

# **Avaliação do potencial probiótico de leveduras isoladas de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo**

**Tatiane Cristina Gonçalves de Oliveira**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária para obtenção do Grau de  
Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

**Prof. Doutora Ermelinda Lopes Pereira**

**Prof. Doutora Eliane Colla**

**Bragança  
2016**



**Aos meus pais**  
**Aos meus irmãos**



## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre me dar esperanças e não fazer desistir dos sonhos.

Aos meus pais e aos meus irmãos que nunca mediram esforços para que chegasse até aqui e conseguisse finalizar esta Dissertação de Mestrado, sempre com muito incentivo e apoio. Vocês são o meu melhor sentimento e a minha força tiro de vocês. Tudo foi e sempre será por vocês e para vocês

Minha enorme gratidão à Professora Doutora Ermelinda Pereira do Departamento de Biologia e Biotecnologia, orientadora deste trabalho, por todas as suas críticas e conselhos, por sua confiança depositada e todo seu apoio, com o seu auxílio foi possível a concretização de um sonho. Você foi muito importante nesta fase da minha vida, meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Eliane Colla da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), co-orientadora deste trabalho, pelo auxílio e disponibilidade. A todos os professores do Departamento de Engenharia de Alimentos da UTFPR, cujos ensinamentos transmitidos me permitiram chegar até aqui.

À Professora Doutora Elsa Ramalhosa do Departamento de Produção e Tecnologia Vegetal, por toda ajuda ao longo do desenvolvimento do trabalho, tenho certeza que foram fundamentais para a conclusão do mesmo. Também ao Professor Doutor Luís Nunes do Departamento de Ambiente e Recursos Naturais, pelo auxílio na análise multivariada.

Às funcionárias do Laboratório do Departamento de Biologia e Biotecnologia, Maria Arminda Diz, Maria Fátima Cruz e Maria Isabel Lopes, por toda disponibilidade e disposição em auxiliar nas determinações laboratoriais. Seu auxílio e paciência foram essenciais.

Em especial a todas as pessoas que tive o prazer de conhecer em Portugal e ter o prazer de compartilhar essa fase excepcional de minha vida. A amizade e o apoio de todos foi sem dúvidas, a força para ter chegado ao final deste trabalho. Muito Obrigado de coração.

Aos meus amigos do Brasil, que mesmo de longe nunca mediram esforços para me incentivar, ter a amizade de vocês é muito importante. Muito Obrigada e sempre desejarei muito sucesso para todos.



# Índice Geral

<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>IX</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>XI</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XV</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Fundamentação Teórica .....</b>	<b>7</b>
2.1. Probióticos .....	7
2.1.1. Seleção de microrganismos probióticos .....	9
2.1.2. Leveduras como probióticos.....	11
2.1.2.1. Leveduras potencialmente probióticas isoladas do processo de fermentação de azeitonas de mesa.....	14
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>21</b>
3.1. Origem do material biológico .....	21
3.2. Condições de cultura.....	22
3.3. Avaliação da atividade enzimática .....	23
3.3.1. Catalase .....	23
3.3.2. Protease .....	24
3.3.3. $\beta$ -glucosidase.....	24
3.3.4. Lipase .....	24
3.3.5. Amilase.....	24
3.3.6. Xilanase.....	25
3.4. Avaliação do crescimento .....	25
3.5. Avaliação da atividade antioxidante .....	26
3.6. Avaliação da capacidade de autoagregação .....	27
3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	27

3.8. Simulação <i>in vitro</i> da digestão gástrica e pancreática .....	28
3.9. Análise estatística dos resultados.....	29
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>33</b>
4.1. Atividade enzimática .....	33
4.1.1. Catalase.....	33
4.1.2. Lipase .....	34
4.1.3. Protease.....	34
4.1.4. $\beta$ -glucosidase .....	35
4.1.5. Amilase.....	36
4.1.6. Xilanase .....	37
4.2. Capacidade de crescimento a 37°C.....	37
4.3. Atividade antioxidante .....	40
4.4. Capacidade de autoagregação.....	41
4.5. Atividade antimicrobiana .....	43
4.6. Simulação <i>in vitro</i> da digestão gástrica e pancreática .....	45
4.7. Análise de Componentes Principais (PCA).....	47
<b>5. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros.....</b>	<b>51</b>
5.1. Conclusões.....	51
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros .....	52
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>57</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Espécies isoladas e identificadas molecularmente por Pereira et al. (2015). .....	21
<b>Tabela 2</b> - Códigos qualitativos usados na Análise de Componentes Principais aplicados aos resultados dos ensaios qualitativos.....	30
<b>Tabela 3</b> - Atividade enzimática das leveduras isoladas durante o processo de fermentação da azeitona da cv. Negrinha de Freixo (n=3).....	33
<b>Tabela 4</b> - Valores da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e tempos de duplicação ( $t_d$ ) a 25°C e 37°C para os vários isolados testados; n=2. ....	39
<b>Tabela 5</b> - Capacidade de autoagregação (%) dos isolados ao fim de 2 h, 4 h e 24 h (média $\pm$ desvio padrão; n=3). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre si (p <0,05); e letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p <0,05). ....	43
<b>Tabela 6</b> – Sobrevivência (%) das estirpes aos processos de digestão gástrica, digestão pancreática e total em todo o processo digestivo simulado in vitro (média $\pm$ desvio padrão; n=4). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p <0,05).....	46



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema de uma árvore decisória para a pesquisa de novos microrganismos probióticos. ....	9
<b>Figura 2</b> - Fruto (esquerda) e embalagem de conserva de azeitona (direita) da cultivar Negrinha de Freixo. ....	15
<b>Figura 3</b> - Aspecto macroscópico dos isolados em cultura pura. A: <i>C. tropicalis</i> ; B: <i>P. guilliermondii</i> ; C: <i>R. graminis</i> ; D: <i>P. membranifaciens</i> ; E: <i>C. boidinii</i> ; F: <i>G. reessii</i> . .	23
<b>Figura 4</b> - Solução de DPPH após 30 min. no escuro. O primeiro tubo à esquerda corresponde ao branco e os dois tubos seguintes referem-se às amostras. ....	26
<b>Figura 5</b> -Resultado positivo (esquerda) e negativo (direita) para a atividade de lipase. ....	34
<b>Figura 6</b> - Resultado negativo (esquerda) e positivo (direita) do teste da $\beta$ -glucosidase. ....	36
<b>Figura 7</b> - Resultado positivo (esquerda) e negativo (direita) do teste da amilase. ....	36
<b>Figura 8</b> - Atividade antioxidante (média $\pm$ desvio padrão) das diferentes estirpes analisadas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. ....	41
<b>Figura 9</b> -Biplot das componentes principais entre as variáveis analisadas e as estirpes de leveduras. AA: atividade antioxidante; Ag2h, Ag4h e Ag24h: autoagregação às 2, às 4 e às 24 horas, respetivamente; SG: sobrevivência à digestão gástrica (SG), pancreática(SP) e total (ST). Prot: protease; Xil: xilanase; B-gluc: $\beta$ -glucosidase; Lip: lipase. ....	48



## Resumo

Probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Atualmente a pesquisa de microrganismos probióticos a partir da fermentação da azeitona tem-se centrado nas bactérias ácido-lácticas, sendo escassos os estudos envolvendo leveduras.

No presente trabalho avaliou-se o potencial probiótico de estirpes de leveduras previamente isoladas durante o processo de fermentação natural de azeitona de mesada cultivar Negrinha de Freixo. Foram avaliadas 16 estirpes em relação à atividade enzimática (catalase, amilase, xilanase, protease e  $\beta$ -glucosidase); ao crescimento a 37°C; ação inibitória frente a microrganismos patogênicos; capacidade de autoagregação; atividade antioxidante (utilizando o método de DPPH); e resistência ao aparelho digestivo humano, a partir de uma simulação *in vitro* da digestão gástrica e pancreática.

Os resultados apresentados para a atividade enzimática indicaram que em alguns isolados foi detetado fraca atividade das enzimas protease, xilanase e amilase. Já uma atividade forte de lipase foi observada nas estirpes *Pichia manshurica* e *Saccharomyces cerevisiae* (15A e 15B). Para a enzima  $\beta$ -glucosidase, identificou-se atividade forte em *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida norvegica*, *Pichia guilliermondii* e *Galactomyces reessii*. Relativamente à capacidade de crescimento à temperatura corporal (37°C), três estirpes (*Saccharomyces cerevisiae* 15B; *Candida tropicalis* 1A; e *Pichia membranifaciens* 29A) destacaram-se por apresentar maior taxa específica de crescimento. A capacidade bloqueadora dos radicais livres DPPH foi verificada em 10 estirpes, sendo as estirpes de *S. cerevisiae* as que mais se destacaram dentre as outras. As estirpes *C. norvegica* e *G. reessii* (34A) apresentaram capacidade antifúngica frente ao microrganismo patogênico *Cryptococcus neoformans*. Em relação à capacidade de autoagregação avaliada, as estirpes *S. cerevisiae* (15A), *Candida tropicalis* (1A) e *C. norvegica* (7A) apresentaram ao fim de 24 horas percentagens superiores a 80%. Relativamente à resistência frente às condições presentes no trato gastrointestinal *in vitro*, a estirpe *P. guilliermondii* (25A), destacou-se dentre as demais, por apresentar maior capacidade de sobrevivência em todo o processo digestivo simulado. As estirpes *Candida boidinii* (37A) e *S. cerevisiae* (15A) apresentaram menor

capacidade de sobrevivência nestas condições. Contudo, serão necessários testes adicionais para complementar estes resultados.

**Palavras-chave:** atividade enzimática, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, autoagregação, simulação digestiva *in vitro*.

## Abstract

Probiotics are defined as live microorganisms that confer health benefits to the host when administered in adequate amounts. Currently, the research of probiotic microorganisms from olive fermentation has focused on lactic acid bacteria. However, there are few studies of isolated yeasts from fermentation of table olives.

In the present study, the probiotic potential of previously isolated yeast strains during natural fermentation of table olives from “Cultivar Negrinha do Freixo” was evaluated. A total of 16 yeast strains were evaluated regarding enzymatic activity (catalase, amylase, xylanase, protease and  $\beta$ -glucosidase); growth at 37°C; inhibitory action against pathogenic microorganisms; auto-aggregation capacity; antioxidant activity (using the DPPH method); and resistance to the human digestive tract, from an *in vitro* simulated gastric and pancreatic digestion.

The results presented for the enzymatic activity indicate that in some isolates was detected weak activity of the enzymes protease, amylase and xylanase. Strong lipase activity was detected in *Pichia manshurica* e *Saccharomyces cerevisiae* (15A e 15B). For  $\beta$ -glucosidase enzyme, strong activity in *Rhodotorula graminis* (20A), *Rhodotorula glutinis* (27A), *Candida norvegica* (7A), *Pichia guilliermondii* (25A) and *Galactomyces reessii* (33A) was observed. Regarding growth capacity at body temperature (37°C), three strains (*S. cerevisiae* 15B; *Candida tropicalis* 1A; e *Pichia membranifaciens* 29A) have higher specific growth rate. The blocking capacity of DPPH free radicals was detected in 10 strains, being that *Saccharomyces cerevisiae* (15A e 15B) had better results. *C. norvegica* (7A) and *G. reessii* (34A) showed antifungal ability against *Cryptococcus neoformans*, a pathogenic microorganism. Regarding auto-aggregation ability, *S. cerevisiae* (15A), *Candida tropicalis* (1A) e *C. norvegica* (7A) showed percentages higher than 80% after 24 hours. For resistance against conditions present in the gastrointestinal tract *in vitro*, the strain *P. guilliermondii* (25A) showed higher survivability throughout the simulated digestive process. The strains *Candida boidinii* (37A) and *S. cerevisiae* (15A) showed less ability to survive in these conditions. Additional testing is required to complement these results.

**Keywords:** enzymatic activity, antioxidant activity, antimicrobial activity, auto-aggregation, *in vitro* digestive simulation.



# ***CAPÍTULO 1***

## **Introdução Geral e Objetivos**



## 1. Introdução

Atualmente, a busca por um estilo de vida mais saudável tem levado à procura, por parte dos consumidores, de produtos saudáveis e naturais que conferem benefícios para o organismo. Nesse sentido, tem-se verificado um grande avanço no desenvolvimento dos chamados produtos probióticos.

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como microrganismos vivos que, quando administrados em concentrações adequadas, conferem uma ação benéfica à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2006). O termo probiótico inclui uma grande diversidade de microrganismos, principalmente bactérias, mas também leveduras (Perricone et al., 2014). Contudo, os microrganismos frequentemente utilizados em preparações probióticas são geralmente bactérias provenientes de fontes humanas e/ou animais pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e em menor frequência *Enterococcus* (Peres et al., 2012). O uso destas bactérias tem-se restringido, quase que, exclusivamente, na produção de produtos lácteos fermentados como os iogurtes. No entanto, atualmente, devido ao crescente número de casos de intolerância à lactose a nível mundial, conjuntamente com o efeito desfavorável do colesterol presente em produtos lácteos (Argyri et al., 2013) e ao mercado crescente de consumidores vegetarianos, tem-se verificado a necessidade de se desenvolver produtos probióticos em matrizes vegetais, permitindo a este público o acesso ao uso de formulações probióticas sem quaisquer restrições (Rodríguez-Gómez et al., 2014).

De acordo com Ruiz-Mayono et al. (2008), os produtos fermentados tradicionais podem constituir uma boa base de trabalho para o desenvolvimento de alimentos funcionais do tipo probiótico. Assim a azeitona de mesa obtida através do processo de fermentação natural, baseado na fermentação pela flora natural, principalmente bactérias ácido-lácticas (LAB) e leveduras, pode constituir um alimento probiótico promissor, pela adição de culturas iniciadoras funcionais ou, ainda, como fonte de microrganismos probióticos (Argyri et al., 2013). Com efeito, de acordo com Sourabh et al. (2011), as espécies envolvidas no processo de fermentação poderiam ser utilizadas como culturas protectoras ou probióticas uma vez que não oferecem qualquer risco para a saúde podendo estas ser designadas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

Contudo, nos últimos anos a pesquisa de microrganismos probióticos a partir da fermentação da azeitona tem-se centrado nas bactérias ácido-lácticas (Argyri et al., 2013; Rodríguez-Gómez et al., 2014; Bautista-Gallego et al., 2013; Pessione et al., 2015), sendo escassos os estudos envolvendo leveduras isoladas a partir da fermentação de azeitonas, limitando-se aos estudos de Bautista-Gallego et al. (2011), Silva et al. (2011) e Bonatsou et al. (2015). Porém, existe um grande interesse em encontrar estirpes de leveduras com potencial probiótico devido aos enormes benefícios que estes microrganismos podem proporcionar à saúde humana, como a prevenção e tratamento de doenças intestinais e efeitos imunomoduladores, melhoria da biodisponibilidade de minerais através da hidrólise de fitato, biofortificação de folato e desintoxicação de micotoxinas, devido à ligação à parede celular da levedura (Moslehi-Jenabian et al., 2010). Além disso, as leveduras apresentam capacidade de produzir antioxidantes naturais, tais como carotenóides, ácido cítrico, ácido ascórbico, tocoferóis e glutatona que podem retardar a degeneração oxidativa de substâncias gordas e melhorar a saúde do hospedeiro (Arroyo-López et al., 2012a).

