321 leveduras reativadas, 288 apresentaram crescimento à temperatura corporal de mamíferos.
- Com relação ao teste de resistência a ambiente ácido, 213 sobreviveram às condições simuladas do estômago (presença de pepsina e pH entre 1 e 2).
- Dessas, apenas 57 foram sensíveis a anfotericina B na concentração de 2  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentando sensibilidade ao fluconazol em nenhuma das concentrações testadas.
- Somente 12 leveduras apresentaram atividade antagonista contra os enteropatógenos testados.
- No teste de tolerância a sais biliares, todas as 12 leveduras testadas permaneceram viáveis na concentração de 0,3%.
- Apenas 3 leveduras apresentaram capacidade de auto agregação e coagregação.
- Os isolados LBC 13, LTC 24 e LBC 77 não apresentaram capacidade de produzir lipase, gelatinase e DNase, bem como não apresentaram atividade hemolítica.
- Dentre as leveduras estudadas a que apresentou melhor desempenho após a liofilização foi a LTC 13, utilizando o crioprotetor glicose a 10%.
- Quanto a identificação molecular, todas as três leveduras selecionadas foram identificadas como não-*Saccharomyces*, sendo das seguintes espécies: *Meyerozyma carpophila*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

## 7. Trabalhos futuros

Para melhor apresentação do desempenho das leveduras estudadas, em trabalhos futuros poderia ser realizado os testes *in vivo*, bem como, a aplicação em um alimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABBASI, A. et al. Antigenotoxicity and Cytotoxic Potentials of Cell-Free Supernatants Derived from *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on HT-29 Human Colon Cancer Cell Lines. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2023.

ABREU, Isabel Cristina Mallosto Emerich de. A suplementação diária com *Saccharomyces boulardii* THT 500101 exerce efeito renoprotetor e reduz espécies de bactérias patogênicas em modelo murino de diabetes. 2020.

ALBUQUERQUE, A. P.; RODRIGUES, T. J. A.; NETO, J. L. C.; ROCHA, A. P. T. Utilização de polpa de frutas em pó carregadoras de probióticos como alimento funcional: aspectos gerais e perspectivas. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 24, e2019310, 2021.

ALMEIDA, Silvana de F. et al. Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, v. 49, p. 64-70, 2019.

AMORIM, C. J.; PICCOLI, H. R.; DUARTE, F. W. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. **Food Research International** v.107, 518–527, 2018.

ANSARI, F.; SAMAKKHAH, S. A.; BAHADORI, A.; JAFARI, S. M; ZIAEE, M.; KHODAYARI, M. T.; POURJAFAR, H. Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 457-485, 2023.

ANSARI, Fereshteh et al. Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 457-485, 2023.

AREKEMASE, M. O. et al. The efficacy of extracts of the leaf and bark of cashew plant (*Anacardium occidentale*) on bacterial isolates isolated from banana (*Musa paradisiaca*). **Niger. J. Microbiol**, v. 33, n. 2, p. 4821-4828, 2019.

ARSÈNE, Mbarga MJ et al. The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. **Veterinary World**, v. 14, n. 2, p. 319, 2021.

AUGUSCO, C. A. M. Análise fitoquímica e estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e toxicológica das folhas da *Couroupita guianensis* (Aubl.). **Dissertação**. Palmas/TO. Universidade Federal do Tocantins, 2022.

AZEVÊDO, Mariana Gabriela Dantas de. Expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos em *Saccharomyces boulardii* para tratamento da colite experimental. 2021.

AZHAR, Mohd Akmal; ABDUL MUNAIM, Mimi Sakinah. Identification and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir drink samples from Malaysia. **International Journal of Food Engineering**, v. 15, n. 7, p. 20180347, 2019.

BANNERMAN, T. M. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P. R. Murray (org.), **Manual of clinical Microbiology** Washinton, DC: ASM Press. 2003. P. 384-404.

BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, v. 21, p. 651-656, 2010.

BASTOS, Lunara Thaís Alves de. Produção de invertases a partir de microrganismos isolados de frutos amazônicos. 2022.

