

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Sobrevivência da levedura probiótica *Komagataella phaffii* cepa X-33 livre e microencapsulada aplicada em uma matriz alimentar não láctea

Ediane Deijaly dos Santos

Pelotas, 2024

Ediane Deijaly dos Santos

Sobrevivência da levedura probiótica *Komagataella phaffii* cepa X-33 livre e microencapsulada aplicada em uma matriz alimentar não láctea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Linha de pesquisa: Tecnologia e Inovação de Alimentos.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Patrícia Silva Diaz

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Pelotas, 2024.

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S237s Santos, Ediane Deijaly dos

Sobrevivência da levedura probiótica *Komagataella phaffii* cepa X-33 livre e microencapsulada aplicada em uma matriz alimentar não láctea [recurso eletrônico] / Ediane Deijaly dos Santos ; Patrícia Silva Diaz, orientadora ; Ângela Maria Fiorentini, coorientadora. — Pelotas, 2024.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. *Pichia pastoris*. 2. Tolerância trato gastrointestinal. 3. *Spray drying*. 4. Armazenamento. 5. Resistência térmica. I. Diaz, Patrícia Silva, orient. II. Fiorentini, Ângela Maria, coorient. III. Título.

CDD 664.68

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Ediane Deijaly dos Santos

**Sobrevivência da levedura probiótica *Komagataella phaffii* cepa X-33 livre e
microencapsulada aplicada em uma matriz alimentar não láctea**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 21 de agosto de 2024.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Silva Diaz (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini (Co-orientadora)
Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^a. Dr^a. Ângela Nunes Moreira
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof^o. Dr^o. Fabrício Rochedo Conceição
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

A minha família dedico com todo amor essa grande conquista! Tudo por mim e por vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e espiritualidade, por cuidar tão bem do meu caminho e está constantemente presente, minha eterna gratidão por permitir alcançar vãos inimagináveis.

Aos meus Pais, o abrigo cheio de paz e luz, obrigada por tamanho amor e dedicação, por estarem tão presentes, mesmo longe, durante esses momentos nas terras Gaúchas. Grande inspiração de vida, meus Mestres, meus Doutores, minha Mainha e meu Painho. Ao meu Irmão, meu anjo nessa “colônia”, Cunhada, minha confidente e conselheira, agradeço por todo incentivo e apoio. Meu Sobrinho, meu imenso amor, és minha maior motivação para continuar acreditando que tudo é possível diante da vontade de Deus. Essa conquista é nossa. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu parceiro de vida, Leandro, obrigada por todo companheirismo, acolhimento, lealdade e por ter acreditado que eu chegaria até aqui. Você faz parte dessa conquista.

Ao meu grande amigo Thadeu e tenda TUPV, que ao longo desse período foram imprescindíveis, agradeço pela amizade, orações e ensinamentos de todas as horas. Axé a todos os espíritos de luz que me protegem e guiam!

Aos demais familiares e toda família do Leandro, meus amigos que estão longe e aqueles que aqui em terras Gaúchas encontrei, obrigada pela força e carinho.

À orientadora Prof^a. Dr^a. Patrícia Diaz, obrigada pela oportunidade e ensinamentos, me proporcionou desbravar descobertas com um “grande presente”. À co-orientadora Prof^a. Dr^a. Ângela Fiorentini, obrigada por tamanha atenção e ensinamentos transmitidos. Aos colegas do Laboratório TecBio, agradeço pelos momentos que compartilhamos, disponibilidade e auxílio em todas as etapas desse trabalho e pelos ensinamentos ofertados por vocês. Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e a Universidade Federal de Pelotas (UFPel), agradeço pela oportunidade, estrutura e conhecimentos adquiridos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e todo incentivo por fazer pesquisa nesse País.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa, muito obrigada. Deus esteja com todos vocês!

“Que eu dê água a outro homem, não porque eu tenha água, mas porque, também eu, sei o que é sede”.

Clarisse Lispector.