Neste contexto, o presente trabalho pretendeu avaliar o potencial probiótico de leveduras previamente isoladas e identificadas molecularmente por Pereira et al. (2015), ao longo do processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo. Nesse sentido, avaliou-se a atividade enzimática, a capacidade de crescimento a 37°C (temperatura do corpo humano), a capacidade de autoagregação, a atividade antimicrobiana, a atividade antioxidante e ainda a capacidade das estirpes resistirem às condições simuladas *in vitro* do ambiente gástrico e pancreático.

O trabalho encontra-se organizado em 5 capítulos. No primeiro, *Introdução Geral e Objetivos*, faz-se uma breve introdução ao tema e apresentam-se os objetivos do trabalho. No segundo, *Fundamentação Teórica*, abordam-se aspectos relacionados com os probióticos, em especial de leveduras probióticas, relatando os desenvolvimentos científicos na pesquisa de novas fontes de produtos probióticos, com destaque para a azeitona de mesa. No terceiro, *Material e Métodos*, descrevem-se as metodologias utilizadas neste trabalho e os métodos estatísticos aplicados. No quarto, *Resultados e Discussão*, apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, levando em consideração alguns trabalhos já existentes, e no último, *Conclusões*, apresentam-se as principais conclusões deste trabalho e sugerem-se possíveis linhas de trabalho futuras.

# ***CAPÍTULO 2***

## **Fundamentação Teórica**



## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1. Probióticos

Em todo o mundo, procura por alimentos funcionais, que são alimentos que geram efeitos benéficos para a saúde humana e/ou reduzem os riscos de doenças crônicas, para além da função nutricional básica, tem levado à pesquisa e ao desenvolvimento de produtos que contenham microrganismos viáveis que possam beneficiar a saúde e a nutrição humana ao serem ingeridos (Heenan et al., 2001; Macedo et al., 2008).

Os microrganismos probióticos apresentam uma grande gama de efeitos benéficos a quem os ingere, no caso os hospedeiros, tais como controlo da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; resistência frente aos microrganismos patogénicos; diminuição da população de microrganismos patogénicos através da produção de ácidos acético e láctico, bacteriocinas, micocinas e de outros compostos antimicrobianos; digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imunitário; melhoria do trânsito intestinal; e aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (Saad, 2006). Com efeito, vários estudos, como o de Bernardo et al. (2013), confirmaram que crianças recém-nascidas suplementadas com probióticos apresentaram uma diminuição de casos graves de enterocolite necrosante, doença que resulta da interação entre a perda da integridade da mucosa intestinal e da resposta ao hospedeiro, muito perigosa no período neonatal. Outros autores como Souza et al. (2011), concluíram que a ingestão de bactérias probióticas ou outros microrganismos probióticos exerceram efeitos benéficos sobre a microbiota cariogénica, competindo por exemplo com *Streptococcus mutans*, microrganismo presente na microbiota salivar. Denipote et al. (2010) pesquisaram a relação dos probióticos com o cancro de cólon concluindo que os voluntários que receberam bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus acidophilus* e/ou *Lactobacillus casei*, reduziram os níveis de enzimas que convertem substâncias pré-carcinogénicas em carcinogénicas ao nível de suas floras intestinais.

Relativamente aos efeitos benéficos, no qual os microrganismos probióticos podem oferecer, Cichoski et al. (2008) indicam uma contagem maior ou igual a  $10^7$  células viáveis/g ou mL de produto, para que um produto possa ser considerado como

probiótico. Já a FAO/WHO (2003) cita que o mínimo de células viáveis deverá ser de  $10^6$  UFC/g. No entanto, para que seja comprovado tais benefícios é necessário a comprovação dos efeitos primeiramente através de provas científicas *in vitro*, em seguida a confirmação *in vivo* e finalmente a sua validação com os devidos estudos clínicos envolvidos (Peres et al., 2012).

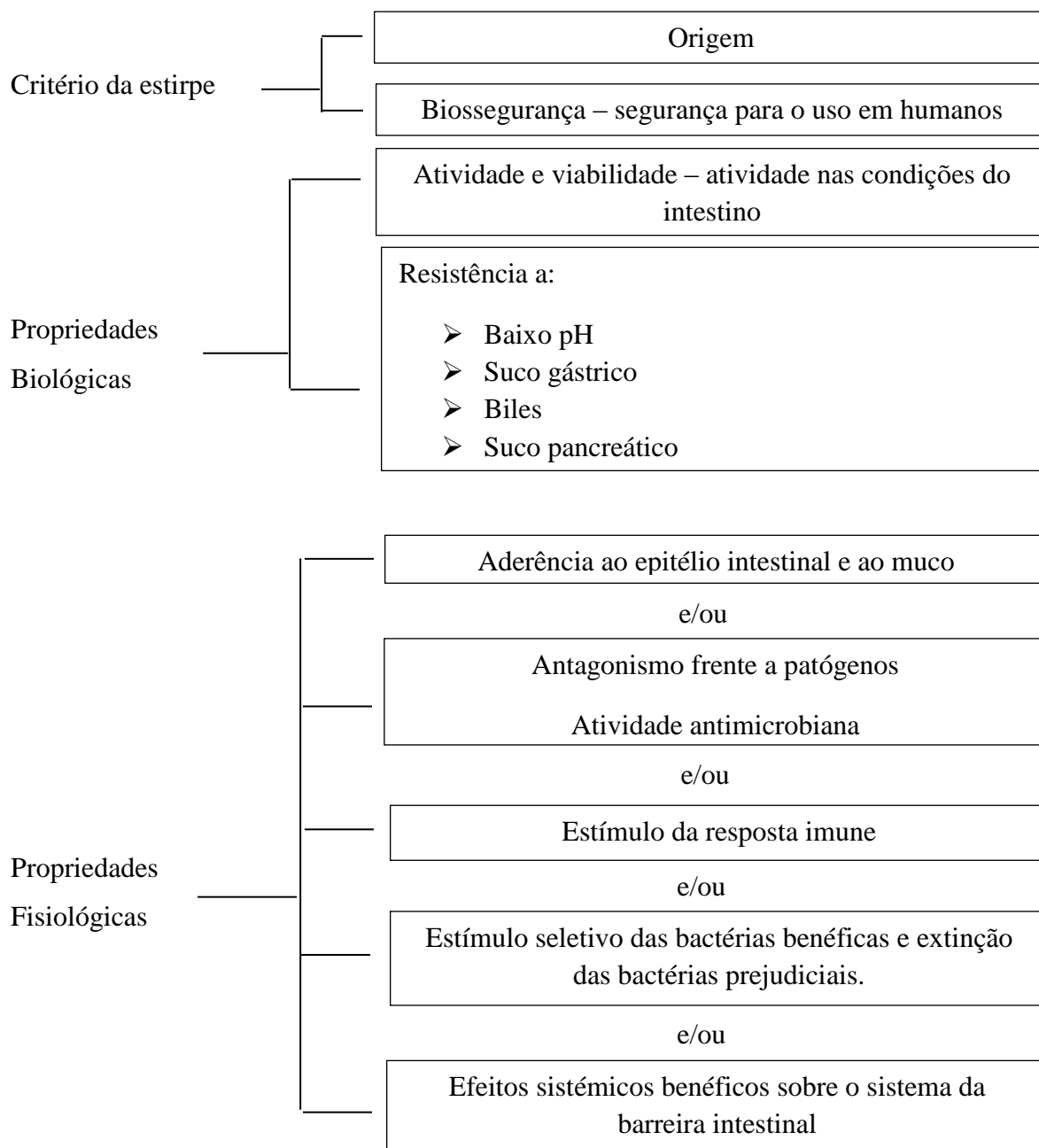
Em todo o mundo o mercado de produtos probióticos vem crescendo logaritmicamente. Especificamente na Europa, o mercado de produtos à base de probióticos é o mais desenvolvido, fazendo com que a renda anual seja em média estimada em 2 milhões de dólares, isso por conter uma enorme gama de produtos com essas características (Furlan et al., 2004).

De entre as culturas probióticas mais utilizadas, destaca-se o grupo das bactérias ácido-láticas (BAL), sendo o género *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os mais encontrados, uma vez que são introduzidos em uma ampla gama de produtos alimentares (Argyri et al., 2013). No entanto, espécies pertencentes aos géneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Propionibacterium* têm sido também consideradas devido aos seus efeitos em promover benefícios à saúde humana (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

A utilização de bactérias ácido-láticas (BAL) como probióticos deve-se ao seu mecanismo de produção de compostos antibacterianos, tais como as bacteriocinas, capazes de inibir o crescimento de bactérias patogénicas (Jatobá et al., 2008), assim como diversos outros benefícios. As bacteriocinas produzidas por BAL apresentam capacidade de ação semelhante a de antibióticos contra microrganismos patogénicos e de diminuir a produção de citocinas pró-anti-inflamatórias (Denipote et al., 2010). Vários autores como Viegas et al. (2010) isolaram BAL de queijo coalho e utilizaram na produção de leites fermentados probióticos, comprovando que mesmo após 40 dias, refrigerado a 8°C, os produtos apresentavam ainda funções probióticas e características sensoriais desejadas. Também, Jatobá et al. (2008) isolaram estirpes de BAL do trato intestinal de tilápia-do-nilo e constataram que a espécie isolada *Lactobacillus plantarum* apresentava um potencial probiótico por ser capaz de colonizar o trato intestinal e melhorar a resposta do sistema imune da tilápia-do-nilo, além de inibir a ação de bactérias patogénicas.

### 2.1.1. Seleção de microrganismos probióticos

Para a seleção de microrganismos probióticos alguns critérios devem ser considerados, bem como os aspectos funcionais e tecnológicos. A Figura 1 apresenta uma árvore decisória proposta por Oliveira et al. (2002), que pode auxiliar na seleção de novos microrganismos probióticos.



**Figura 1** - Esquema de uma árvore decisória para a pesquisa de novos microrganismos probióticos.

**Fonte:** Oliveira et al. (2002).

Em relação aos parâmetros recomendados para que sejam selecionados novos microrganismos probióticos, devemos começar com a identificação da estirpe, saber a sua origem para poder estabelecer uma relação entre a estirpe e o benefício que ela provoca, através da identificação taxonômica dos microrganismos, de testes fenotípicos aplicados com base em características bioquímicas, fisiológicas e enzimáticas (Klein et al., 1998). Por exemplo, Conway (1996), relatou que nem todas as estirpes de *Lactobacillus acidophilus* são as mesmas e que as estirpes bacterianas que podem produzir efeitos desejáveis em produtos alimentares, não precisam necessariamente de ter efeito benéfico para o hospedeiro.

Em termos de segurança dos probióticos é necessário um conjunto de princípios gerais, bem como alguns critérios práticos, para que se possa fornecer indicações sobre um determinado microrganismo com potencial probiótico, no sentido de constatar que o mesmo apresenta baixo risco em relação a patógenos e se não tem associação com qualquer agente etiológico (Moreira, 2013). De acordo com a FAO/WHO (2002), os microrganismos considerados probióticos devem ter ausência de plasmídeos, que confirmam resistência a antibióticos que possam ser transferidos a outras bactérias comensais ou oportunistas.

Em relação às propriedades biológicas, a sobrevivência ao trato gastrointestinal é um dos requisitos mais importantes para a seleção do microrganismo, pois é onde irá ocorrer a prestação de benefícios para a saúde do hospedeiro. Para que isso aconteça, os microrganismos probióticos devem resistir à passagem no sistema digestivo, resistindo às condições extremas, tais como: pH baixo, enzimas gástricas, como a pepsina, e aos sais biliares (Arslan et al., 2015).

Em relação às propriedades fisiológicas dos probióticos, a capacidade dos microrganismos aderirem ao epitélio intestinal é outro requisito importante, pois permite uma maior persistência desses microrganismos no intestino. A capacidade que os microrganismos probióticos apresentam de formar agregados e de aderir à parede intestinal, é conhecida como capacidade de autoagregação (García-Cayuela et al., 2014). Este mecanismo está ligado com o aumento da área de superfície das vilosidades intestinais, favorecendo a formação de uma barreira às bactérias patogênicas, de tal forma que as bactérias sejam excluídas por competição de espaço ou pela produção de compostos, como bacteriocinas, ácidos orgânicos, e peróxido de hidrogênio (Furlan et al., 2004; Moreira, 2013). Este aspeto foi observado por Lima (2014) quando pesquisou a colonização intestinal de lambaris-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* alimentados

com dieta à base de *Saccharomyces cerevisiae*, considerada como probiótico, tendo verificado que a levedura aumentou a área de superfície aparente das vilosidades intestinais e colonizou o intestino do peixe.

Um outro requisito que os microrganismos probióticos deverão apresentar é a habilidade de produzirem compostos com atividades antimicrobianas, tais como bacteriocinas, sendo no caso das bactérias a nisina a mais importante; ácidos orgânicos, como ácido acético e ácido láctico; e peróxido de hidrogénio (Assohoun-Djeni et al., 2016). No caso das leveduras, têm-se observado que algumas espécies apresentam capacidade de libertar compostos com propriedades antimicrobianas, conhecidas como micocinas ou toxinas *Killer*. As micocinas são proteínas ou glicoproteínas extracelulares que atuam no rompimento da membrana celular (Hatoum et al., 2012). Estas substâncias podem exercer os seus efeitos em microrganismos do mesmo género ou espécie, ou de outros géneros. Os autores Gil-Rodríguez et al. (2015) detetaram estirpes de *Saccharomyces* com atividade *Killer*, em leveduras da mesma espécie nas diferentes condições analisadas.

Ainda em relação às propriedades fisiológicas, outro aspeto a ter em conta é a estimulação do sistema imunitário por parte dos microrganismos probióticos. Furlan et al. (2004), referem que as bactérias ácido-lácticas apresentam capacidade de estimular o sistema imune do hospedeiro, pois aumentam o número e a atividade de células fagocíticas, bem como os macrófagos.

Também a capacidade de produção de compostos com propriedades antioxidantes poderá ser levada em conta na seleção de microrganismos probióticos, uma vez que estes compostos favorecem a saúde do hospedeiro, sendo que atuam no atraso da oxidação de substratos oxidáveis (Hassan, 2011).

Além de todos os requisitos acima mencionados, deverá ter-se em consideração aquando da seleção dos microrganismos a sua resistência ao processamento industrial, sem produzir compostos que possam alterar as características principais do produto (Alves, 2013).