BAZIREH, H.; SHARIATI, P.; JAMALKANDI, S. A.; AHMADI, A.; BOROUMAND, M. A. Isolation of novel probiotic Lactobacillus and Enterococcus strains from human salivary and fecal sources. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 597946, 2020.

BENASSI, Vivian Machado et al. Isolation of High Amylase-producing Filamentous Fungi from the Caatinga: Standardization of the Culture Conditions and Amylase Activity from *Penicillium* sp. L1. **Asian Journal of Research in Biochemistry**, p. 1-15, 2022.

BENEVIDES, J. A. J; MARINHO, G.M. Degradação de pesticidas por fungos-uma revisão. *Holos*, Ano 31, Vol. 2, 2015.

BIANCHI, L.; LAGHI, L.; CORREANI, V.; SCHIFANO, E.; LANDI, C.; UCCELLETTI, D.; MATTEI, B. A combined proteomics, metabolomics and in vivo analysis approach for the characterization of probiotics in large-scale production. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 157, 2020.

BRITO, Gabriela Fachine. Seleção e microencapsulação de bactérias ácido-láticas potencialmente probióticas obtidas de frutos do bacupari (*Rheedia gardneriana*). 2021. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Palmas, 2021.

BRYNIARSKI, Mark A.; HAMARNEH, Fares; YACOUB, Rabi. The role of chronic kidney disease-associated dysbiosis in cardiovascular disease. **Experimental biology and medicine**, v. 244, n. 6, p. 514-525, 2019.

CARVALHO, A. V.; BECKMAN, J. C.; MACIEL, R. A.; NETO, J. T. F. Características físicas e químicas de frutos de pupunheira no estado do Pará. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 35, n. 3, p. 763-768, 2013.

CARVALHO, Aparecida Selsiane Sousa et al. Yarrowia lipolytica lipase production in solid state fermentation using Amazon fruit by-products and soybean meal as a substrate. *Catalysts*, v. 13, n. 2, p. 289, 2023.

CASAS-GODOY, Leticia et al. Preservation of non-Saccharomyces yeasts: Current technologies and challenges. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 20, n. 4, p. 3464-3503, 2021.

CASTRO, Helena Carla et al. Uso de crioprotetores para a preservação de coleções microbianas mantidas para PD&I. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 143-156, 2020.

CHUGH, Bhawna; KAMAL-ELDIN, Afaf. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 76-82, 2020.

COMITINI, Francesca et al. Biocontrol and Probiotic Function of Non-Saccharomyces Yeasts: New Insights in Agri-Food Industry. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1450, 2023.

CONTRERAS-RODRIGUEZ, O.; MATA, F.; VERDEJO-ROMÁN, J.; RAMÍREZ-BERNABÉ, R.; MORENO, D.; VILAR-LOPEZ, R.; SORIANO-MAS, C.; VERDEJO-GARCÍA, A Neural-based valuation of functional foods among lean and obese individuals. **Nutrition Research**, v. 78, p. 27-35, 2020.

CORRÊA, P. I. Avaliação de Leveduras no Controle Pós-colheita de Aspergillus sp. em grãos de café. **Tese de doutorado**. Curitiba/PR. Universidade Federal do Paraná. 2019.

COSTA, B. E. T.; SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; FRANÇA, L. F. Comparative study on the quality of oil extracted from two tucumã varieties using supercritical carbon dioxide. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 322-328, 2016.

COSTA, GV da; ROCHA, Waldireny Caldas; FREITAS, ADG de. Microrganismos endofíticos encontrados no fruto da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e seu potencial antimicrobiano. **Scientia Amazonia**, v. 8, p. CB23-CB27, 2019.



COUTINHO, O. P. A. J. et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of the Probiotic Potential of Antarctic Yeasts. **Probiotics Antimicrob Proteins**. 2021 Oct;13(5):1338-1354. doi: 10.1007/s12602-021-09758-8. Epub 2021 Mar 23. PMID: 33759043.