RESUMO

SANTOS, Ediane Deijaly Dos. **Sobrevivência da levedura probiótica *Komagataella phaffii* cepa X-33 livre e microencapsulada aplicada em uma matriz alimentar não láctea.** Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Silva Diaz. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

As leveduras têm sido consideradas importantes probióticos no microbioma humano e animal e alguns estudos vêm demonstrando seu potencial probiótico em matrizes alimentares não lácteas. A procura por produtos de base não láctea passou a vigorar nos últimos anos para disponibilizar uma opção às pessoas que apresentam intolerância e/ou alergia aos componentes do leite, bem como aquelas que, por opção, não ingerem produtos de origem animal. A levedura *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*, antes descrita *Pichia pastoris*) teve seu efeito probiótico evidenciado por alguns estudos, promovendo benefícios ao animal quanto à estimulação do crescimento, imunidade e suprimindo eventuais deficiências nutricionais. Este estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência de *K. phaffii* cepa X-33 livre e microencapsulada quanto a passagem pelo trato gastrointestinal simulado, armazenamento em diferentes temperaturas e resistência ao tratamento térmico, bem como quando aplicada a uma matriz alimentar não láctea durante o armazenamento sob refrigeração. Para isto as leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* foram cultivadas no biorreator em meio YPD com sacarose e após adicionadas aos materiais encapsulantes, inulina e proteína de arroz. As microcápsulas produzidas por *spray drying* apresentaram viabilidade para *K. phaffii* de $11,1 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ e $11,0 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ para *S. boulardii*, com eficiência de encapsulamento de 95,7% para ambas as leveduras. As células viáveis das leveduras livres e microencapsuladas permaneceram estáveis por 60 dias de armazenamento ($> 8,0 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) nas diferentes temperaturas analisadas (-20°C , 4°C e 25°C), porém as microcápsulas com *S. boulardii* aos 60 dias não estavam viáveis e as formas livres de ambas as leveduras apresentaram maiores taxas de sobrevivência. As formas livres das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* também apresentaram maior sobrevivência às condições gastrointestinais comparada às microcápsulas e, mesmo depois de passarem pelas condições gástricas, com concentrações de células viáveis superiores às condições intestinais, as leveduras livres sobreviveram a uma concentração acima de $10 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ nas condições intestinais. Na avaliação da resistência térmica, a microencapsulação protegeu somente *S. boulardii*, e *K. phaffii* livre teve sobrevivência significativamente maior do que as leveduras microencapsuladas, enquanto *S. boulardii* livre não resistiu. As leveduras apresentaram potencial para serem aplicadas em alimento, pois *K. phaffii* livre permaneceu com taxa de sobrevivência adequada até os 28 dias ($9,8 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) em leite de castanha, assim como *S. boulardii*. Diante disso, pode-se compreender que *K. phaffii* livre apresentou taxas de sobrevivência superiores a *S. boulardii* e as suas formas encapsuladas e ainda manteve suas concentrações acima de $6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, apresentando potencial para obtenção de um produto probiótico ou funcional não lácteo, independente da microencapsulação e novos estudos poderão ser realizados quanto à aplicação de *K. phaffii* em alimentos e microencapsulação.

"Palavras-chave:" *Pichia pastoris*; tolerância trato gastrointestinal; *spray drying*; armazenamento; resistência térmica.