### **2.1.2. Leveduras como probióticos**

As leveduras são fungos unicelulares, eucariontes, que estão presentes nas plantas, ar, solo e no trato gastrointestinal dos animais. A maioria é mesófila

apresentando um crescimento óptimo em torno de 25°C a 30°C. No entanto, várias espécies têm sido capazes de se adaptar a diferentes ambientes ou nichos ecológicos proporcionados pela atividade humana (Arroyo-López et al., 2008). São amplamente utilizadas para fins biotecnológicos, como na produção de alimentos fermentados, nas fermentações alcoólicas, na síntese de vitaminas, como fonte de proteínas, como factores de crescimento, possíveis de serem utilizados na alimentação animal e até mesmo na humana (Battcock, 1998). A espécie *Saccharomyces* é a mais conhecida por ser a mais utilizada em alimentos fermentados (pão e cerveja), mostrando-se eficiente através de diversas propriedades tecnológicas (Moslehi-Jenabian et al., 2010).

As leveduras podem produzir uma variedade de compostos, como etanol, glicerol, álcoois superiores, ésteres e outros compostos voláteis com um papel importante na textura, sabor e na preservação durante a fermentação e o armazenamento (Arroyo-López et al., 2008). Também podem produzir antioxidantes naturais tais como carotenóides, ácido cítrico, ácido ascórbico, tocoferóis e glutatona (Arroyo-López et al., 2012a), que podem evitar a oxidação de produtos alimentares, tais como alimentos para bebés, leite integral, ou produtos lácteos, bem como, vitaminas do complexo B, como a B6 (piridoxina), B12 (cianocobalamina), B1 (tiamina) e B2 (riboflavina) (Abbas, 2006).

Como levedura probiótica com efeitos clínicos comprovados na medicina humana, temos a *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*, vulgarmente conhecida por *Saccharomyces bouardii* (Arroyo-López et al., 2012a; Hatoum et al., 2012). Esta levedura é uma variedade da *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida tecnicamente como *Saccharomyces Hansen* CBS 5926. Descrita na primeira vez em 1984, sendo isolada de frutos de lichia na Indochina (Hatoum et al., 2012), é considerada um probiótico altamente potente, com propriedades capazes de manter a flora microbiana intestinal equilibrada (Trigueros et al., 2016). Este microrganismo não patogénico e termotolerante é geralmente utilizado na forma de cultura liofilizada, auxiliando em tratamentos de variadas doenças intestinais em seres humanos e animais monogástricos (Pinos-Rodríguez et al., 2008). Pothoulakis et al. (1993), efetuaram pesquisas relacionadas com o potencial de inibição que a *Saccharomyces bouardii* poderia apresentar contra a toxina A produzida por *Clostridium difficile*, e relataram que a administração oral de *S. bouardii* em ratos após 3 dias de introdução da toxina A, reduziu significativamente a secreção intestinal. Outros relatos, indicam que a levedura *S. bouardii*, inibe a ação de outras toxinas bacterianas enterotóxicas, tal como o estudo

feito por Vidon et al. (1986), que mostrou a redução significativa de secreção de água e de sódio induzida pela toxina da cólera em ratos, após a introdução de *S. boulardii*. Coppola & Turnes(2004), relataram que preparados contendo a *S. boulardii* protegem ratos convencionais contra infecções por *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*. Garrido-Mesa et al. (2015) avaliaram a ação na ingestão de *S. boulardii* como probiótico conjuntamente com o antibiótico à base de doxiciclina, concluindo que houve redução da colite em ratos após ingestão desta associação resultando numa diminuição a longo prazo de recaídas quanto a inflamações intestinais.

Na medicina veterinária, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* tem sido usada como probiótico na alimentação animal, com o objetivo de melhorar o desempenho dos animais e a qualidade do produto, como por exemplo no ganho de peso diário de bezerros, auxílio no desmame, entre outros (Hatoum et al., 2012; Pinos-Rodríguez et al., 2008).

Recentemente vários estudos têm incidido na pesquisa de leveduras probióticas, em produtos fermentados e em outros produtos alimentares. Por exemplo, autores como Syal & Vohra (2013), pesquisaram o potencial probiótico de leveduras isoladas de alimentos fermentados tradicionais na Índia e constataram que as estirpes de *S. cerevisiae*, *Candida* sp., *Pichia* sp.e *Aureobasidium* sp. são grandes promissoras a microrganismos probióticos, por apresentarem capacidade de degradar anti-nutrientes, tais como o ácido fítico e o ácido tânico, e por poderem hidrolisar a lactose, um benefício importante para os pacientes com intolerância à lactose. Adicionalmente, estes mesmos autores referem que as leveduras produzem também L-asparaginase, que apresenta propriedades anticancerígenas; auxiliam na digestão, por apresentarem capacidades de produzir lipase e protease; podem ser utilizados como imunostimulantes; e, por fim, apresentam capacidade de assimilar o colesterol, sendo de grande valor para pacientes que sofrem de hipercolesterolemia.

Gil-Rodríguez et al. (2015), pesquisaram as características *in vitro* de leveduras probióticas em alimentos e bebidas e identificaram que a estirpe de *Saccharomyces pombe* apresentou melhor crescimento a 37°C do que em 25°C, uma boa tolerância às condições de *stress* no trato gastrointestinal, uma alta percentagem de autoagregação e alta capacidade antioxidante. Sourabh et al. (2011) realizaram pesquisas com leveduras autóctones isoladas de alimentos fermentados tradicionais do Himalaia Ocidental para obter atributos probióticos e revelaram que 23 dos isolados testados apresentaram tolerância ao sistema gastrointestinal, nove dos isolados apresentaram produção de

exopolissacarídeo, apenas quatro apresentaram capacidade antioxidante utilizando o método de radicais livres (DPPH - 1, 1-difenil-2-picrillhidrazilo), e nenhum isolado apresentou ação positiva contra os sais biliares. Também os autores Chen et al. (2010) constataram que estirpes de *Pichia fermentans* BY5 e HJ15 isoladas do leite cru apresentaram excelentes propriedades antioxidantes em células intactas (41,82% e 44,33%, respetivamente) e no extrato celular (BY5 - 26,72% e HJ15 - 24,43%) podendo estas estirpes serem candidatas promissoras a probióticos com grande capacidade antioxidante.

Embora os produtos lácteos ainda sejam os portadores dominantes de bactérias probióticas, vários estudos demonstram que as frutas e vegetais podem também servir de matrizes adequadas para probióticos e com vantagens competitivas dentro do mercado crescente de vegetarianos e de consumidores alérgicos aos laticínios (Peres et al., 2012). De facto, vários autores (Arroyo-López et al., 2012b; Peres et al., 2012) referem o interesse de um produto vegetal probiótico, justificando-se o interesse pelas suas características nutricionais e também por possuírem características intrínsecas apropriadas para se obter um produto probiótico.

#### *2.1.2.1. Leveduras potencialmente probióticas isoladas do processo de fermentação de azeitonas de mesa*

A azeitona de mesa é um dos principais produtos vegetais fermentados altamente consumido em todo o mundo. Em Portugal existem duas Denominações de Origem Protegida (DOP) para a azeitona de mesa, DOP “Azeitona de Conserva de Elvas e Campo Maior” e a “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”. A cultivar Negrinha de Freixo (Figura 2), é típica da região de Trás-os-Montes e é obtida a partir do processo de fermentação natural (Cordeiro et al., 2009).

Neste processo de fermentação natural das azeitonas de mesa, os principais microrganismos envolvidos pertencem ao grupo das bactérias ácido-lácticas e leveduras, estando a microflora dependente da cultivar e das práticas agrícolas exercidas (Corsetti et al., 2012). De acordo com Argyri et al. (2013), um vegetal que sofre fermentação natural, onde há atuação de estirpes autóctones no processo, apresentam maior poder competitivo frente a outros microrganismos.



**Figura 2** - Fruto (esquerda) e embalagem de conserva de azeitona (direita) da cultivar Negrinha de Freixo.

**Fonte:**Cordeiro et al. (2009); <http://vintage-surprises.pt/site/artigos/710/10>.

O papel das leveduras no processo de fermentação de azeitona tem sido amplamente estudado (Argyri et al., 2013; Arroyo-López et al., 2012b; Bautista-Gallego et al., 2011; Bonatsou et al., 2015; Hernández et al., 2007; Psani& Kotzekidou, 2006; Rodríguez-Gómez et al., 2010; Silva et al., 2011). Com efeito, Rodríguez-Gómez et al. (2010), efetuaram estudos relacionados com a atividade lipolítica de leveduras envolvidas no processo de fermentação e armazenamento de azeitonas pretas e verificaram que das leveduras isoladas durante o armazenamento (*S. cerevisiae* e *Pichia galiformes* e a *Candida boidinii* em menor quantidade), apenas os isolados de *C. boidinii* apresentaram uma forte atividade lipolítica, podendo ser responsáveis pelas mudanças observadas em relação à gordura durante o armazenamento. A capacidade das leveduras de produzirem compostos, bem como glicerol, ésteres, álcoois superiores, compostos voláteis e etanol são de grande importância no processo de fermentação de azeitonas de mesa, uma vez, que contribuem para geração de *flavour* e manutenção da textura durante o processo (Arroyo-López et al., 2012a).

Nos últimos anos, a pesquisa de culturas *starter* com aplicação na fermentação da azeitona de mesa foi praticamente centrada sobre a atividade das bactérias produtoras de ácido láctico (LAB). Numa publicação de 2014 no *site* da Comissão Europeia (EC), no programa de Pesquisa e desenvolvimento Horizonte 2020, referem a existência até a esse momento de duas patentes registadas para azeitonas de mesa probióticas, uma na Grécia e outra em Espanha, mediante a utilização de bactérias ácido-lácticas com propriedades probióticas, como cultura *starter* no processo de fermentação (<http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/>).

No entanto, recentemente, algumas publicações têm enfatizado a importância de leveduras no processamento de azeitona de mesa (Arroyo-López et al.; 2008; Bevilacqua et al., 2012). Algumas características das leveduras, que já foram anteriormente referidas, tais como atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar, estabilidade ao ácido e biles, podem contribuir para um produto fermentado com potenciais propriedades probióticas (Psani & Kotzekidou, 2006). Com efeito, Hernández et al. (2007) identificaram e caracterizaram leveduras isoladas da produção de azeitonas de mesa verdes e verificaram que as estirpes de *P. anomala*, *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae* e *C. maris* apresentaram as melhores propriedades para a utilização como cultura *starter* de arranque em fermentações piloto. Através da exploração da biodiversidade de leveduras isoladas de azeitonas de mesa verdes fermentadas industrialmente, Bautista-Gallego et al. (2011) identificaram dois isolados de *Wickerhamomyces anomalus* com forte atividade de  $\beta$ -glucosidase, moderada atividade da catalase e lipolítica, sendo confirmadas através de ensaios quantitativos.

A identificação de leveduras com potencial probiótico e possível utilização como cultura *starter* no processo de fermentação de azeitona de mesa ainda é muito pouco estudado, pois as estirpes devem ser capazes de conduzir a fermentação juntamente com as bactérias ácido-lácticas, devem resistir ao baixo e/ou alto pH, às diferentes concentrações de sal que possam vir a ser utilizadas, devem produzir aromas desejáveis, inibir os microrganismos deteriorantes e é de extrema importância que elas resistam a todos os critérios que já foram aqui abordados (Arroyo-López et al., 2012b).

Recentemente, estirpes de leveduras isoladas de azeitonas de mesa de fermentação natural, especialmente dos géneros *Debaromyces*, *Torulaspota* isoladas de azeitonas pretas (Psani & Kotzekidou, 2006), e *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Candida* (Silva et al., 2011) das cultivares Galega e Cordovil, têm sido apresentadas como tendo um potencial probiótico através de ensaios independentes de resistência aos sais biliares e pH baixo. Bonatsou et al. (2015) selecionaram leveduras, com características multifuncionais, para serem aplicadas no processo de fermentação natural de azeitonas de mesa pretas, e verificaram que as estirpes *Pichia guilliermondii* Y16, e *W. anomalus* Y18, poderão ser grandes promissoras a leveduras probióticas, sendo claramente distinguidas das demais isoladas, por apresentarem maior resistência ao sal e a simulação de digestão e atividade enzimática.

Tataridou & Kotzekidou (2015) relatam que as azeitonas de mesa apresentam importantes propriedades nutricionais, pela presença de compostos fenólicos, minerais e ácidos gordos monoinsaturados. Também os resultados obtidos por Malheiro et al. (2011), referem que as alcaparras de azeitonas de mesa de diferentes cultivares, tais como Negrinha de Freixo, Cobrançosa e Santulhana, são uma ótima fonte de compostos fenólicos que podem auxiliar na prevenção do cancro. Sendo assim, a azeitona de mesa além de ser um alimento rico em nutrientes de elevado valor biológico, a adição de microrganismos probióticos em seu processo pode valorizar ainda mais o produto, com o objetivo de se introduzir um novo alimento funcional no mercado. Alimento funcional é definido pela IFIC (*International Food Information Council*) como aquele que proporciona à saúde do hospedeiro benefícios, além da nutrição básica que já é oferecida. Com isso é necessário que haja fundamentos científicos para documentar tais benefícios para que os consumidores aumentem sua compreensão sobre o potencial que os alimentos funcionais fornecem à saúde (IFIC, 2011). Nesse sentido, é interessante que os estudos envolvendo a identificação de leveduras probióticas em azeitonas de mesa, sejam incrementados, uma vez que estes microrganismos podem potencializar este produto, consumido em todo mundo. Como as azeitonas de mesa apresentam uma grande quantidade de fibras e nutrientes, bem como propriedades antioxidantes devido aos compostos fenólicos presentes (Angelis et al., 2015), a incrementação de leveduras probióticas em seu processo seria de grande valia, uma vez, que as leveduras exercem diversos efeitos benéficos para as propriedades tecnológicas das azeitonas, bem como a produção de compostos antioxidantes, já comentados, aumentando ainda mais a sua capacidade antioxidante e também oferecem propriedades benéficas ao ser humano, gerando assim um produto, normalmente ingerido sob forma de aperitivo, com características funcionais, com alta competitividade no mercado dentre os já existentes.



# **CAPÍTULO 3**

## **Material e Métodos**



### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Origem do material biológico

No presente trabalho, foram utilizadas leveduras previamente isoladas por Pereira et al. (2015), durante o processo de fermentação natural de azeitonas da cultivar Negrinha de Freixo. Os isolados foram obtidos a partir de amostras da polpa da azeitona imediatamente antes de ser submetida ao processo de fermentação (*in natura*), da polpa em contacto com a salmoura e da própria salmoura. A identificação molecular foi feita através da amplificação termocíclica da região espaçadora transcrita interna (ITS, *internal transcribed spacer*) do rDNA. As suas sequências encontram-se depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), GenBank com os números de acesso constantes na Tabela 1.