CUI, Binxin et al. Therapeutic potential of *Saccharomyces boulardii* in liver diseases: from passive bystander to protective performer?. **Pharmacological Research**, v. 175, p. 106022, 2022.

CZERUCKA, Dorota; RAMPAL, Patrick. Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 18, p. 2188, 2019.

DA CRUZ, Ivana Beatrice Mânica; BARBISAN, Fernanda; RIBEIRO, Euler Esteves. Bioactive Compounds of Tucuma (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey.). **Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts**, p. 257-270, 2020.

DA FONSECA MACHADO, Ana Paula et al. Brazilian tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare*) fruits: bioactive composition, health benefits, and technological potential. **Food Research International**, v. 151, p. 110902, 2022.

DA SILVA SANTOS, Dayane et al. Caracterização parcial probiótica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho da cidade de Arcoverde—Pernambuco. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 21, n. 1, p. 7-14, 2019.

DA SILVA, Krisle et al. Bactérias endofíticas promotoras de crescimento de plantas em mudas de pupunheira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 57, n. Z, p. 02962, 2022.

DAHIYA, Divakar; NIGAM, Poonam Singh. Antibiotic-therapy-induced gut dysbiosis affecting gut microbiota—brain Axis and cognition: Restoration by intake of probiotics and synbiotics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3074, 2023.

Damián, M.R.; Cortes-Perez, N.G.; Quintana, E.T.; Ortiz-Moreno, A.; Garfias Noguez, C.; Cruceño-Casarrubias, C.E.; Sánchez Pardo, M.E.; Bermúdez-Humarán, L.G. Functional Foods, Nutraceuticals and Probiotics: A Focus on Human Health. *Microorganisms* 2022, *10*, 1065. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051065>

DE AMORIM TRINDADE, Dennia Pires 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, p. 101739, 2022.

DE CÁSSIA SPACKI, Kamila et al. Full Exploitation of Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth): State of the Art and Perspectives. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3175, 2022.

DE MELO, Anely Maciel et al. Identification of bioactive compounds, morphology, and nutritional composition of bacupari (*Garcinia brasiliensis* (Mart)) pulp powder in two stages of maturation—A short communication. **Food Chemistry**, v. 391, p. 133279, 2022.

DE QUEIROZ, José Carlos Eloi; LEITE, José Roberto SA; VASCONCELOS, Andreeane Gomes. Prospecting Plant Extracts and Bioactive Molecules with Antimicrobial Activity in Brazilian Biomes: A Review. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 427, 2023.

DE SOUSA, Ana João Alves Fernandes. **Os Benefícios dos Probióticos e Prebióticos na Saúde e em Estados de Disbiose: Revisão Narrativa**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).

DIGUȚA, Camelia Filofteia et al. In vitro assessment of yeasts strains with probiotic attributes for aquaculture use. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 124, 2022.

DORTA, Claudia et al. Água de coco com potencial probiótico. **Conjecturas**, v. 22, n. 17, p. 843-862, 2022.

ESPÍRITO SANTO, Bruna Larissa Spontoni do et al. Potencial medicinal das espécies de *Garcinia* e seus compostos. **Moléculas**, v. 25, n. 19, pág. 4513, 2020.

FAO; WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. In Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization **Working Group Report**; FAO: Rome, Italy; WHO: Geneva, Switzerland, 2002. (Acessado em 30 de maio de 2022).

FASSARELLA, Marina et al. Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health. **Gut**, v. 70, n. 3, p. 595-605, 2021.

FERREIRA, E. M. S.; MALTA, C. M.; BICALHO, J. O.; PIMENTA, R. S. A safe method to control the anthracnose in papaya. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, 2018.

FERREIRA, E. M. S.; SOUSA, F. M. P.; ROSA, L. H.; PIMENTA, R. S. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. **Extremophiles**, v. 23, n. 1, p. 151-159, 2019.