ABSTRACT

SANTOS, Ediane Deijaly Dos. **Survival of free and microencapsulated probiotic yeast *Komagataella phaffii* strain X-33 applied in a non-dairy food matrix.** Advisor: Prof^a Dr^a Patrícia Silva Diaz. 2024. Dissertation (Master's in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Yeasts have been considered important probiotics in the human and animal microbiome, and some studies have demonstrated their probiotic potential in non-dairy food matrices. The demand for non-dairy-based products has increased in recent years, offering an option for people with intolerance and/or allergies to dairy components, as well as those who, by choice, do not consume animal-based products. The yeast *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*, previously described as *Pichia pastoris*) has been shown to have probiotic effects by some researchers, promoting benefits such as growth stimulation, immunity enhancement, and addressing potential nutritional deficiencies in animals. This study aimed to evaluate the survival of free and microencapsulated *K. phaffii* strain X-33 during passage through a simulated gastrointestinal tract, storage at different temperatures, and resistance to heat treatment, as well as when applied to a non-dairy food matrix during refrigerated storage. For this, *K. phaffii* and *S. boulardii* yeasts were cultivated in a bioreactor in YPD medium with sucrose and then added to encapsulating materials, inulin, and rice protein. The microcapsules produced by spray drying showed viability for *K. phaffii* of 11,1 log CFU.g⁻¹ and 11,0 log CFU.g⁻¹ for *S. boulardii*, with an encapsulation efficiency of 95,7% for both yeasts. Viable cells of free and microencapsulated yeasts remained stable for 60 days of storage (> 8.0 log CFU.g⁻¹) at different temperatures analyzed (-20°C, 4°C, and 25°C), but the microcapsules with *S. boulardii* were no longer viable after 60 days, and the free forms of both yeasts showed higher survival rates. The free forms of *K. phaffii* and *S. boulardii* also showed higher survival rates under gastrointestinal conditions compared to the microcapsules, and even after passing through gastric conditions, with viable cell concentrations higher than under intestinal conditions, the free yeasts survived at concentrations above 10 log CFU.g⁻¹ under intestinal conditions. In the heat resistance evaluation, microencapsulation protected only *S. boulardii*, and free *K. phaffii* had significantly greater survival than microencapsulated yeasts, while free *S. boulardii* did not survive. The yeasts showed potential for application in food, as free *K. phaffii* maintained an adequate survival rate up to 28 days (9.8 log CFU.g⁻¹) in cashew milk, as did *S. boulardii*. Thus, it can be understood that free *K. phaffii* showed higher survival rates than *S. boulardii* and its encapsulated forms, maintaining concentrations above 6 log CFU.g⁻¹, showing potential for the development of a non-dairy probiotic or functional product, regardless of microencapsulation. Further studies can be conducted on the application of *K. phaffii* in foods and microencapsulation.

