

APLICAÇÃO DE DUAS CEPAS DE LEVEDURAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO EM UMA MATRIZ ALIMENTAR

ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH¹; MISAEL GOMES DIAS²; MARCELO ROSADO FURTADO³; EDIANE DEIJALY DOS SANTOS⁴; KETNEN RIEFFEL DAS CHAGAS⁵; PATRICIA SILVA DIAZ⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelabrasch@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – misaelgomesdias7@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marcelorosado2011@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – deijaly@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – riefelketnen@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos, os quais quando administrados em doses corretas, promovem efeitos benéficos para a microbiota intestinal, exercendo um importante papel na saúde humana (SAAD, 2006).

A microbiota intestinal consiste em um conjunto de micro-organismos que habitam o aparelho gastro intestinal, desempenhando um papel fundamental na digestão de nutrientes, produção de vitaminas, regulação do sistema imunológico e proteção contra patógenos (CHULUCK, J. B. G et al, 2023). Além disso, estudos recentes comprovam a relação direta entre uma microbiota intestinal saudável e processos emocionais e cognitivos, modulando neurotransmissores essenciais para o bem-estar mental (Fischer, A. R., & Araújo, H. M. C., 2024).

A *Komagataella Phaffii* (anteriormente *Pichia Pastoris*) é uma espécie de levedura conhecida por sua característica de expressar proteínas heterólogas. Entretanto, estudos recentes (FRANÇA et al, 2015 & GIL DE LOS SANTOS et al, 2018) demonstram o potencial probiótico da levedura, a qual sobreviveu testes gastrointestinais in vitro e in vivo, caracterizando-se como um microrganismo potencialmente benéfico ao ser humano.

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura amplamente utilizada no mercado, a qual tem demonstrado efeitos positivos e promissores no restauro da flora intestinal, sendo vendida comercialmente sob liofilização, amplamente utilizado na medicina como tratamento da diarreia causada pelo *C. difficile* (SURAWICZ, 2003), manutenção do tratamento da doença de Crohn (GUSLANDI et al., 2000), entre outros. Neste estudo, a levedura *S. Boulardii* é utilizada como controle para a viabilidade celular da *K. Phaffi*.

A alta atividade funcional de microrganismos com potencial probiótico no aparelho gastrointestinal permite a aplicação dos mesmos em uma matriz alimentar, com o objetivo de promover benefícios à saúde tais como equilíbrio da microbiota intestinal, fortalecimento do sistema imunológico e prevenção de doenças gastrointestinais, além de atender à demanda crescente por alimentos que promovam saúde e bem-estar. Entretanto, fatores como viabilidade celular, estabilidade durante armazenamento e pH devem ser levados em consideração ao manipular um produto potencialmente probiótico (OLIVEIRA et al, 2002).

Dessa forma, o estudo teve como principal objetivo aplicar a biomassa úmida de *Komagataella Phaffii*, conservada em solução salina, em um suco de uva natural, com a finalidade de avaliar e comparar sua viabilidade celular com a da *Saccharomyces boulardii* por meio de contagem e diluição, ao longo de 28 dias sob condições de refrigeração (4 °C).

2. METODOLOGIA

A levedura *Komagataella Phaffii* cepa X-33 e a levedura *Saccharomyces boulardii* foram fermentadas em biorreator, centrifugadas e armazenadas em solução salina sob refrigeração (4°C).

Sua viabilidade celular foi avaliada 14 dias anteriormente à aplicação, sendo ambas leveduras diluídas, plaqueadas e incubadas.

Foram utilizadas 255g de polpa de uva congelada da marca Polpanorte, adicionado á 495 mL de água estéril, totalizando 750 mL em uma proporção de 500g/L.

Na aplicação da levedura na matriz alimentar, foram inseridos 1g de massa úmida de ambas leveduras, separadamente, a cada 10mL de suco de uva, totalizando 10% de levedura no produto final. O experimento foi realizado em dois grupos (*Komagataella Phaffi*, e o controle *Saccharomyces Boulardii*), no qual cada grupo foi efetuado triplicata.

A viabilidade celular foi avaliada em 5 tempos distintos, zero dias, sete dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias. Para isso, foi efetuada contagem e diluição das amostras, no qual foi coletado 1 mL por amostra, diluído, plaqueado em meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) e incubado a 28°C por 48h, em cada um dos tempos. Além disso, o pH de todas as amostras foi avaliado nos devidos tempos.

Os resultados foram analisados por meio de testes não paramétricos, devido à distribuição anormal dos dados. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, com as seguintes hipóteses: H0 (hipótese nula): as medianas das viabilidades celulares em todos os grupos (tempos) são iguais; H1 (hipótese alternativa): pelo menos um dos grupos (tempos) tem uma mediana diferente. O teste Kruskal-Wallis classifica os dados em todos os grupos e compara as somas dos postos entre eles. Ele gera uma estatística H, que é comparada à distribuição qui-quadrado para calcular o valor de p. No presente caso, a estatística H foi de 0.5345, e o valor de p foi 0.4647. Como o valor de p é maior que 0.05, não há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula, indicando que não houve diferença significativa entre as medianas das viabilidades celulares nos diferentes tempos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade celular foi determinada por UFC/mL, logo após sendo efetuada a contagem e conversão dos resultados em um resultado log, demonstrados na seguinte tabela (Figura 1).