FIJAN, Sabina et al. Efficacy of using probiotics with antagonistic activity against pathogens of wound infections: an integrative review of literature. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

flowers. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 40309 - 40319 para FONSECA, H. C.; MELO, D. S.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Probiotic properties of lactobacilli and their ability to inhibit the adhesion of enteropathogenic

bacteria to Caco-2 and HT-29 cells. *Probiotics and antimicrobial proteins*, v. 13, p. 102-112, 2021.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R. et al. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 214-229, 2003.

FRANCO, Marcos Fabian Sanabria et al. Microrganismo endofíticos para conservação de produtos hortícolas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e28111225761-e28111225761, 2022.

FRANCO-DUARTE, Ricardo et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms - from past to present. *Microorganisms*, v. 7, n. 5, pág. 130, 2019.

FREIRE, Thayná Thamires et al. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e513101119964-e513101119964, 2021.

FREITAS, Andressa Barella de et al. Ação dos crioprotetores glicose, trealose e quitosana na manutenção da viabilidade de células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* após liofilização. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, p. e-47464, 2020.

GALLI, Viola et al. Selection of yeast and lactic acid bacteria strains, isolated from spontaneous raw milk fermentation, for the production of a potential probiotic fermented milk. **Fermentation**, v. 8, n. 8, p. 407, 2022.

GAVA, C. A. T.; CASTRO, A. P. C.; PEREIRA, C. A.; JUNIOR, P. I. F. Isolation of fruit colonizer yeasts and screening against mango decay caused by multiple pathogens. **Biological Control** 117 137–14, 2018.

GOMES, Fernanda; SANTOS, LORENA CONCEIÇÃO; WELTER, ÁUREA. MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL POR PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA DEPRESSÃO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Singular. Saúde e Biológicas**, v. 1, n. 1, 2020.

GRONDIN, Eric et al. A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 101-108, 2015.

GÜRKAN ÖZLÜ, Birgül et al. Caracterização e determinação do potencial probiótico de leveduras isoladas de produtos lácteos. **Biologia**, v. 77, n. 5, pág. 1471-1480, 2022.

GURPILHARES, D. DE B.; CINELLI, L. P.; SIMAS, N. K.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Marine prebiotics: Polysaccharides and oligosaccharides obtained by using microbial enzymes. **Food chemistry**, v. 280, p. 175-186, 2019.

HAS, Murilo et al. Caracterização morfológica e fisiológica de leveduras submetidas à preservação prolongada por congelamento a -80°C e liofilização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 14, n. 1, 2020.

HEDIN, Karl Alex et al. Effects of broad-spectrum antibiotics on the colonisation of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the murine gastrointestinal tract. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 8862, 2022.

HELMY, E. A.; SOLIMAN, S. A.; ABDEL-GHANY, T. M.; GANASH, M. Evaluation of the potentially probiotic attributes of certain lactic yeasts isolated from buffalo-sweetened Karish cheese. *Heliyon*, v. 5, no. 5, pg. e01649, 2019.

HIBBING, M. E.; FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Revista Microbiologia*. 8, 15–25, 2010.

HILACHUK, Daniele; DE PAULA, Daniel. Monitoramento Tecnológico de Probióticos para Alimentação Humana. **Cadernos de Prospecção**, v. 15, n. 2, p. 362-378, 2022.  
<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i12.11031>.

JEONG, Da Min et al. Genomic features, aroma profiles, and probiotic potential of the *Debaryomyces hansenii* species complex strains isolated from Korean soybean fermented food. **Food Microbiology**, v. 105, p. 104011, 2022.

Johansson, L. et al. Sourdough cultures as reservoirs of maltose-negative yeasts for low-alcohol beer brewing. *Food Microbiology*, v. 94, n. August, p. 103629, 2021.

KAREB, O.; AİDER, M. Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: a critical review. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 2, p. 348-369, 2019.

KAUR, Gagandeep et al. Dysregulation of the gut-brain axis, dysbiosis and influence of numerous factors on gut microbiota associated with Parkinson's disease. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 2, p. 233-247, 2021.

KAŹMIERCZAK-SIEDLECKA, Karolina et al. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: A non-bacterial microorganism used as probiotic agent in supporting treatment of selected diseases. **Current microbiology**, v. 77, p. 1987-1996, 2020.