"Keywords:" *Pichia pastoris*; tolerance gastrointestinal tract; spray drying; storage; thermal resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do funcionamento da secagem por <i>spray drying</i> .	31
Figura 2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das microcápsulas com leveduras microencapsuladas com proteína de arroz e inulina por <i>spray drying</i> após 20 dias de armazenamento a 4 °C.	52
Figura 3	Sobrevivência das leveduras <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> , livres e microencapsuladas, durante 60 dias de armazenamento nas temperaturas de congelamento, -20 °C (a), refrigeração, 4 °C (b) e ambiente, 25 °C (c).	55
Figura 4	Microcápsulas de <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> sob armazenamento de 60 dias e temperatura de 25 ± 1 °C (ambiente).	57
Figura 5	Linha do tempo da taxa de sobrevivência (log UFC.g ⁻¹) de <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> livres sob armazenamento de nove meses e temperatura de 4 ± 1 °C (refrigeração).	59
Figura 6	Sobrevivência das leveduras <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> , livres e microencapsuladas e alterações de pH durante o armazenamento a 4 °C em leite de castanha.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produtividade da biomassa celular e contagem das células viáveis das leveduras <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> após três fermentações.	48
Tabela 2	Sobrevivência das leveduras <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> após ruptura das microcápsulas através da imersão em PBS ou fluidos gástricos simulados durante três tempos de exposição a 37 °C.	50
Tabela 3	Sobrevivência das leveduras <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> e eficiência do encapsulamento após <i>spray drying</i> .	51
Tabela 4	Sobrevivência das leveduras <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> , livres e microencapsuladas expostas às condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i> .	61
Tabela 5	Resistência ao tratamento térmico de <i>K. phaffii</i> e <i>S. boulardii</i> , livres e microencapsuladas.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
EE	Eficiência do encapsulamento
GRAS	Generally Recognized as Safe
<i>K. phaffii</i>	<i>Komagataella phaffii</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>S. boulardii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
log UFC.g ⁻¹	log Unidade Formadora de Colônia por grama
TGI	Trato gastrointestinal
YPD	Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Microbiota Intestinal	17
2.2 Probióticos	19
2.2.1 Leveduras probióticas	22
2.3 <i>Komagataella phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>)	24
2.4 Microencapsulação	27
2.4.1 Microencapsulação por <i>spray drying</i>	30
2.4.2 Materiais encapsulantes	32
2.5 Alimentos funcionais	36
2.5.1 Probióticos em alimentos	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Condições de cultivo e fermentação de <i>K. phaffii</i>	41
4.2 Microencapsulação das leveduras	42
4.3 Teste de rompimento das microcápsulas e eficiência do encapsulamento	42
4.3.1 Teste de rompimento das microcápsulas	42
4.3.2 Eficiência do encapsulamento	43
4.4 Morfologia das microcápsulas	43
4.5 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas sob armazenamento, condições gastrointestinais simuladas, resistência térmica e aplicada em matriz alimentar	44
4.5.1 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas sob armazenamento em diferentes temperaturas	44
4.5.2 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas sob condições gastrointestinais simuladas	45
4.5.3 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas quanto à resistência térmica sob diferentes tempos e temperaturas	45
4.5.4 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas aplicada a matriz alimentar	46
4.6 Análises estatísticas	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Produtividade da biomassa celular e contagem das células viáveis após a fermentação	48
5.2 Teste de ruptura das microcápsulas, sobrevivência e eficiência do encapsulamento	49
5.3 Morfologia das microcápsulas	52
5.4 Sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas sob armazenamento em diferentes temperaturas	53
5.5 Sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas sob simulação quanto às condições gastrointestinais	60
5.6 Resistência térmica das leveduras livres e microencapsuladas sob diferentes temperaturas	62
5.7 Sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas aplicadas a uma matriz alimentar sob armazenamento	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7 MANUSCRITO 1	69
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O interesse em adquirir hábitos de vida saudáveis e o consumo de alimentos capazes de auxiliar na manutenção da saúde, com prevenção das doenças, tem atraído a atenção da população, comunidade científica e indústria alimentícia. Estudos demonstram que a dieta é o principal fator determinante da microbiota intestinal, a curto e longo prazo. Como o intestino humano está envolvido em uma ampla gama de funções fisiológicas, espera-se que sua modulação previna as doenças correspondentes (QUIGLEY; GAJULA, 2020; HOU *et al.*, 2022).

Os efeitos benéficos de certos microrganismos em manter a microbiota saudável vêm despertando interesse e, segundo Miller *et al.* (2016), os probióticos administrados restauram a disbiose microbiana e mantêm o equilíbrio microbiano intestinal, aderindo à mucosa intestinal do hospedeiro e prevenindo a colonização de bactérias patogênicas.

Conforme Das *et al.* (2022), as leveduras têm sido consideradas importantes probióticos no microbioma humano e animal, e algumas das suas características incluem capacidade de autoagregação, coagregação, hidrofobicidade da superfície celular, tolerância ao trato gastrointestinal (TGI) e produção de substâncias antimicrobianas e outros metabólitos.

Komagataella phaffii (*K. phaffii*; anteriormente descrita como *Pichia pastoris*) é uma espécie de levedura relevante para a produção industrial de proteínas (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005; BUSTOS *et al.*, 2022), pertencente à família *Saccharomycetaceae* (MORIKAWA *et al.*, 2007). O efeito probiótico da *K. phaffii* tem sido evidenciado por alguns estudiosos, onde a levedura demonstrou benefícios aos animais no que se refere a estimulação do crescimento e imunidade, resistindo às condições do TGI, proteção contra patógenos, estabilidade na alimentação dos animais, sob armazenamento em refrigeração e efeito antidepressivo promissor (GIL DE LOS SANTOS *et al.*, 2012; FRANÇA *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2015; GIL DE LOS SANTOS *et al.*, 2018; GABOARDI *et al.*, 2019; BIRMANN *et al.*, 2021).