**Tabela 1** - Espécies isoladas e identificadas molecularmente por Pereira et al. (2015).

Referência	Código de acesso	Espécie	Substrato
1A	KM519627	<i>Candida tropicalis</i>	Polpa <sup>1</sup>
3A	KM519627	<i>Candida tropicalis</i>	Polpa <sup>1</sup>
29A	KM519632	<i>Pichia membranifaciens</i>	Polpa <sup>1</sup>
3B	KM519632	<i>Pichia membranifaciens</i>	Polpa <sup>1</sup>
15B	KM519635	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Polpa <sup>1</sup>
15A	KM519636	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Polpa <sup>1</sup>
7A	KM519637	<i>Candida norvegica</i>	Polpa <sup>2</sup>
8A	KM519628	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Polpa <sup>2</sup>
20A	KM519634	<i>Rhodotorula graminis</i>	Polpa <sup>2</sup>
37A	KM519636	<i>Candida boidinii</i>	Polpa <sup>1</sup>
32A	KM519636	<i>Candida boidinii</i>	Polpa <sup>1</sup>
25A	KM519630	<i>Pichia guilliermondii</i>	Polpa <sup>2</sup>
27A	KM519633	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Polpa <sup>2</sup>
2A	KM519631	<i>Pichia manshurica</i>	Salmoura
33A	KM519629	<i>Galactomyces reessii</i>	Salmoura
34A	KM519629	<i>Galactomyces reessii</i>	Salmoura
Sb	-	<i>Saccharomyces boulardii</i>	

Legenda: <sup>1</sup> Polpa da azeitona em contacto com a salmoura; <sup>2</sup> Polpa da azeitona *in natura*.

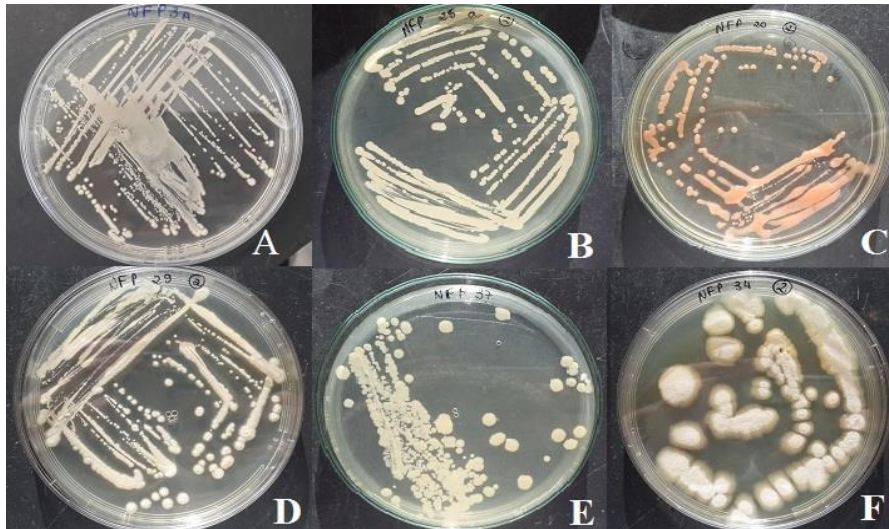
Os isolados obtidos na polpa *in natura* correspondem às espécies *Candida norvegica*, *Debaromyces hansenii*, *Rhodotorula graminis*, *Pichia guilliermondii* e *Rhodotorula glutinis*. Na polpa da azeitona em contacto com a salmoura correspondem às espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii* e *Pichia membranifaciens* e, por fim, na salmoura correspondem às espécies de *Galactomyces reessii* e *Pichia manshurica*.

Como cultura probiótica de referência foi utilizada a espécie *Saccharomyces boulardii* liofilizada, também conhecida como *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Esta levedura foi obtida a partir do medicamento Floratil® (*Saccharomyces boulardii* – 17 liofilizado 100 mg, Merck).

### **3.2. Condições de cultura**

Os isolados de leveduras, conservados sob congelação a -80°C em solução de glicerol a 30% (v/v), foram reativados duas vezes em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA, Liofilchem) e incubados a 25° C, antes de serem utilizados nos diferentes testes realizados (Figura 3). O período de incubação para cada reativação foi de 48 a 72 horas.

Os microrganismos patogénicos conservados em glicerol, pertencentes à coleção da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, foram também reativados em meio *Plate count agar* – PCA (bactérias) e PDA (leveduras) e incubados à temperatura de 37°C e 25°C, respetivamente, antes de serem utilizados no ensaio da atividade antimicrobiana.



**Figura 3** - Aspecto macroscópico dos isolados em cultura pura. A: *C. tropicalis*; B: *P. guilliermondii*; C: *R. graminis*; D: *P. membranifaciens*; E: *C. boidinii*; F: *G. reessii*.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

### 3.3. Avaliação da atividade enzimática

A avaliação da atividade enzimática das leveduras foi realizada através de ensaios qualitativos. As estirpes foram inicialmente cultivadas em meio PDA e posteriormente inoculadas nos meios de triagem enzimática (exceto para o teste da catalase). Todos os ensaios foram realizados em triplicado para cada um dos isolados testados e os resultados expressos de forma qualitativa, onde “-“ atividade nula; “+” atividade fraca; “++” atividade moderada e “+++” atividade forte. Para a pesquisa da catalase os resultados foram expressos em termos de presença “P” ou ausência “0”.

#### 3.3.1. Catalase

A atividade da catalase foi realizada através do método descrito por Whittenbury (1964), adicionando-se o peróxido de hidrogénio 3% (v/v) nas colónias de leveduras com 48 h de crescimento. A atividade da catalase foi observada através do aparecimento rápido de bolhas de gás, uma vez que esta enzima decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio.

### 3.3.2. Protease

A atividade da protease foi determinada a partir do método descrito por Strauss et al. (2001), através do espalhamento do inóculo em placas com meio (PDA) contendo 20 g/L de caseína (Merck). Após um período de incubação de 5 dias a 30°C considerou-se o resultado como positivo quando houve formação de uma zona clara em torno da colónia.

### 3.3.3. $\beta$ -glucosidase

Os ensaios para avaliar a atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase foram realizados de acordo com o método descrito por Bautista-Gallego et al. (2011), usando arbutina como substrato. O meio basal consistia de 6,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco), suplementado com 5 g/L de arbutina (Chem Cruz<sup>TM</sup>) e 20 g/L de agar, com pH ajustado a 5,0 com HCl 0,1N. Após esterilização do meio adicionou-se 0,2 g/L de solução de citrato férrico amoniacal a 1% (p/v). As leveduras foram inoculadas em estrias radiais e incubadas a 25°C durante 8 dias. As estirpes capazes de hidrolisar o substrato apresentaram uma cor castanho escuro à volta das colónias.

### 3.3.4. Lipase

A atividade da lipase foi realizada de acordo com o método descrito por Samad et al. (1989), efetuando-se poucas modificações. O meio *Yeast Extract Agar* (YEA, 6,0 g/L de triptona, 3,0 g/L de extracto de levedura e 15 g/L de agar), suplementado com Tween 80 (1%) e vermelho de fenol (0,01%), foi ajustado para pH 7,3–7,4 utilizando NaOH 1N. Posteriormente, o meio foi inoculado com os diferentes isolados de leveduras e procedeu-se à incubação a 37°C por 48 horas. O resultado foi observado a partir da mudança de cor do meio, de vermelho a amarelo, no caso de resultado positivo.

### 3.3.5. Amilase

A atividade da amilase foi realizada utilizando o meio agar de amido constituído por peptona (10 g/L, Himedia), extracto de levedura (5 g/L), NaCl (5 g/L,

Biochem), amido (2 g/L) e agar (15 g/L). O pH deste meio foi ajustado para  $6,8 \pm 0,2$  com HCl 0,1N. Após inoculação das leveduras as placas foram incubadas a 30°C durante 5 dias. Ao fim desse período, adicionou-se às culturas uma solução de lugol tendo-se considerado reação enzimática positiva a formação de um halo de cor castanha em torno das colónias.

### **3.3.6. Xilanase**

Para analisar a capacidade das leveduras produzirem a enzima xilanase, seguiu-se o método descrito por Hernández et al. (2007). Para o efeito, utilizou-se o meio YEA suplementado com xilano (5 g/L, Sigma - Aldrich), peptona bacteriológica (5 g/L, Himedia) e NaCl (5 g/L, Biochem). Após sementeira do meio as placas foram incubadas a 25°C durante 10 dias. A presença da enzima xilanase foi observada pelo aparecimento de um halo claro ao redor das colónias.

### **3.4. Avaliação do crescimento**

Para o estudo do crescimento das leveduras, um pré-inóculo de cada levedura foi inicialmente reativado em meio PDB à temperatura de 25°C durante 24 h. No final do período de incubação mediu-se a densidade ótica (D.O.) de cada cultura em espectrofotómetro (Cary 50 Scan) e uma alíquota foi adicionada em 20mL de caldo de forma a ajustar a D.O. da suspensão para 0,1 a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm. Em seguida, as culturas foram incubadas num agitador orbital termostaticado a duas temperaturas diferentes (25°C e 37°C) e com agitação constante (150 rpm) durante 8 h. Durante este período foram realizadas leituras horárias (em duplicata), efetuando-se diluições da amostra sempre que necessário, de modo que o valor da D.O.<sub>600nm</sub> das suspensões celulares lida no espectrofotómetro não ultrapassasse 0,4.

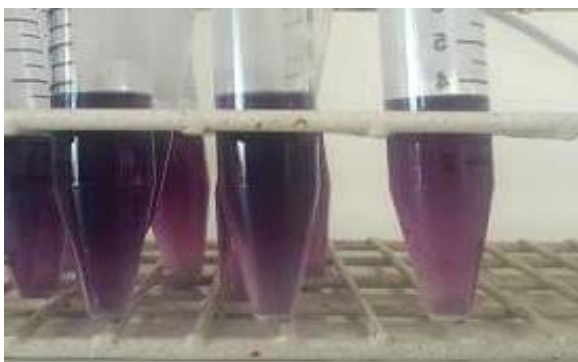
O registo horário dos valores de densidade ótica permitiu elaborar as curvas de crescimento (não apresentadas no trabalho) e através da análise de regressão linear aos valores do logaritmo natural da D.O. ( $\ln D.O.$ ), compreendidos na fase de crescimento exponencial, foi possível determinar a partir do declive da reta os valores da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), para cada um dos isolados. O tempo de duplicação ( $t_d$ ),

ou tempo de geração, foi calculado através da divisão da constante  $\ln 2$  pela taxa específica de crescimento.

### 3.5. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da capacidade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) dos diferentes isolados foi realizada de acordo com o método descrito por Gil-Rodríguez et al. (2015).

As estirpes foram deixadas a crescer a 37°C durante 24 h, ajustadas para uma densidade ótica de 1,20 ( $\lambda_{600\text{nm}}$ ) e em seguida centrifugadas (12000 rpm, 10 min, 4°C). O sedimento resultante foi lavado duas vezes com uma solução estéril de NaCl 0,9% e posteriormente ressuspensão em 2mL da mesma solução. A cada 1,6 mL de amostra testada adicionou-se 2 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,2 mM). Após agitação, as amostras foram incubadas na ausência da luz durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A capacidade bloqueadora dos radicais livres DPPH foi medida por espectrofotometria (Cary 50 Scan) ao comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 517 nm. A solução metanólica de DPPH apresenta-se com coloração púrpura forte, e na medida em que é sequestrado perde a cor resultando numa diminuição da absorbância (Figura 4). Como branco foi utilizado uma alíquota contendo 1,6 mL de NaCl 0,9% e 2 mL da solução metanólica de DPPH, também incubada por 30 minutos em ambiente escuro.



**Figura 4** - Solução de DPPH após 30 min. no escuro. O primeiro tubo à esquerda corresponde ao branco e os dois tubos seguintes referem-se às amostras.

**Fonte:** Arquivo Pessoal.

A percentagem da capacidade antioxidante foi calculada a partir da equação:

$$\% A.A = \left( 1 - \left( \frac{A_{amostra}}{A_{branco}} \right) \right) * 100$$

Onde,  $A_{branco}$  corresponde à absorvância da solução utilizada como branco;  $A_{amostra}$  a absorvância da solução com a amostra.

Os ensaios foram realizados em triplicado.

### 3.6. Avaliação da capacidade de autoagregação

Para avaliar a capacidade de autoagregação das estirpes utilizou-se a metodologia descrita por Gil-Rodríguez et al. (2015).

As culturas foram previamente cultivadas em caldo PDB a 37°C durante 24h e após este período, 1,2 mL de cada cultura foi submetida a centrifugação (12000 rpm, 5 min, 4°C). Após eliminação do sobrenadante as células foram submetidas a duas lavagens com uma solução estéril de NaCl 0,9%. A suspensão adquirida foi ressuspensa em 1 mL da mesma solução (NaCl 0,9%) e o conteúdo foi transferido para uma cuvete de vidro medindo-se, em seguida, a absorvância inicial da suspensão ( $A_0$ ). Após incubação a 37°C, e sem agitar a suspensão celular, mediu-se em cada período (2, 4 e 24 horas) a absorvância ( $A_T$ ) a 600 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A percentagem de autoagregação (%) foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Autoagregação} = \left( 1 - \left( \frac{A_T}{A_0} \right) \right) * 100$$

### 3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes isolados foi testada em presença de 2 leveduras (*Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*) e 3 bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), através do método de difusão em agar.

As culturas destes microrganismos patogênicos foram inoculadas em 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck) e incubadas a 25°C (leveduras) e a 37°C

(bactérias) durante 16-18 horas. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi diluída em uma solução salina estéril (NaCl 0,9%) de forma a obter uma suspensão com uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland (D.O. de 0,4 a um comprimento de onda de 540, o que corresponde aproximadamente a  $2 - 4 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colónias/mL, UFC/mL).

Os diferentes isolados de leveduras teste foram cultivados em caldo PDB a 25°C durante 24 horas e ajustadas para uma densidade ótica de 0,5 ( $\lambda_{600\text{nm}}$ ).

Placas de petri contendo meio *Mueller Hinton* (MH, Himedia), para bactérias, e MH com 2% de glicose, para favorecer o crescimento das leveduras patogênicas, foram semeadas em toda a superfície, com os microrganismos patogênicos, usando uma zaragatoa estéril. Após secagem do inóculo colocaram-se discos de papel (6,0 mm, Oxoid) à superfície do meio em posições previamente definidas adicionando-se em seguida 10  $\mu\text{L}$  da suspensão das leveduras teste. Os discos de antibióticos antibacterianos Eritromicina (15  $\mu\text{g}$ ) e Penicilina G (10 IU) e o antifúngico Anfotericina B (20  $\mu\text{g}$ ) foram utilizados como controlo positivo. Como controlo negativo utilizou-se caldo BHI a pH 6,5. As placas semeadas com bactérias e leveduras foram incubadas a 37°C e a 25°C, respetivamente durante 2 a 5 dias. O resultado foi observado a partir do aparecimento de um halo transparente ao redor dos discos de papel filtro. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

### **3.8. Simulação *in vitro* da digestão gástrica e pancreática**

Para avaliar o comportamento das leveduras no trato gastrointestinal humano, utilizou-se a metodologia descrita por Bonatsou et al. (2015), onde simulou-se a digestão gástrica e pancreática, avaliando-se a taxa de sobrevivência das estirpes em cada uma das etapas.