KHAN, Israr et al. Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 126, 2019.

KOBAYASHI, Kazuki; AOYAGI, Hideki. Microbial community structure analysis in *Acer palmatum* bark and isolation of novel bacteria IAD-21 of the phylum Abditibacteriota (former candidate division FBP). **PeerJ**, v. 7, p. e7876, 2019.

KODCHASEE, P.; PHARIN, N.; SUWANNARACH, N.; UNBAN, K.; SAENJUM, C.; KANPIENGKJAI, A.; SAKAR, D.; SHETTY, K.; ZARNKOW, M.; KHANONGNUCHA, C. Evaluation of Tannin-Tolerant Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Miang for Production of Health Targeted Beverages Using By-Products from Miang Processing. *Journal of Fungi*, v. 9, no. 2, pg. 165, 2023.

KORF, Janelle M.; GANESH, Bhanu P.; MCCULLOUGH, Louise D. Gut dysbiosis and age-related neurological diseases in females. **Neurobiology of disease**, v. 168, p. 105695, 2022.

KOSGEY, Janet Cheruiyot et al. Probiotics as antifungal agents: Experimental confirmation and future prospects. **Journal of microbiological methods**, v. 162, p. 28-37, 2019.

KRAUSOVA, G.; HYRSLOVA, I.; HYNSTOVA, I. In Vitro Evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. *Fermentation* **2019**, 5, 100. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040100>

KUNYEIT, Lohith; RAO, Reeta P.; ANU-APPAIAH, K. A. Yeasts originating from fermented foods, their potential as probiotics and therapeutic implication for human health and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-12, 2023.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 2, p. 172-177, 1999.

LIMA, C. D. L. C., et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 61, p. 266-272, 2009.

MACENA, M. V. da S. .; NASCIMENTO, P. M. R. .; MAYNARD, D. da C. Intestinal dysbiosis and its correlations with repetition candidiasis. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 16, p. e424111638346, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i16.38346. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/38346>. Acesso em: 27 apr. 2023.

MACHADO, Karina. Uso de probióticos en el tratamiento y la prevención de diarrea aguda en niños. **Archivos de Pediatría del Uruguay**, v. 91, n. 1, p. 35-45, 2020.

MACIEL, Natália OP et al. The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 3, p. 201-205, 2013.

MALKA, Orit et al. Cross-kingdom inhibition of bacterial virulence and communication by probiotic yeast metabolites. **Microbiome**, v. 9, p. 1-15, 2021.

MARRA, A., et al. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology**, v. 58, p. 59-65, 2007.

Meire dos Santos Falcão de Lima et al. Avaliação da capacidade hidrofóbica e de auto-agregação de leveduras isoladas após digestão in vitro de leite fermentado por grãos de kefir. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2016, Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2016. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/avaliacao-da-capacidade-hidrofobica-e-de-auto-agregacao-de-leveduras-isoladas-ap?lang=pt-br>> Acesso em: 13 jul. 2023.

MENDONÇA, A. Emprego de *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* no processo de elaboração de cervejas com potencial probiótico. **Monografia**. Bento Gonçalves/RS. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. 2021.

MENEZES, Aline Galvão Tavares et al. Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 280-288, 2020.

MENEZES, Aline Galvão Tavares et al. Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 140, p. 103969, 2020.

MOREIRA, C. S. et al. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 55-63, 2015.

MOUSA, Gamal A. et al. Dietary supplementation with a combination of fibrolytic enzymes and probiotics improves digestibility, growth performance, blood metabolites, and economics of fattening lambs. **Animals**, v. 12, n. 4, p. 476, 2022.

OLIVEIRA, A. D. S. Isolamento e screening de fungos produtores de enzimas hidrolíticas de bacupari (*Rhedia gardneriana*) em fermentação espontânea. 2021. Dissertação

(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Palmas, 2021.

OLIVEIRA, I. A. C. L.; ROLIM, V. A. O.; GASPAR, R. P. L.; ROSSINI, D. Q.; SOUZA, R.; BOGSAN, C. S. B. The technological perspectives of kombucha and its implications for production. **Fermentation**, v. 8, n. 4, p. 185, 2022.