Entretanto, conseguir fornecer e manter a quantidade mínima necessária de células probióticas viáveis para conferir quaisquer efeitos positivos à saúde é um grande desafio, considerando sua sensibilidade ao processamento/armazenamento do

alimento e entrega na região intestinal (BARRO *et al.*, 2021). Isso porque, para apresentar a funcionalidade probiótica ideal, os probióticos devem sobreviver à passagem através do TGI, atingindo 10^6 a 10^7 UFC g⁻¹, como recomendado, no ponto de entrega do organismo do hospedeiro, bem como no alimento, até o final da vida útil do produto (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Barro *et al.* (2021) destacam que a microencapsulação é um método promissor para proteger as células probióticas contra as condições adversas que elas podem enfrentar, tanto no organismo do hospedeiro como no alimento. Como materiais encapsulantes dessas células, a inulina tem atraído atenção em virtude dos benefícios de natureza prebiótica, demonstrando melhoria da sobrevivência e viabilidade das células durante o armazenamento do produto e devido à sua baixa capacidade de hidrólise quando presente no TGI (FAYED *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2016), e a proteína de arroz, por ser uma proteína vegetal com aminoácidos essenciais e causar menos alergias ao ser humano (NESTERENKO *et al.*, 2014; GOMES; KUROSZAWA, 2020).

Muitas culturas probióticas estão disponíveis para aplicação em matrizes alimentares com o objetivo de desenvolver novos produtos funcionais (CHAMPAGNE *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). A procura por probióticos em matrizes não lácteas, baseadas em frutas, vegetais e cereais (RANADHEERA *et al.*, 2018), passou a vigorar nos últimos anos para disponibilizar uma opção às pessoas que apresentam intolerância e/ou alergia aos componentes do leite, bem como aquelas que não ingerem produtos de origem animal (PERRICONE *et al.*, 2015; MONTEMURRO *et al.*, 2021) e que buscam uma manutenção saudável da microbiota intestinal e qualidade de vida.

A avaliação do aumento da resistência de *K. phaffii* X-33, através de sua microencapsulação, e da sua sobrevivência em matriz alimentar não láctea (vegetal), torna-se inovadora e promissora para a ciência e tecnologia de alimentos.

Para tanto, avaliou-se a sobrevivência de *K. phaffii* X-33 livre e microencapsulada sob variadas temperaturas de armazenamento, passagem pelo TGI simulado e resistência ao tratamento térmico, bem como a eficiência e o rendimento da microencapsulação e, por conseguinte a sobrevivência durante armazenamento sob refrigeração quando aplicada a uma matriz alimentar não láctea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal referida como um órgão funcional, dentro de outro órgão, com extensa atuação sobre o organismo, pode influenciar na saúde do hospedeiro (TENGLER; KOZICZ; KILIAAN, 2018). É um sistema complexo e dinâmico, composto por trilhões de microrganismos que desempenham um papel importante na manutenção da homeostase do organismo (ECKBURG *et al.*, 2005; CRYAN; BOEHME; DINAN; 2019).

Conforme Fassarella *et al.* (2021), essa comunidade microbiana que habita o TGI é dinâmica e diversificada, e sua composição pode variar significativamente entre indivíduos e ao longo da vida, onde essas variações são influenciadas por diversos fatores, como estilo de vida, idade, dieta e estado de saúde geral. Geralmente, a diversidade da microbiota aumenta no período entre a infância e a idade adulta e diminui na idade avançada (acima dos 70 anos) (RINNINELLA *et al.*, 2019).