Para simular a digestão gástrica utilizou-se uma solução tampão a pH 2,0 contendo NaCl (2,05 g/L, Biochem),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,60 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (0,11 g/L) e KCl (0,37 g/L), ajustando-se o pH com HCl 1M. Após esterilização adicionou-se à solução, pepsina (0,0133 g/L) e lisozima (0,01 g/L), de modo a obter a solução gástrica.

As culturas de leveduras a serem testadas foram deixadas crescer em caldo PDB durante 24 horas a uma temperatura de 25°C. Em seguida, foram centrifugadas (10000 rpm, 10 min, 4°C) e o sedimento resultante lavado 2 vezes com solução tampão

a pH 2,0, sem a adição de pepsina e lisozima. Após a lavagem, foram ressuspensas em solução gástrica e ajustadas para uma densidade ótica de 0,5 ( $\lambda_{600\text{nm}}$ ). Posteriormente foram incubadas durante 2,5 horas a 37°C numa estufa com agitação orbital a 200 rpm para simular os movimentos peristálticos. De forma a avaliar a viabilidade das células efetuou-se o plaqueamento em meio de cultura PDA no início e no final da simulação gástrica.

A simulação da digestão pancreática foi realizada utilizando uma solução tampão a pH 8,0, ajustado com HCl 1M, formulada a partir de sais biliares (3,0 g/L), pancreatina (0,1 g/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (26,9 g/L) e NaCl (8,5 g/L). As células resultantes da simulação gástrica foram centrifugadas e lavadas 2 vezes em solução isotónica estéril e ressuspensas na solução pancreática estéril previamente preparada. Após agitação das suspensões de leveduras a 200 rpm num agitador orbital durante 3,5 h a 37°C, o sedimento foi lavado e, em seguida, as células foram ressuspensas num volume de solução isotónica (NaCl 0,9%). A viabilidade celular das células suspensas no suco pancreático foi avaliada por plaqueamento em meio PDA, no início e no fim do processo de digestão pancreática.

Para cada isolado foram realizados 4 ensaios independentes.

### **3.9. Análise estatística dos resultados**

Para avaliar a existência de diferenças significativas entres os dados obtidos da atividade antioxidante, atividade de autoagregação e simulação do processo digestivo, utilizou-se o *Software Statistical Program Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Após avaliar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias, utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, efetuou-se a análise de variância “one-way” (ANOVA). Os valores considerados foram as médias de três a cinco ensaios independentes e os respetivos desvios padrão das variáveis. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias foram determinadas recorrendo ao teste de Tukey HSD.

Para determinar a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) para cada um dos isolados, realizou-se uma análise de regressão linear, utilizando o programa *Excel* da *Microsoft Corporation* (2013), a partir dos valores do logaritmo natural da densidade ótica ( $\ln D.O.$ ) *versus* tempo, compreendidos na fase de crescimento exponencial.

Com o objetivo de discriminar as estirpes de leveduras de acordo com as propriedades probióticas, realizou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA), no programa SPSS (v. 20.0). Os resultados dos ensaios qualitativos (atividade enzimática) foram convertidos em 4 códigos qualitativos (Tabela 2). Para a seleção do número de componentes principais ou fatores utilizou-se o critério de *Kaiser* e apenas foram mantidos os fatores com *eigen values* superiores a 1.

**Tabela 2** - Códigos qualitativos usados na Análise de Componentes Principais aplicados aos resultados dos ensaios qualitativos.

<b>Variáveis Qualitativas</b>	<b>Códigos</b>
Nula atividade (-)	1
Fraca atividade (+)	2
Moderada atividade (++)	3
Forte atividade (+++)	4

# ***CAPÍTULO 4***

## **Resultados e Discussão**



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Atividade enzimática

Na Tabela 3 encontram-se os resultados obtidos da atividade enzimática apresentado para cada isolado testado.

**Tabela 3** - Atividade enzimática das leveduras isoladas durante o processo de fermentação da azeitona da cv. Negrinha de Freixo (n=3).

Espécie	Referência	Catalase	Lipase	Protease	Amilase	$\beta$ -Glucosidase	Xilanase
<i>C. tropicalis</i>	1A	P	+	-	-	-	+
<i>C. tropicalis</i>	3A	P	-	+	-	-	-
<i>P. membranifaciens</i>	29A	P	+	+	-	-	-
<i>P. membranifaciens</i>	3B	P	+	+	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	15B	P	+++	+	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	15A	P	+++	+	-	-	+
<i>C. norvegica</i>	7A	P	+	+	-	++	+
<i>D. hansenii</i>	8A	P	+	+	-	-	-
<i>R. graminis</i>	20A	P	+	+	-	+++	+
<i>C. boidinii</i>	37A	P	+	-	-	-	+
<i>C. boidinii</i>	32A	P	-	+	+	-	+
<i>P. guilliermondii</i>	25A	P	+	-	-	++	+
<i>R. glutinis</i>	27A	P	+	+	-	+++	+
<i>P. manshurica</i>	2A	P	+++	-	-	-	-
<i>G. reessii</i>	33A	P	-	-	+	++	+
<i>G. reessii</i>	34A	P	+	-	-	-	+

Legenda: “P” presença; “-“ nula atividade; “+” fraca atividade; “+++” moderada atividade, “++++” forte atividade.

#### 4.1.1. Catalase

Todas as estirpes avaliadas apresentaram atividade da enzima catalase. Resultados semelhantes também foram observados por Nogueira (2012), Bautista-Gallego et al. (2011) e Hernández et al. (2007) na maioria das leveduras isoladas durante o processo de fermentação da azeitona. Esta enzima tem a capacidade de reduzir a oxidação de ácidos gordos insaturados e a formação de peróxido de hidrogénio contribuindo para a preservação das azeitonas (Hernández et al., 2007). A presença

desta enzima em microrganismos probióticos poderá aumentar a sua capacidade antioxidante (Chen et al., 2010).

#### 4.1.2. Lipase

Os resultados relacionados com a produção da enzima lipase mostraram (Tabela 3; Figura 5) que todos os isolados testados, à exceção da *C. tropicalis* (3A), *C. boidinii* (32A) e *G. reessii* (33A), foram capazes de hidrolisar os triglicéridos presentes, podendo-se destacar com forte produção as estirpes *P. manshurica* (2A) e *S. cerevisiae* (15A e 15B). Porém, Rodríguez-Gómez et al. (2010) não detetaram nenhuma atividade desta enzima em *S. cerevisiae* isolada em azeitonas pretas. De acordo com estes autores, esta atividade é desejável em leveduras fermentativas porque pode melhorar o sabor da azeitona através da formação de compostos voláteis produzidos pelo catabolismo dos ácidos gordos livres. Além disso, de acordo com Syal & Vohra (2013), a produção da enzima lipase por leveduras probióticas é desejável porque pode contribuir para melhorar a digestão dos lípidos.



**Figura 5** -Resultado positivo (esquerda) e negativo (direita) para a atividade de lipase.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.1.3. Protease

A atividade da protease, detetada pela formação de um halo claro ao redor das colónias de leveduras, foi fraca em *C. tropicalis* (3A), *C. norvegica* (7A), *C. boidinii* (32A), *S. cerevisiae* (15A e 15B), *R. graminis* (20A), *R. glutinis* (27A), *P. membranifaciens* (29A e 3B) e *D. Hansenii* (8A), detetando-se nessas espécies um

pequeno halo quase impercetível. A ausência de halo foi observada em *P. manshurica* (2A), *G. reessii* (33A e 34A), *C. boidinii* (37A), *C. tropicalis* (1A) e *P. guilliermondii* (25A). Contudo, Syal & Vohra (2013) observaram a produção desta enzima em *P. manshurica* e Bautista-Gallego et al. (2011) em *P. galeiformis*, isolada de azeitonas verdes de diferentes cultivares espanholas.

Esta enzima tem várias aplicações em diferentes indústrias. Tem a capacidade de hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas levando à formação de grupos amina (NH<sub>2</sub>) e carboxila (COOH), originando polipeptídeos de menor peso molecular e/ou aminoácidos livres. Também, à semelhança da lipase, esta enzima é desejável em leveduras probióticas contribuindo para melhorar a digestão das proteínas (Syal & Vohra, 2013).

#### 4.1.4. $\beta$ -glucosidase

Os isolados que apresentaram atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase foram identificados através do aparecimento de uma coloração castanha escura ao redor das colônias no meio de cultura com arbutina (Figura 6). As estirpes *R. glutinis* (27A) e *R. graminis* (20A) apresentaram forte atividade desta enzima, enquanto que *C. norvegica* (7A), *P. guilliermondii* (25A) e *G. reessii* (33A) apresentaram moderada atividade. Atividade nula desta enzima foi observada em *C. tropicalis* (1A e 3A), *P. membranifaciens* (29A e 3B), *S. cerevisiae* (15A e 15B), *D. hansenii* (8A), *C. boidinii* (37A e 32A), *P. manshurica* (2A) e *G. reessii* (34A) (Tabela 3). Nogueira (2012) refere igualmente nula produção desta enzima para as leveduras *C. boidinii* e *P. manshurica* isoladas no final da fermentação da azeitona da cultivar Cobrançosa. No processo de fermentação da azeitona está envolvida na biodegradação dos polifenóis presentes no fruto da azeitona, causando a diminuição do teor de oleuropeína, composto que provoca o amargor do fruto, melhorando assim as características sensoriais no produto final (Arroyo-López et al., 2012a).

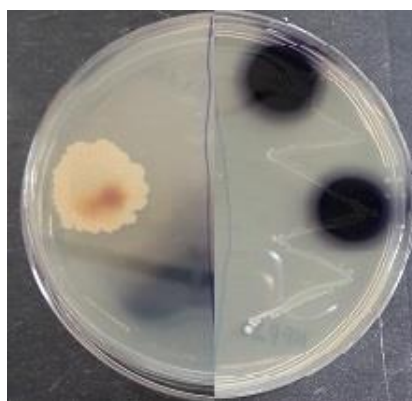


**Figura 6** - Resultado negativo (esquerda) e positivo (direita) do teste da  $\beta$ -glucosidase.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.1.5. Amilase

Em relação à atividade da amilase, apenas as estirpes *C. boidinii* (32A) e *G. reessii* (33A) mostraram fraca atividade e as restantes espécies apresentaram atividade nula (Figura 7). Também Syal & Vohra (2013) não detetaram atividade desta enzima em leveduras isoladas de produtos fermentados indianos. Já Mahdhi et al. (2011) ao caracterizar as propriedades probióticas da estirpe *Candida famata*, isolada de resíduos de óleo puro, detetaram atividade desta enzima. Esta enzima é responsável pela hidrólise de polissacarídeos, facilitando e acelerando a digestão do amido. Apresenta grande importância em biotecnologia com principal aplicação na indústria alimentícia (Spier et al., 2006).



**Figura 7** - Resultado positivo (esquerda) e negativo (direita) do teste da amilase.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.1.6. Xilanase

Relativamente à xilanase, as estirpes *C. tropicalis* (3A), *P. membranifaciens* (29A), *D. hansenii* (8A) e *P. manshurica* (2A) mostraram nula atividade enquanto que as restantes exibiram fraca atividade. Bautista-Gallego et al (2011), não detetaram atividade desta enzima em leveduras isoladas de azeitonas verdes de diferentes cultivares espanholas. Esta enzima tem sido associada ao amolecimento dos frutos da azeitona sendo este aspeto indesejável durante o processo de fermentação da azeitona (Hernández et al., 2007).

#### 4.2. Capacidade de crescimento a 37°C

A avaliação da capacidade de crescimento das leveduras a 37°C, com o intuito de identificar estirpes com capacidade de crescimento à temperatura do corpo humano, é um parâmetro importante quando se deseja selecionar microrganismos promissores a probióticos (Gil-Rodríguez et al., 2015), visto que para tais microrganismos exercerem os seus efeitos benéficos necessitam de se multiplicar no interior do hospedeiro. Devido a dificuldades técnicas, designadamente indisponibilidade de um espectrofotómetro de microplacas automático que permitisse realizar leituras automáticas durante um longo período, optou-se por acompanhar a cinética de crescimento das leveduras apenas no período de tempo de 8 horas.

Os resultados da taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação para cada estirpe encontram-se na Tabela 4. Os valores das taxas específicas de crescimento para a temperatura de 37°C, oscilaram entre 0,109 h<sup>-1</sup> (*R. graminis* 20A) e 0,718 h<sup>-1</sup> (*S. cerevisiae* 15B) e os tempos de duplicação variaram de 6,370 h a 0,966 h. Para a temperatura de 25°C variaram entre 0,188 h<sup>-1</sup> (*C. boidinii* 32A) e 0,719 h<sup>-1</sup> (*C. tropicalis* 3A) e os tempos de duplicação oscilaram de 0,965 h a 3,688 h.

Relativamente ao tempo de latência ( $t_{lag}$ ) (dados não apresentados), que corresponde ao período de adaptação das células às condições do meio e que se caracteriza pela manutenção da população ( $\mu=0$ ), verificou-se que das 16 estirpes estudadas, apenas 18,75% apresentaram um tempo  $lag$  inferior à temperatura de 37°C (1A  $t_{lag}$  = 3 h; 37A  $t_{lag}$  = 3 h; 32A  $t_{lag}$  = 4 h) do que a 25°C (1A  $t_{lag}$  = 5 h; 37A  $t_{lag}$  = 4 h; 32A  $t_{lag}$  = 5 h) sugerindo uma melhor capacidade de se adaptarem à temperatura

corporal. Idêntico período de latência, para ambas as temperaturas, foi obtido para 50% das leveduras testadas (3A, 29A, 3B, 15B, 20A, 25A, 27A e 2A) variando de 3 h a 5 h. As restantes apresentaram um tempo *lag* superior à temperatura de 25°C.

Assim, à temperatura de 37°C as estirpes 15B (*S. cerevisiae*:  $\mu = 0,718 \text{ h}^{-1}$ ;  $t_d = 0,966 \text{ h}$ ), 1A (*C. tropicalis*:  $\mu = 0,678 \text{ h}^{-1}$ ;  $t_d = 1,022 \text{ h}$ ) e 29A (*P. membranifaciens*:  $\mu = 0,676 \text{ h}^{-1}$  e  $t_d = 1,026 \text{ h}$ ) foram as que mais se destacaram por apresentarem taxas de crescimento elevadas e conseqüentemente tempos de duplicação mais baixos, similares ao da estirpe de referência *S. boulardii* ( $\mu = 0,584 \text{ h}^{-1}$ ;  $t_d = 1,186 \text{ h}$ ), indicando que a 37°C é uma temperatura favorável para o crescimento e, deste modo, que se podem desenvolver à temperatura do hospedeiro. Resultados com tendência semelhante foram também obtidos por Gil-Rodríguez et al. (2015), para as estirpes *S. cerevisiae* IFI-1145 e *P. membranifaciens* IFI-946, isoladas de alimentos e bebidas.