OLIVEIRA, Ícaro Alves Cavalcante Leite de. **Avaliação da interação entre leveduras isoladas de kombucha e bactérias probióticas**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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

PONTES, Ana et al. Revisiting the taxonomic synonyms and populations of *Saccharomyces cerevisiae*—phylogeny, phenotypes, ecology and domestication. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 903, 2020.

PUEBLA-BARRAGAN, Scarlett; REID, Gregor. Probiotics in cosmetic and personal care products: Trends and challenges. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1249, 2021.

RAGAVAN, Mangala Lakshmi et al. Biochemical characterization and enzymatic profiling of potential probiotic yeast strains. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, n. 8, p. 3941-3944, 2019.

RAGAVAN, Mangala Lakshmi; DAS, Nilanjana. In vitro studies on therapeutic potential of probiotic yeasts isolated from various sources. **Current Microbiology**, v. 77, p. 2821-2830, 2020.

RAHEEM, Abdul et al. Modulatory effects of probiotics during pathogenic infections with emphasis on immune regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 616713, 2021.

RAI, Amit Kumar; PANDEY, Ashok; SAHOO, Dinabandhu. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 129-137, 2019.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A. Probiotic properties of yeasts isolated from chicken feces and kefir. **Polish Journal of Microbiology**, 59(4), 257–263, 2010.

RAVAGLIA, Julia Xavier da Silveira. Influência dos probióticos sobre a imunidade de bebês e crianças. 2019.

RAZINATAJ, Mohammad et al. Isolation and Characterization of *Brenneria nigrifluens* Causing Bacterial Shallow Bark Canker of Walnut Trees in Golestan Province, Iran. **Journal of Genetic Resources**, v. 6, n. 2, p. 148-156, 2020.

RESENDE, Alessandra Abrao. Leveduras associadas a frutos da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart): diversidade e caracterização quanto à produção de exoenzimas e fatores de crescimento. 2014.

RIZOU, Eleftheria et al. Amelioration of growth, nutritional value, and microbial load of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) through probiotic supplemented feed. **European Food Research and Technology**, v. 248, n. 3, p. 727-739, 2022.

ROCHA, Rosa. **Probióticos: aplicações, riscos e perspectivas futuras**. 2022. Tese de Doutorado.

RODRIGUES, D. S. Bioprospecção de leveduras autóctones de frutos amazônicos potencialmente produtoras de enzimas aplicáveis na área de alimentos. 2021. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Palmas, 2021.

RUEDA-RUZAFÁ, Lola et al. Opioid system influences gut-brain axis: dysbiosis and related alterations. **Pharmacological Research**, v. 159, p. 104928, 2020.

SAEKI, Erika Kushikawa, Lúcio Pupo Farhat, Érica Almeida Pontes. Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 195-198, 2015.

SAMBRANI, Roshanak et al. Recent advances in the application of probiotic yeasts, particularly *Saccharomyces*, as an adjuvant therapy in the management of cancer with focus on colorectal cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 951-960, 2021.

SANTOS, Joyce Adrielle Silva dos. Efeitos dos probióticos no sistema imunológico de indivíduos com colite ulcerativa: uma revisão bibliográfica. 2022.

SHERWANI, K. F.; BUKHARI, D. A. A. Probiotics in Processed Dairy Products and Their Role in Gut Microbiota Health. In: **Effect of Microbiota on Health and Disease**. IntechOpen, 2022.

SHRUTHI, B. et al. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. **Biotechnology Reports**, p. e00716, 2022.

SHRUTHI, B. et al. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. **Biotechnology Reports**, v. 34, p. e00716, 2022.



SILVA, Andreza Tallyne de Aguiar et al. Eficiência de Diferentes Crioprotetores, Empregados Na Liofilização, Para Preservação de Bactérias Lácticas e Leveduras em Kefir. Blucher **Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 577-578, 2014.