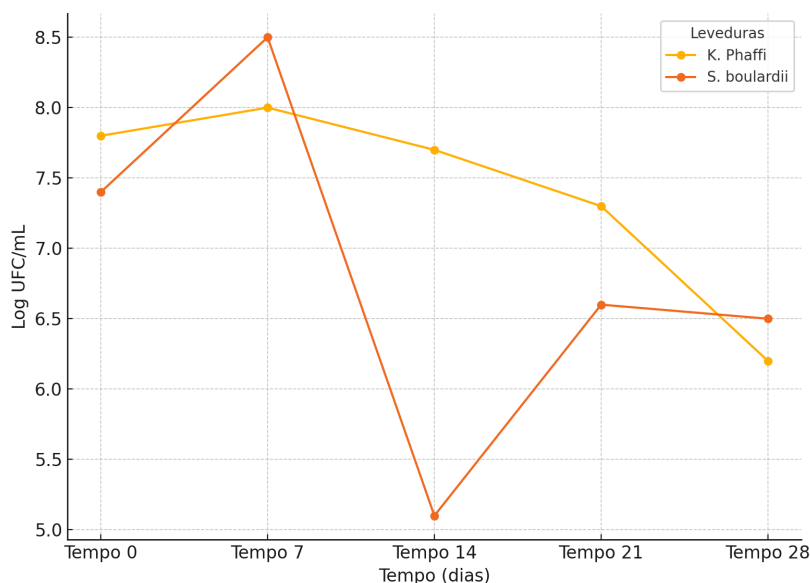


Figura 1. Gráfico da viabilidade celular da *K. Phaffii* e *S. Boulardii* durante 28 dias.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a *K. phaffii* inicia o experimento com um valor superior de viabilidade em comparação a *S. boulardii* no tempo zero (7,8 vs. 7,4 log UFC/mL). Durante o experimento, *K. phaffii* manteve uma viabilidade relativamente estável, com pequenas variações, terminando com 6,2 log UFC/mL no tempo 28 dias. Já *S. boulardii* apresenta uma maior flutuação nos valores, com um pico de viabilidade no tempo 14 (8,5 log UFC/mL), seguido por uma queda acentuada até o tempo 21 (5,1 log UFC/mL) e uma leve recuperação até o final do experimento (6,5 log UFC/mL). Isso indica que a levedura *K. phaffii* demonstra uma maior estabilidade ao longo do tempo.

O aumento de células viáveis no tempo 7 pode ser atribuído ao fenômeno de adaptação inicial das leveduras ao ambiente da matriz alimentar. *Saccharomyces boulardii*, por exemplo, que atingiu um pico de viabilidade nesse período, apresenta uma capacidade elevada de metabolizar açúcares simples presentes no suco de uva, o que pode ter favorecido seu rápido crescimento inicial. No entanto, esse crescimento foi seguido por um declínio devido à exaustão dos nutrientes (VERDUYN et al., 1990), à produção de subprodutos metabólicos que dificultam a manutenção da viabilidade celular (BISSCHOPS et al., 2015), ou ainda ao impacto do estresse oxidativo (JAMIESON et al., 1998).

Em termos de pH, ambas leveduras apresentaram constância na faixa de 3,50. Esse fator favoreceu a multiplicação das leveduras, uma vez que tanto *S. boulardii* quanto *K. phaffii* são ácidos tolerantes, capazes de prosperar em pHs baixos, comuns em sucos de frutas. Essa adaptabilidade é fundamental para o crescimento de *K. phaffii* em processos fermentativos (CEREGHINO et al., 2002).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, que ao introduzirmos *Komagataella Phaffii* em um suco de uva, produzimos uma matriz alimentar ácida com potencial probiótico contendo

células viáveis ao longo de 28 dias de armazenamento sob refrigeração. Embora tenha ocorrido variação nos valores de viabilidade, a levedura apresentou ótima capacidade de adaptação ao ambiente ácido, reforçando seu potencial uso em produtos alimentares com propriedades probióticas, especialmente quando comparada ao controle *Saccharomyces boulardii*, a qual é confirmadamente probiótica. Os resultados deste estudo fornecem uma base para futuras pesquisas sobre a incorporação de leveduras com potencial probiótico em alimentos, com foco na otimização das condições de armazenamento e na manutenção da viabilidade celular, a fim de garantir benefícios à microbiota intestinal humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHULUCK, J. B. G.; MARTINUSSI, G. O. G.; DE FREITAS, D. M.; GUARANÁ, L. D.; XAVIER, M. E. D.; GUIMARÃES, A. C. C. M.; DOS SANTOS, A. M.; BOHNENBERGER, G.; DE LIMA, M. P. G.; ZANONI, R. D. A influência da microbiota intestinal na saúde humana: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 16308–16322, 2023.

CZERUCKA, D., PICHE, T., RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii*: uma levedura probiótica com efeitos promissores na saúde humana. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 26(6), 767-778, 2007.

FISCHER, A. R., ARAÚJO, H. M. C. Microbiota intestinal versus saúde mental: descobertas que podem impactar protocolos de tratamento psiquiátrico. **Debates em Psiquiatria**, volume 14, 1-23, 2024.

FRANÇA, T. B., SOUSA, J. C., & CARNEIRO, J. G. Avaliação de potencial probiótico de *Komagataella phaffii* em ensaios in vitro. **Revista de Biotecnologia**, 18(3), 222-228, 2005.

MARTINS, F.D.S.; BARBOSA, F.H.F.; NICOLE, J.R. O probiótico *Saccharomyces boulardii*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol 9, núm 2, 171 - 181, 2009.

OLIVEIRA, M.N., SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A., SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol 38, núm 1, 2006.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(1), 1-16, 2006.