Em contraste, os isolados pertencentes ao género *Rhodotorula*, 20A (*R. graminis*) e 27A (*R. glutinis*) apresentaram taxas de crescimento mais baixas à temperatura de 37°C (0,109  $\text{h}^{-1}$  e 0,186  $\text{h}^{-1}$ , respetivamente) do que a 25°C, sugerindo dificuldades em crescerem à temperatura do corpo humano.

**Tabela 4** - Valores da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e tempos de duplicação ( $t_d$ ) a 25°C e 37°C para os vários isolados testados; n=2.

Amostra	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )		$R^2$		Intervalo de Confiança				Valor de p		$t_d$ (h)	
	25° C	37° C	25° C	37° C	95% inferior	95 % superior	95% inferior	95 % superior	25° C	37° C	25° C	37° C
					25° C	25° C	37° C	37° C				
1A	0,416	0,678	0,965	0,983	0,175	0,656	0,407	0,950	0,017	0,008	1,668	1,022
3A	0,719	0,498	0,976	0,890	0,375	1,062	0,297	0,699	0,012	0,001	0,965	1,392
29A	0,214	0,676	0,976	0,932	-0,208	0,635	0,119	1,232	0,098	0,035	3,246	1,026
3B	0,506	0,359	0,948	0,973	-0,997	2,007	0,249	0,470	0,146	0,002	1,371	1,928
15B	0,592	0,718	0,969	0,987	0,134	1,050	0,462	0,973	0,031	0,007	1,170	0,966
15A	0,471	0,437	0,968	0,996	0,097	0,844	0,082	0,791	0,032	0,041	1,473	1,585
7A	0,291	0,219	0,961	0,996	0,036	0,545	0,044	0,395	0,039	0,040	2,385	3,160
8A	0,379	0,369	0,992	0,998	0,331	0,426	0,322	0,417	0,000	0,001	1,830	1,877
20A	0,391	0,109	0,916	0,874	0,075	0,706	-0,416	0,633	0,030	0,231	1,773	6,370
37A	0,236	0,298	0,985	0,993	0,147	0,326	-0,022	0,618	0,008	0,054	2,932	2,325
32A	0,188	0,449	0,961	0,994	-0,294	0,670	0,339	0,558	0,127	0,003	3,688	1,545
25A	0,547	0,593	0,980	0,928	0,207	0,888	0,091	1,093	0,020	0,036	1,267	1,170
27A	0,298	0,186	0,984	0,951	-0,185	0,781	-0,341	0,721	0,081	0,142	2,327	3,734
2A	0,237	0,557	0,999	0,970	0,124	0,350	-0,697	1,810	0,024	0,112	2,925	1,244
33A	0,221	0,268	0,979	0,988	0,123	0,318	0,179	0,357	0,010	0,006	3,136	2,584
34A	0,344	0,297	0,993	0,990	-0,029	0,716	0,205	0,389	0,054	0,005	2,018	2,335
Sb	0,580	0,584	0,994	0,976	0,444	0,727	0,304	0,865	0,003	0,012	1,183	1,186

$R^2$  - coeficiente de determinação.

### 4.3. Atividade antioxidante

As substâncias antioxidantes exercem um papel de impedição e/ou diminuição da oxidação de substratos oxidáveis celulares, através da eliminação de espécies reativas de oxigénio (Hassan, 2011).

Diversos métodos têm sido utilizados para quantificar a atividade antioxidante de substâncias e extratos (DPPH, atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS, atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro, poder redutor, teor em fenóis e  $\beta$ -caroteno). O DPPH destaca-se entre todas as metodologias devido à forma rápida e direta de avaliar a atividade antioxidante. Este método baseia-se na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 517 nm que pode ser detetado por espectrofotometria.

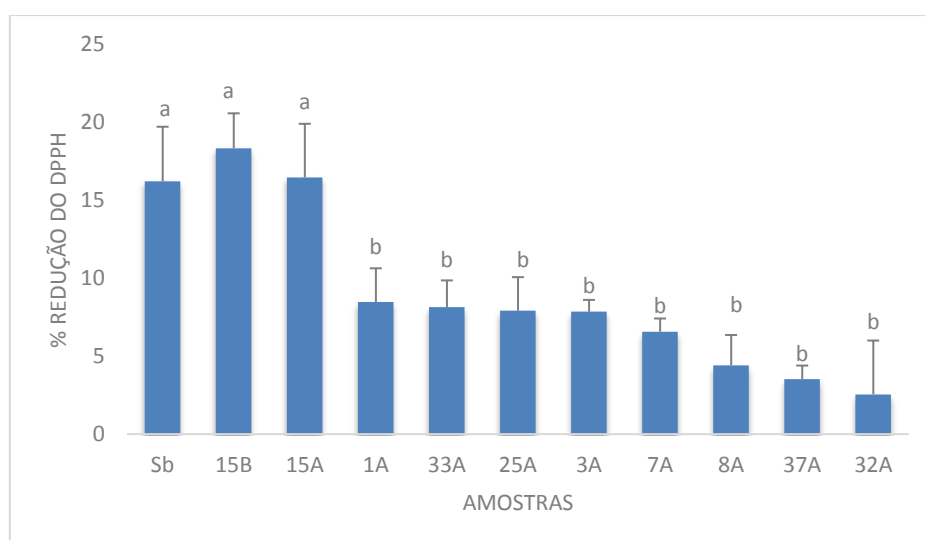
Para avaliar a atividade antioxidante foram utilizadas apenas 10 estirpes, que conseguiram atingir valores de D.O. de 1,2, correspondente a uma concentração de células aproximadamente na ordem de 6-7 log UFC/mL. Este valor de D.O foi considerado após ensaios prévios com suspensões celulares com valores de densidades óticas de 0,4, 0,6, 0,8 e 1,2, tendo-se observado uma maior atividade antioxidante em suspensões de leveduras com valores de D.O. de 1,2.

Na Figura 8 estão apresentadas as percentagens de redução do DPPH em relação a cada estirpe analisada. As maiores percentagens de redução do DPPH foram encontradas nas amostras 15B e 15A isoladas da polpa em contacto com a salmoura, que correspondem à espécie *S. cerevisiae*. Os valores percentuais encontrados nestas amostras ( $18,34 \pm 2,24$ ;  $16,47 \pm 3,44$ , respetivamente), foram significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) em relação aos observados nas restantes amostras analisadas, variando estes entre  $8,48 \pm 2,16\%$  (*C. tropicalis* 1A) e  $2,55 \pm 3,45\%$  (*C. boidinii* 32A). Porém, os valores da *S. cerevisiae* foram similares aos da *S. boulardii* ( $16,22 \pm 3,5$ ) estirpe considerada probiótica.

Os resultados apresentados por Gil-Rodríguez et al. (2015) utilizando o método de redução da atividade do DPPH, para diferentes isolados de leveduras obtidos de bebidas e alimentos, mostram para uma concentração de células semelhante ao presente trabalho, valores mais elevados para diferentes estirpes de *S. cerevisiae*, variando de  $19,74 \pm 0,12\%$  (IF-88) a  $56,97 \pm 0,30\%$  (IFI-279). Já os referidos por Sourabh et al. (2011) para isolados de *S. cerevisiae* obtidos de diversos produtos fermentados, utilizando o método de DPPH no extracto total de células e uma concentração de células

superior (9 log UFC/mL), apresentam valores que variaram de  $15,40 \pm 0,36\%$  a  $25,47 \pm 0,21\%$ .

Acredita-se que a atividade antioxidante das leveduras seja devido principalmente ao elevado teor de (1,3)- $\beta$ -D-glucano e outros  $\beta$ -glucanos encontrados na parede celular (Abbas, 2006; Jaehrig et al., 2007), assim como outros compostos celulares, tais como algumas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase (Chen et al., 2010). A presença desta atividade em isolados de levedura é uma característica adicional de proteção o que pode ser útil como antioxidante (Sourabh et al., 2011).



**Figura 8** - Atividade antioxidante (média  $\pm$  desvio padrão) das diferentes estirpes analisadas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

#### 4.4. Capacidade de autoagregação

Os microrganismos probióticos para exercerem as suas propriedades benéficas necessitam, além de resistirem às condições do trato gastrointestinal humano, apresentar boa aderência às células epiteliais, para que seja possível ocorrer a sua colonização. A habilidade de autoagregação traduz-se na capacidade dos microrganismos de se unirem entre si, formando agregados celulares, favorecendo deste modo a colonização gastrointestinal (García-Cayuela et al., 2014), podendo também estar associada com algumas propriedades físico-químicas da superfície celular de cada microrganismo, como por exemplo, a presença de glicoproteínas na superfície celular (Kos et al., 2003).

Esta capacidade é um requisito importante para que as células não sejam imediatamente eliminadas, em resultado dos movimentos peristálticos do trato gastrointestinal, permitindo, assim, uma vantagem competitiva entre os microrganismos existentes (Syal & Vohra, 2013).

A habilidade de autoagregação dos isolados foi determinada em diferentes intervalos de tempo (Tabela 5). Assim, nas primeiras 2 horas de incubação a 37°C as estirpes testadas apresentaram grande variabilidade nos resultados, apresentando percentagens de autoagregação que variaram de  $2,86 \pm 1,18\%$  (estirpe 27A) a  $74,53 \pm 4,23\%$  (estirpe 1A), sendo que o valor percentual apresentado por esta estirpe (*C. tropicalis* 1A) foi significativamente mais elevado ( $p < 0,05$ ) em relação às restantes estirpes estudadas. Também Syal & Vohra (2013), referem para *C. tropicalis* um valor elevado ao fim de 3 h de incubação ( $88,48 \pm 0,33\%$ ).

Após 4 h de incubação, as estirpes 15A, 15B (*S. cerevisiae*), 7A (*C. norvegica*), 37A (*C. boidinii*) e 2A (*P. manshurica*) aumentaram de forma significativa a sua capacidade de formar agregados celulares, continuando a aumentar até às 24 h (Tabela 5). No final do período de incubação as percentagens de autoagregação de todas as estirpes avaliadas oscilaram entre  $20,11 \pm 4,20\%$  (*R. graminis* 20A) e  $93,94 \pm 4,73\%$  (*C. tropicalis* 1A). Esta variabilidade de resultados sugere que a habilidade de autoagregação é fortemente dependente da estirpe, tal como sugerem Gil-Rodríguez et al. (2015).

Os resultados obtidos no presente estudo para a *S. cerevisiae* (estirpes 15A e 15B,  $91,71 \pm 5,58\%$  e  $74,33 \pm 6,93\%$ , respetivamente) após 24 h de incubação são semelhantes, para o mesmo período de tempo, aos relatados por Gil-Rodríguez et al. (2015), para *S. cerevisiae* IFI-87 e IFI-244 ( $83,3 \pm 0,1\%$  e  $99,8 \pm 5,74\%$ , respetivamente), isoladas de bebidas e alimentos. Syal & Vohra (2013) relatam para as espécies *P. manshurica* e *S. cerevisiae* valores de 100% ao fim de 20 h de incubação.

Del Re et al. (2000), que investigaram a autoagregação da estirpe *Bifidobacterium longum*, relatam que para ser considerada uma atividade de autoagregação forte os valores percentuais devem exceder os 80%. Assim, de acordo com este critério apenas as estirpes 1A (*C. tropicalis*), 15A (*S. cerevisiae*) e 7A (*C. norvegica*) com  $93,94 \pm 4,73\%$ ,  $91,71 \pm 5,58\%$  e  $82,72 \pm 7,14\%$ , respetivamente, apresentam forte capacidade de autoagregação ao fim de 24 h, sendo os valores percentuais obtidos pelas estirpes 1A e 15A significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) ao da levedura probiótica de referência utilizada neste estudo (*S. cerevisiae* var.

*boulardii*),  $77,05 \pm 5,74\%$ . Já, os autores Del Re et al. (1998), que investigaram a autoagregação da estirpe *Bifidobacterium suis*, indicam o valor de 40% como mínimo aceitável para estirpes potencialmente probióticas. Assim de acordo com este critério as amostras 32A, 27A, 34A, 20A e 8A, que apresentaram valores inferiores a 40%, não poderão ser enquadradas no grupo de leveduras potencialmente probióticas.

**Tabela 5** - Capacidade de autoagregação (%) dos isolados ao fim de 2 h, 4 h e 24 h (média  $\pm$  desvio padrão; n=3). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ); e letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Referência	Espécie	% Autoagregação		
		2 h	4 h	24 h
1A	<i>C.tropicalis</i>	$74,53 \pm 4,23^{Aa}$	$77,54 \pm 4,50^{Aa}$	$93,94 \pm 4,73^{Ba}$
3A	<i>C. tropicalis</i>	$65,5 \pm 0,24^{Aab}$	$71,29 \pm 1,84^{Aab}$	$78,37 \pm 3,57^{Bbc}$
29A	<i>P. membranifaciens</i>	$48,16 \pm 7,71^{Acd}$	$47,11 \pm 4,22^{Acd}$	$76,13 \pm 5,46^{Bc}$
3B	<i>P. membranifaciens</i>	$54,71 \pm 8,56^{Abc}$	$65,60 \pm 4,07^{ABab}$	$77,08 \pm 1,70^{Bc}$
15B	<i>S. cerevisiae</i>	$53,73 \pm 6,67^{Abc}$	$71,23 \pm 3,78^{Bab}$	$74,33 \pm 6,93^{Bc}$
15A	<i>S. cerevisiae</i>	$59,97 \pm 3,09^{Ab}$	$71,92 \pm 6,30^{Ba}$	$91,71 \pm 5,58^{Cab}$
7A	<i>C. norvegica</i>	$38,27 \pm 0,30^{Ade}$	$59,21 \pm 5,24^{Bbc}$	$82,72 \pm 7,14^{Cabc}$
8A	<i>D. hansenii</i>	$31,49 \pm 3,55^{Aef}$	$30,83 \pm 3,27^{Aef}$	$34,37 \pm 10,80^{Ad}$
20A	<i>R. graminis</i>	$3,35 \pm 0,71^{Ah}$	$4,05 \pm 1,42^{Ah}$	$20,11 \pm 4,20^{Bd}$
37A	<i>C. boidinii</i>	$26,46 \pm 2,95^{Aef}$	$41,82 \pm 4,16^{Bde}$	$76,58 \pm 7,90^{Cc}$
32A	<i>C. boidinii</i>	$8,96 \pm 4,53^{Ah}$	$13,58 \pm 6,40^{Bgh}$	$25,36 \pm 3,69^{Bd}$
25A	<i>P. guilliermondii</i>	$25,05 \pm 5,13^{Aefg}$	$30,66 \pm 6,66^{Aef}$	$73,66 \pm 2,65^{Bc}$
27A	<i>R. glutinis</i>	$2,86 \pm 1,18^{Ah}$	$5,12 \pm 1,88^{Ah}$	$23,67 \pm 8,68^{Bd}$
2A	<i>P. manshurica</i>	$12,82 \pm 2,00^{Agh}$	$24,75 \pm 5,05^{Bfg}$	$76,86 \pm 1,46^{Cc}$
33A	<i>G. reessii</i>	$22,01 \pm 4,95^{Afg}$	$29,21 \pm 5,51^{Aef}$	$70,50 \pm 3,10^{Bc}$
34A	<i>G. reessii</i>	$34,86 \pm 4,27^{Aef}$	$30,55 \pm 4,88^{Aef}$	$34,48 \pm 4,16^{Ad}$
Sb	<i>S.boulardii</i>	$25,50 \pm 5,81^{Af}$	$34,75 \pm 2,95^{Adef}$	$77,05 \pm 5,74^{Bc}$

#### 4.5. Atividade antimicrobiana

As leveduras têm a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, toxinas *killer* antifúngicas ou micocinas, com capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogénicos no sistema gastrointestinal (Hatoum et al., 2012). Esta habilidade tem tido uma atenção especial por parte dos investigadores, tornando-se um critério de seleção de novas estirpes probióticas para o uso humano (Moreira, 2013). Por exemplo, vários estudos

têm demonstrado que a *S. cerevisiae* var. *boulardii* confere efeitos benéficos contra diversos agentes patogénicos entéricos, através de diferentes mecanismos tais como, prevenção da aderência bacteriana e translocação nas células epiteliais do intestino, produção de factores que neutralizam toxinas bacterianas e modulação da via de sinalização da célula hospedeira associada à resposta pró-inflamatória durante a infeção bacteriana (Moslehi-Jenabian et al., 2010).