Silva, W. C. da, Silva, E. B. da, Silva, C. O. da, Filho, C. A. P. S., Silva, R. A. da, Pereira, T. J. da S., Chaves, M. V. S., Oliveira, K. L. A., Oliveira, C. S., & Oliveira, T. M. P. de. (2019). A eficácia de agentes probióticos como terapia para a constipação intestinal na prática clínica: uma revisão integrativa. *Unoesc & Ciência - ACBS*, 10(1), 15–22. Recuperado de <https://periodicos.unoesc.edu.br/acbs/article/view/20077>

SINGH, T. C. **Avaliação dos parâmetros físico-químicos e estabilidade de compostos bioativos em óleos de palma e amêndoa de frutos amazônicos**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2015.

SIQUEIRA, Amanda Comelli; CERIOLLI, Pamela Cristina; ARNO, Vitória. Probióticos e sua aplicação nos alimentos: Uma breve revisão bibliográfica. 2021.

SOUZA, N. M. et al. Aspectos morfológicos de leveduras isoladas de frutas e flores. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 40309-40319, 2021.

SPACKI, K. de C. et al. Pupunha (*Bactris gasipaes kunth*): uma revisão. Agricultura e Agroindústria no contexto do desenvolvimento rural sustentável, cap. 28, v. 1, ed. 1, DOI: 10.37885/210805875 2021.

STANISZEWSKI, Adam; KORDOWSKA-WIATER, Monika. Leveduras probióticas e potencialmente probióticas - características e aplicação alimentar. **Alimentos**, v. 10, n. 6, pág. 1306, 2021.

SYAL, P.; VOHRA, A. Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. **International Journal of Microbiology Research**, 5(2), 390–398, 2013.

TAMANG, Jyoti Prakash; LAMA, Sonam. Probiotic properties of yeasts in traditional fermented foods and beverages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 5, p. 3533-3542, 2022.

TAPIA-VÁZQUEZ, Irán et al. Isolation and characterization of microorganisms promoting the growth of psychrophilic and psychrotolerant plants of a high altitude volcanic crater in Mexico. *Microbiological research*, v. 232, p. 126394, 2020.

TENEA, Gabriela N.; ORTEGA, Clara. Genome characterization of *Lactiplantibacillus plantarum* strain UTNGt2 originated from *Theobroma grandiflorum* (white cacao) of

Ecuadorian Amazon: Antimicrobial peptides from safety to potential applications. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 383, 2021.

TEOTÔNIO, Daniela de Oliveira et al. Potentialities of using cryoprotectants in gluten-free frozen dough and microwave baking as an emerging technology. 2021. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, e12410615674, 2021 DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15674>

TERHAAG, M. M.; BERTUSSO, R. F.; PRUDÊNCIO, H. S. Desenvolvimento de Bebidas Probióticas não Lácteas Adicionadas de *Saccharomyces boulardii*: Situação Atual e Perspectivas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, e17491211031, 2020 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409.

TIAGO, F. C. P. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da capacidade de ligação de bactérias patogênicas e não patogênicas em sítios específicos das leveduras *Saccharomyces Boulardii* e *Saccharomyces Cerevisiae* UFMG A-905. 2012.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2012.

TRIPATHI, Abhishek D. et al. Estimates for world population and global food availability for global health. In: **The role of functional food security in global health**. Academic Press, 2019. p. 3-24.

UNDERHILL, David M. et al. Fungal microbiome in inflammatory bowel disease: a critical assessment. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 5, 2022.

VIEIRA, Ana Carolina Alves et al. Potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, p. 32-42, 2022.

ZAMBALDI, Alanna Cristinne Martins Lima. Bioprospecção de bactérias lipolíticas autóctones de frutos amazônicos e aplicação na obtenção de ésteres de ácidos graxos. 2022.

ZHAO, Wenbin et al. Probiotics database: a potential source of fermented foods. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 198-217, 2019.

ZHOU, Zhao et al. Engineering probiotics as living diagnostics and therapeutics for improving human health. **Microbial Cell Factories**, v. 19, p. 1-12, 2020.