No presente estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana de todas as estirpes utilizando o método de difusão em agar. De todos os isolados analisados, apenas duas estirpes (34A e 7A) apresentaram atividade antimicrobiana. A estirpe 34A (*G. reessii*) apresentou um halo de inibição de 2,7 cm de diâmetro e a 7A (*C. norvegica*) um halo de 1,5 cm de diâmetro, ambas contra a ação da levedura patogénica *Cryptococcus neoformans*. A ação inibitória foi observada a partir de um halo translúcido, em torno das colónias de leveduras contra o crescimento do agente patogénico. De referir, que o agente antifúngico utilizado como controlo positivo (Anfoterina B) apresentou um halo de inibição ligeiramente inferior (2,2 cm de diâmetro) ao da estirpe 34A, sugerindo que a estirpe 34A apresenta uma atividade antimicrobiana forte relativamente a este microrganismo.

Esta atividade antimicrobiana verificada nas estirpes 34A e 7A está relacionada com a capacidade destas leveduras libertarem uma substância letal com propriedades antifúngicas contra leveduras de outro género. Com efeito, alguns autores (Banjara et al., 2016; Gil-Rodríguez et al., 2015) referem que algumas leveduras têm a capacidade de libertar uma substância de natureza protéica, conhecida como micocina ou toxina *killer*, que é letal para leveduras sensíveis de mesma espécie ou de outros géneros.

Em relação à estirpe probiótica de referência, *S. boulardii*, não foi evidenciada atividade antimicrobiana frente aos microrganismos patogénicos testados, ao contrário dos estudos realizados por Czerucka et al. (2007) utilizando modelos animais ou modelos celulares, em que foi observado efeito antimicrobiano desta levedura em relação aos vários agentes patogénicos entéricos, tais como *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli*.

#### 4.6. Simulação *in vitro* da digestão gástrica e pancreática

A resistência ao ambiente digestivo é outro importante parâmetro que deve ser avaliado para verificar as propriedades probióticas dos microrganismos. Por isso, a exposição prévia *in vitro* dos microrganismos às condições gástricas e pancreáticas torna-se indispensável antes de se discriminar microrganismos potencialmente probióticos (Sourabh et al., 2011).

No presente trabalho, considerou-se na simulação *in vitro* da digestão gástrica a ação da lisozima (enzima presente na saliva), a ação da pepsina (enzima presente no estômago) e a influência do pH ácido (pH de 2,0) do suco gástrico. Na simulação do processo de digestão pancreática teve-se em consideração a ação dos sais biliares e da pancreatina (combinação de enzimas digestivas produzidas pelo pâncreas) e a influência do pH 8,0 (natural do intestino delgado).

Devido ao elevado número de amostras a processar, optou-se por reduzir para 9, utilizando-se como critério de seleção os resultados dos ensaios realizados anteriormente, designadamente nos testes de crescimento e de atividades antioxidante e autoagregação. Este critério de seleção foi aplicado nas amostras 3B, 29A, 20A, 27A e 34A. A exclusão das amostras 33A (*G. reesii*) e 32A (*C. boidinii*), esteve relacionada com o padrão de crescimento destes microrganismos em meio sólido do tipo *swarming*, dificultando a contagem de colónias, requisito importante para avaliar a viabilidade das leveduras nos ensaios de simulação digestiva *in vitro*.

Na Tabela 6 encontram-se os resultados da percentagem de sobrevivência de todas as estirpes testadas, assim como da levedura probiótica (*S. boulardii*) usada como controlo, aos processos de digestão gástrica e pancreática, bem como a sobrevivência total ao processo digestivo simulado *in vitro*. Todas as estirpes avaliadas apresentaram resistência ao processo de digestão gástrica, destacando-se as estirpes 3A (*C. tropicalis*) e 25A (*P. guilliermondii*), que apresentaram taxas de sobrevivência significativamente mais elevadas ( $p < 0,05$ ),  $194,76 \pm 26,52\%$  e  $179,43 \pm 25,00\%$  respetivamente, que as restantes estirpes testadas, indicando que estes microrganismos não são afetados pelas condições ambientais do estômago, uma vez que conseguiram aumentar o seu efectivo populacional, para o dobro no caso da estirpe 3A.

As restantes estirpes apresentaram taxas de sobrevivência que variaram entre  $72,65 \pm 40,55\%$  (1A) e  $3,16 \pm 1,71\%$  (15A). Todavia, houve uma grande variabilidade

entre determinações da mesma amostra, o que se traduziu num desvio padrão elevado, e por isso não foram observadas diferenças significativas destas amostras em relação à estirpe de referência ( $44,43 \pm 1,93\%$ ). Bonatsou et al. (2015), num estudo realizado com várias estirpes de leveduras, observaram também nesta etapa um valor elevado para a *P. guilliermondii* ( $492,05 \pm 319,63\%$ ). No entanto, estes autores não observaram diferenças significativas entre os isolados, devido ao elevado desvio padrão observado em cada amostra.

As estirpes 15A (*S. cerevisiae*) e 37A (*C. boidinii*) foram as que apresentaram menor resistência ao processo de digestão gástrica simulada, com valores de  $3,16 \pm 1,71\%$  e  $16,16 \pm 5,62\%$ .

**Tabela 6**– Sobrevivência (%) das estirpes aos processos de digestão gástrica, digestão pancreática e total em todo o processo digestivo simulado *in vitro* (média  $\pm$  desvio padrão; n=4). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Referência	Espécie	Digestão gástrica	Digestão pancreática	Sobrevivência total
1A	<i>C. tropicalis</i>	$72,65 \pm 40,55^b$	$56,11 \pm 0,55^{b,c}$	$9,05 \pm 6,40^b$
3A	<i>C.tropicalis</i>	$194,76 \pm 26,52^a$	$61,41 \pm 30,59^{b,c}$	$9,04 \pm 5,91^b$
15B	<i>S. cerevisiae</i>	$39,15 \pm 17,46^{b,c,d}$	$175,98 \pm 47,84^a$	$2,80 \pm 0,36^b$
15A	<i>S. cerevisiae</i>	$3,16 \pm 1,71^d$	$12,61 \pm 11,63^c$	$0,13 \pm 0,13^b$
7A	<i>C. norvegica</i>	$49,75 \pm 13,72^{b,c}$	$125,75 \pm 47,24^{a,b}$	$14,52 \pm 3,32^{a,b}$
8A	<i>D. hansenii</i>	$40,71 \pm 2,03^{b,c,d}$	$97,74 \pm 5,58^b$	$7,38 \pm 3,63^b$
37A	<i>C. boidinii</i>	$16,16 \pm 5,62^{c,d}$	$18,17 \pm 7,75^c$	$0,48 \pm 0,35^b$
25A	<i>P. guilliermondii</i>	$179,43 \pm 25,00^a$	$68,91 \pm 22,59^{b,c}$	$29,13 \pm 16,95^a$
2A	<i>P. manshurica</i>	$29,63 \pm 7,46^{b,c,d}$	$11,05 \pm 6,09^c$	$9,53 \pm 2,98^{a,b}$
Sb	<i>S. boulardii</i>	$44,43 \pm 1,93^{b,c,d}$	$99,79 \pm 34,11^b$	$13,33 \pm 8,98^{a,b}$

Depois do período de exposição às condições gástricas (2,5 h), as estirpes foram submetidas em seguida à simulação pancreática durante 3,5 horas. Todas as estirpes apresentaram sobrevivência ao suco pancreático sintético. A estirpe 15B apresentou um valor ( $175,98 \pm 47,84\%$ ) significativamente mais elevado ( $p < 0,05$ ) que as restantes estirpes, com exceção da estirpe 7A ( $125,75 \pm 47,24\%$ ). Estas estirpes aumentaram o seu efetivo populacional nestas condições ambientais sugerindo uma melhor adaptação. Silva et al.(2011) ao avaliar a capacidade de resistência de leveduras,

isoladas da salmoura de azeitonas portuguesas, aos sais biliares (3 g/L), observaram que a maioria das estirpes testadas cresceram quando incubadas sob condições biliares.

Resultados significativamente idênticos ao da estirpe de referência foram observados nas estirpes 1A, 3A, 7A, 8A e 25A.

Em relação à sobrevivência global da simulação de ambos os processos digestivos, observou-se que a estirpe *P. guilliermondii*, amostra 25A, foi a que apresentou uma maior resistência a todo o processo digestivo, com valor de  $29,13 \pm 16,95\%$ . Contudo, o valor obtido foi estatisticamente semelhante ao da *S. boulardii* e das 7A ( $14,52 \pm 3,32\%$ ) e 2A ( $9,53 \pm 2,98\%$ ). As estirpes *C. boidinii* (37A) e *S. cerevisiae* (15A) foram as que apresentaram menor resistência na simulação realizada, com percentagens de  $0,48 \pm 0,35\%$  e  $0,13 \pm 0,13\%$ .

#### 4.7. Análise de Componentes Principais (PCA)

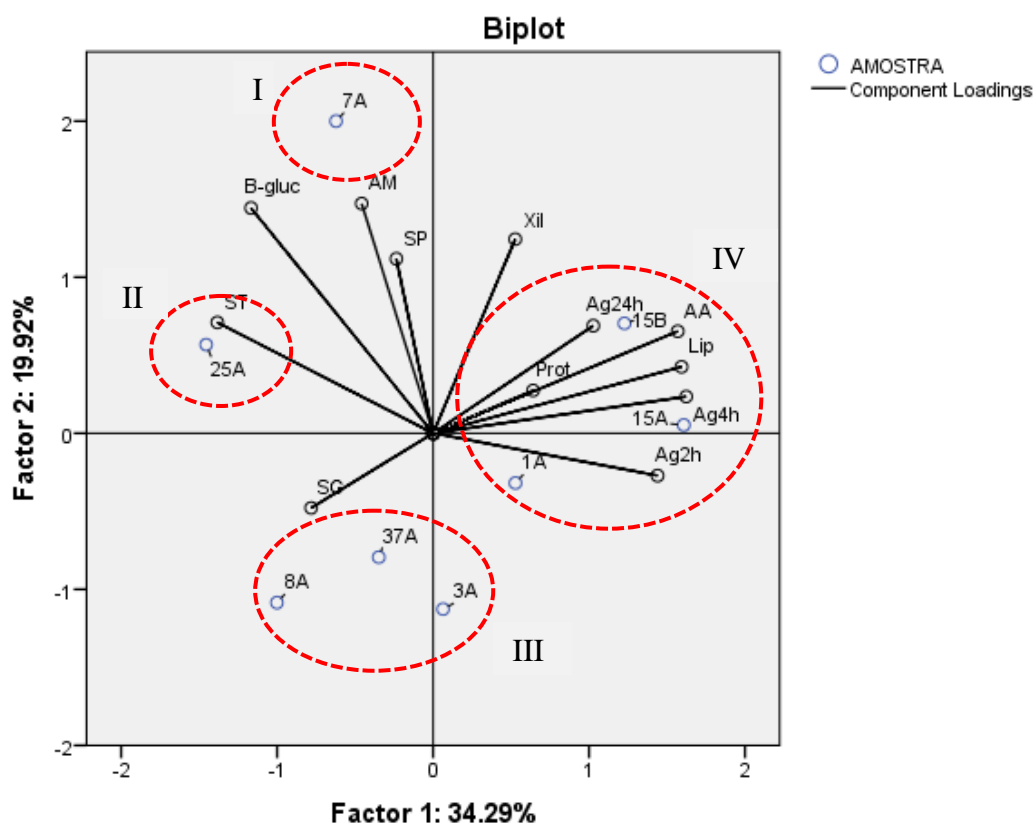
A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada com o objetivo de analisar simultaneamente todas as variáveis obtidas, a fim de condensar as informações em um número reduzido de fatores. Os autores Rodríguez-Gómez et al. (2012) relatam que esta técnica é de grande utilidade quando se pretende selecionar uma estirpe com potenciais fins tecnológicos para posterior aplicação como culturas *starters* no processo de fermentação de azeitonas de mesa.

Para a PCA as variáveis utilizadas correspondem aos resultados obtidos das análises de protease (Prot),  $\beta$ -glucosidade (B-gluc), xilanase (Xil), lipase (Lip), atividade antimicrobiana (AM), atividade antioxidante (AA), autoagregação (Ag2h, Ag4h e Ag24h), sobrevivência à digestão gástrica (SG), pancreática (SP) e total (ST).

O *biplot* apresentado na Figura 9 apresenta as duas principais componentes que explicam 54,22% da variância total das variáveis originais. A primeira componente (Factor 1) está relacionada com as variáveis lipase, atividade antioxidante, autoagregação as 2, 4 e 24 h, sobrevivência gástrica e sobrevivência total, explicando 34,29% da variação total e a segunda componente (Factor 2) está relacionada com as variáveis xilanase,  $\beta$ -glucosidase, atividade antimicrobiana e sobrevivência pancreática, explicando 19,92% da variação total.

Os isolados avaliados podem ser classificados em quatro diferentes grupos. No primeiro grupo incluiu-se a estirpe 7A, a qual apresentou a maior atividade

antimicrobiana. No segundo grupo, incluiu-se a estirpe 25A por apresentar a maior sobrevivência total. No terceiro grupo, incluíram-se as estirpes 8A, 37A e 3A. Contudo a estirpe 8A foi a que apresentou os menores valores para a atividade antioxidante e para a habilidade de autoagregação, enquanto que a estirpe 3A apresentou a maior sobrevivência à digestão gástrica. As restantes estirpes encontram-se incluídas no quarto grupo.



**Figura 9** -Biplot das componentes principais entre as variáveis analisadas e as estirpes de leveduras. AA: atividade antioxidante; Ag2h, Ag4h e Ag24h: autoagregação às 2, às 4 e às 24 horas, respetivamente; SG: sobrevivência à digestão gástrica (SG), pancreática(SP) e total (ST). Prot: protease; Xil: xilanase; B-gluc:  $\beta$ -glucosidase; Lip: lipase.

# ***CAPÍTULO 5***

## **Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros**



## 5. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

### 5.1. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho para a atividade enzimática mostraram o potencial uso das espécies *R. graminis* (20A), *R. glutinis* (27A), *C. norvegica* (7A), *P. guilliermondii* (25A) e *G. reessii* (33A) como produtoras da enzima  $\beta$ -glucosidase e das espécies *P. manshurica* (2A) e *S. cerevisiae* (15A e 15B) como fortes produtoras da enzima lipase. As enzimas protease, amilase e xilanase foram detetadas com fraca atividade em apenas alguns isolados.

Relativamente às propriedades biológicas que os microrganismos potencialmente probióticos devem exercer, encontra-se a capacidade de crescimento à temperatura corporal (37°C). As estirpes que mostraram melhor capacidade de crescimento a esta temperatura, similar a obtida para a estirpe probiótica de referência (*S. boulardii*) foram a 15B (*S. cerevisiae*), 1A (*C. tropicalis*) e 29A (*P. membranifaciens*).

Na avaliação da capacidade das estirpes de formarem agregados celulares e consequentemente de aderirem à parede intestinal, os resultados indicaram que os isolados 15A (*S. cerevisiae*), 1A (*C. tropicalis*) e 7A (*C. norvegica*) apresentaram ao fim de 24 horas percentagens de autoagregação superiores a 80%.

No que concerne à atividade antimicrobiana apenas duas estirpes (34A e 7A) apresentaram atividade antifúngica em relação ao microrganismo patogénico *Cryptococcus neoformans*. As restantes estirpes não manifestaram qualquer atividade em presença deste e de outros microrganismos testados (*C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*).

No que diz respeito à atividade antioxidante, os resultados indicaram maiores percentagens de redução de DPPH nas amostras 15A e 15B, ambas *S. cerevisiae* isoladas da salmoura, 16,47% e 18,34%, respetivamente.

Na avaliação da resistência às condições de *stress* do trato gastrointestinal, concluiu-se que todos os isolados apresentaram resistência à digestão gástrica, destacando-se as estirpes 3A (*C. tropicalis*) e 25A (*P. guilliermondii*), por apresentarem valores de 194,76% e de 179,43%, respetivamente, indicando que as condições ambientais do estômago não afetam estes microrganismos e por isso aumentaram o seu

efectivo populacional. Após exposição ao suco pancreático simulado, observou-se que todas as estirpes conseguiram também sobreviver, porém as estirpes 15B (*S. cerevisiae*) e 7A (*C. norvegica*) apresentaram percentagens de sobrevivência mais altas, sugerindo uma melhor adaptação a estas condições. Na avaliação da sobrevivência total, em que se considerou a contagem inicial das células no início do processo de simulação gástrica e a contagem de células no final da simulação pancreática, observou-se de novo que a estirpe 25A (*P. guilliermondii*) foi àquela que mais se destacou, por apresentar maior resistência em todo o processo digestivo simulado, com valor semelhante à estirpe de referência. A menor resistência foi detetada nas estirpes 37A (*C. boidinii*) e 15A (*S. cerevisiae*).

No sentido de aferir a relação entre os parâmetros e as leveduras testadas, realizou-se uma análise de componentes principais (PCA), onde não foi possível detetar estirpes com melhores características em todos os fatores analisados, tendo sido somente identificadas algumas estirpes com características particulares.

## 5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Face aos resultados obtidos e para um melhor conhecimento destas estirpes sugere-se análises adicionais para avaliar outras propriedades probióticas como a hidrofobicidade, uma vez que está ligada com a capacidade de autoagregação das estirpes, resistência a antibióticos, capacidade de aderência aos enterócitos Caco-2, e posteriormente a validação a partir de testes *in vivo*, em modelos animais, a fim de verificar-se os benefícios observados *in vitro*.

Entrando no quesito da possibilidade do uso das leveduras no processo fermentativo de azeitonas de mesa para uso como culturas *starter* e/ou com o objetivo de se obter um produto funcional probiótico seria de grande valia fazer testes adicionais a fim de verificar se as estirpes apresentam capacidade de resistir às condições adversas, nomeadamente a teores elevados de NaCl, às variações de pH e temperatura, bem como ao comportamento junto a bactérias ácido-lácticas presentes no processo fermentativo. Em relação à atividade enzimática sugere-se também ensaios adicionais quantitativos para melhor compreender e caracterizar estes isolados. Adicionalmente seria interessante realizar testes com intuito de identificar qual a substância tóxica que é

produzida no caso das estirpes 34A (*G. reessii*) e 7A (*C. norvegica*), que apresenta ação letal para o microrganismo *Cryptococcus neoformans*.



# ***CAPÍTULO 5***

## **Referências Bibliográficas**



## 6. Referências Bibliográficas

- Abbas, C. A. (2006). Production of antioxidants, aromas, colours, flavours and vitamins by yeasts. In A. Querol, & G. Fleet (Eds.). *Yeasts in food and beverages* (pp. 285–334), Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Alves, M. S. (2013). Microencapsulação de bactérias lácticas com potencial probiótico para produção de pasta de azeitona. *Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar/Qualidade Alimentar*. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 70 pp.
- Angelis, M. De, Campanella, D., Cosmai, L., Summo, C., Rizzello, C. G., & Caponio, F. (2015). Microbiota and metabolome of un-started and started Greek-type fermentation of Bella di Cerignola table olives. *Food Microbiology*, *52*, 18–30.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, *33*, 282–291.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, *128*, 189–196.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012a). Yeasts in table olive processing : Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, *160*(1), 42–49.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012b). Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 1–4.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Micoencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *63*, 685 – 690.
- Assouhoun-Djeni, N. M. C., Djeni, N. T., Messaoudi, S., Lhomme, E., Koussemo-Camara, M., Ouassa, T., Chobert, J. M., Onno, B., & Dousset, X. (2016).

Biodiversity, dynamics and antimicrobial activity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of maize flour for doklu production in Côte d ' Ivoire. *Food Control*, 62, 397–404.

Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 23–29.

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135–142. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.004>

Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-Lopez, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 89–96.

Battcock, M. (1998). Fermented and vegetables : A global perspective.(No. 134). *Food & Agriculture Org.*.

Bernardo, W. M., Aires, F. T., Carneiro, R. M., Sá, F. P. de, Rullo, V. E. V., & Burns, D. A. (2013). Effectiveness of probiotics in the prophylaxis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates : a systematic review. *Jornal de Pediatria*, 89(1), 18–24.

Bevilacqua, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2013). Selection of yeasts as starter cultures for table olives. *Journal of Food Science*, 78 (5), M742-M751.

Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, Panagou, E. Z., & Arroyo-López, F. N. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66–73.

Chen, L.-S., Ma, Y., Maubois, J.-L., Chen, L.-J., Liu, Q.-H., & Guo, J.-P. (2010). Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 47–54.

- Cichoski, A. J., Cunico, C., Di Luccio, M., Zitkoski, J. L., & Carvalho, R. T. De. (2008). Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 28(1), 214–219.
- Conway, P. L. (1996). Selection criteria for probiotic microorganisms. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 5: 10-14.
- Coppola, M. D. M., & Turnes, C. G. (2004). Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, 34(4), 1297–1303.
- Cordeiro, A. M., Calado, M. L., Morais, N., Miranda, A., & Carvalho, M. T. (2009). Negrinha de Freixo. *Vida Rural*, no.1746 - ano 56, p.21.
- Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–6.
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 767–778.
- Del Re, B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B., & Palenzona, D. L. (1998). Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 307–310.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 12 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 1, 438-442.
- Denipote, F. G., Trindade, E. B. S. de M., & Burini, R. C. (2010). Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. *Arq. Gastroenterol*, 47(1), 93–98.
- European Commission. (2014). Superfood Alert – probiotic olives for healthy gut. Horizon 2020. *The EU Frame Work Programme for Research and Innovation*. Disponível em: <http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020>. Acedido em Junho de 2016.

- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. World Health Organization, London, Ontario, Canada.
- FAO/WHO. (2003). Codex Standard for Fermented Milks. Codex Stan 243. Disponível em:  
[http://www.dairyconsultant.co.uk/pdf/codex\\_standard\\_fermented\\_milks\\_yogurts.pdf](http://www.dairyconsultant.co.uk/pdf/codex_standard_fermented_milks_yogurts.pdf). Acedido em Junho de 2016.
- FAO/WHO. (2006). Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food Nutrition Pap. 85. *Rome: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Furlan, R. L., Macari, M., & Luquetti, B. C. (2004). Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. *Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição*, 5, 6-28.
- García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., Cadiñanos, L. P. G. de, Requena, T., Peláez, C., & Martínez-Cuesta, M. C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57, 44–50.
- Garrido-Mesa, J., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Utrilla, M. P., Rodriguez-Cabezas, M. E., Zarzuelo, A., Ocete, M. A., Garrido-Mesa, N., & Galvez, J. (2015). A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmacological Research*, 97, 48–63.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1156–1162.
- Hassan, H. M. M. (2011). Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. *Journal World Applied Sciences*, 15(8), 1110–1119.
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–12.

- Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., & Fleet, G. H. (2001). Growth Medium for Culturing Probiotic Bacteria for Applications in Vegetarian Food Products.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., & Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, *24*, 346–351.
- IFIC. (2011). Background on Functional foods. *International Food Information Council Foundation*. Disponível em: [http://www.foodinsight.org/Background\\_on\\_Functional\\_Foods](http://www.foodinsight.org/Background_on_Functional_Foods). Acedido em Março de 2016.
- Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Fleischer, L. G., & Kurz, T. (2007). *In vitro* potential antioxidant activity of (1→3), (1→6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4710-4716.
- Jatobá, A., Vieira, F. do N., Neto, C. B., Silva, B. C., Mouriño, J. L. P., Jerônimo, G. T., Dotta, G., & Martins, M. L. (2008). Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesq. Agropec. Bras.*, *43*(9), 1201–1207.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *41*, 103–125.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., & Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, *94*, 981–987.
- Lima, F. W. (2014). Colonização e morfometria intestinal de lambaris-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* alimentados com dietas contendo levedura *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico. *Tese de Mestrado em Biologia Animal*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais. 50pp.
- Macedo, R. E. F., Pflanzler, S. B. Jr., Terra, N. N., & Freitas, R. J. S. (2008). Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, *28*(3), 509–519.
- Mahdhi, A., Hmila, Z., Behi, A., & Bakhrouf, A. (2011). Preliminary characterization

of the probiotic properties of *Candida famata* and *Geobacillus thermoleovorans*. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(3), 129–134.

Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 450–457.

Moreira, L. de P. P. F. (2013). Produção de azeitona de mesa ao natural lácticas potencialmente probióticas. *Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar*. Instituto Superior de Agronomia - Universidade de Lisboa, 81 pp.

Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients*, 2, 449–473.

Nogueira, F. A. M. (2012). Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos. Tese de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar - Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Bragança. 98pp.

Oliveira, M. N. De, Sivieri, K., Alegro, J. H. A., & Saad, S. M. I. (2002). Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(1), 1–21.

Pereira, E. L., Ramalhosa, E., Borges, A., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2015). Yeast dynamics during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.). *Food Microbiology*, 46, 582–586.

Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., & Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 31–42.

Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26–35.

Pessione, A., Bianco, G. Lo, Mangiapane, E., Cirrincione, S., & Pessione, E. (2015). Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria isolated from olives:

Evaluation of short chain fatty acids production and analysis of the extracellular proteome. *Food Research International*, 67, 247–254.

Pinos-Rodríguez, J. M., Robinson, P. H., Ortega, M. E., Berry, S. L., Mendoza, G., & Bárcena, R. (2008). Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* 1077 or *Saccharomyces boulardii* 1079. *Animal Feed Science and Technology*, 140, 223–232.

Pothoulakis, C., Kelly, C. P., Joshi, M. A., Gao, N., O'keane, C. J., Castagliuolo, I., & Lamont, J. T. (1993). *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* Toxin A Binding and Enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*, 104, 1108–1115.

Psani, M., & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 22, 1329–1336.

Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1–11.

Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation / storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27, 604–612.

Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2012). Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1761–1770.

Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., García-García, P., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2014). Fortification of table olive packing with the potential probiotic bacteria *Lactobacillus pentosus* TOMC-LAB2. *Frontiers in Microbiology*, 5(September), 1–9.

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

Samad, M., Razak, C., Salleh, A., Yunus, W. M. Z. W., Ampon, K., & Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological*

*Methods*, 9, 51-56.

- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives , with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1349–1354.
- Sourabh, A., Kanwar, S. S., & Sharma, O. P. (2011). Screening of indigenous yeast isolates obtained from traditional fermented foods of Western Himalayas for probiotic attributes. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2(8), 117–126.
- Souza, C. de V. A. de, Junior, R. H., Maia, K. D., Uzeda, M. De, & Weyne, S. de C. (2011). Efeitos do consumo diário de probiótico sobre a microbiota cariogênica. *Revista Brasileira de Odontologia*, 68(1), 128–131.
- Spier, M. R., Woiciechowski, A. L., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2006). Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Using Agro Industrials Products. *International Journal of Food Engineering*, 2(3), Art 6.
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Rensburg, P. Van. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by *non-Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 182–190.
- Syal, P., & Vohra, A. (2013). Probiotic potential of yeasts from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2), 390–398.
- Tataridou, M., & Kotzekidou, P. (2015). Fermentation of table olives by oleuropeinolytic starter culture in reduced salt brines and inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 208, 122–130.
- Trigueros, D. E. G., Fiorese, M. L., Kroumov, A. D., Hinterholz, C. L., Nadai, B. L., & Assunção, G. M. (2016). Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var . *boulardii*. *Biochemical Engineering Journal*, 110(1), 71–83.

- Vidon, N., Huchet, B. and Rambaud, J.-C. (1986). Influence de ‘*Saccharomyces boulardii*’ sur la sécrétion jejuna induite chez le rat par la toxine cholérique. *Gastroenterologie Clinique et Biologie* 10, 13—16.
- Viegas, R. P., Souza, M. R., Figueiredo, T. C., Resende, M. F. S., Penna, C. F. A. M., & Cerqueira, M. M. O. P. (2010). Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(2), 460–467.
- Whittenbury, R. (1964). Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *Journal Gen. Microbiology*, 35, 13–26.