Além disso, a microbiota intestinal varia em diferentes regiões anatômicas do TGI (FLINT, *et al.*, 2012). No intestino delgado, o tempo de trânsito é curto e a concentração de bile é alta, enquanto no cólon, fluxos são mais lentos e o pH mais ameno. Assim, comunidades microbianas maiores, especialmente do tipo anaeróbico, são comumente observadas no cólon (MILANI *et al.*, 2017).

Fan e Pedersen (2021) referem que em condições saudáveis, a microbiota intestinal apresenta estabilidade, resiliência e interação simbiótica com o hospedeiro, demonstrando frequentemente elevada diversidade taxonômica e elevada riqueza genética microbiana.

Pesquisas indicam que a desregulação da microbiota intestinal, conhecida como disbiose, está intimamente ligada a uma ampla variedade de doenças, incluindo doenças inflamatórias intestinais, obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares (KAUR *et al.*, 2021), câncer, doenças respiratórias, distúrbios cerebrais, doenças renais crônicas e doenças hepáticas (HOU *et al.*, 2022).

Essas evidências ressaltam a importância de manter um equilíbrio saudável da microbiota intestinal como uma estratégia essencial para a prevenção dessas condições (KORF *et al.*, 2022; RUEDA-RUZÁFA *et al.*, 2020; BRYNIARSKI. *et al.*, 2019).

Sabe-se que nas últimas décadas, a microbiota intestinal foi identificada como um regulador chave do eixo intestino-cérebro (HOU *et al.*, 2022). Os pesquisadores chegaram então ao consenso de que esse eixo é bidirecional. Por um lado, a distensão intestinal ativa vias-chave dentro do cérebro, enquanto, por outro lado, tais vias estão envolvidas com distúrbios intestinais, por exemplo, a síndrome do intestino irritável (SII) (FARMER; AZIZ, 2014).

No que diz respeito ao sistema imunológico, a microbiota humana não só protege o hospedeiro de agentes patogênicos externos através da produção de substâncias antimicrobianas, mas também serve como um componente significativo no desenvolvimento da mucosa intestinal e do sistema imunológico (HOU *et al.*, 2022).

Dessa forma, conforme Quigley e Gajula (2020), a dieta é considerada o principal agente regulador da microbiota intestinal a curto e longo prazo. Como o intestino humano está envolvido em uma ampla gama de funções fisiológicas, espera-se que sua modulação previna as doenças correspondentes (HOU *et al.*, 2022).

Os efeitos benéficos de certos microrganismos em manter a microbiota saudável e de prevenir doenças vêm despertando interesse na comunidade científica. Miller, *et al.* (2016) referem que a administração de probióticos restaura a disbiose microbiana e mantem o equilíbrio microbiano intestinal, aderindo às células da mucosa do hospedeiro e prevenindo a colonização de bactérias patogênicas. E extensas pesquisas sugerem que os mecanismos potenciais dos probióticos para trazer benefícios no tratamento de doenças, incluem diferenças em várias cepas probióticas e no sistema imunológico da mucosa, regulação do metabolismo do hospedeiro ou alteração da função neuromuscular intestinal.

Entre os diversos componentes da microbiota intestinal, as bactérias têm sido o foco principal das pesquisas até agora (GOMES *et al.*, 2020). No entanto, novas evidências sugerem que as leveduras também desempenham um papel significativo na saúde intestinal (UNDERHILL *et al.*, 2022). Esses microrganismos unicelulares eucarióticos,

conhecidos como leveduras, estão presentes em diversos habitats, incluindo o TGI humano (SHERWANI; BUKHARI, 2022).

Com isso, segundo Sambrani *et al.* (2021) é necessário ampliar o escopo de estudos microbiológicos para além das bactérias e compreender a diversidade, papel funcional das leveduras no ecossistema intestinal, podendo assim contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais abrangentes e eficazes, direcionadas à modulação da microbiota visando promover a saúde intestinal.

2.2 Probióticos

O conceito de probióticos foi introduzido pela primeira vez em 1907, quando o imunologista russo Elie Metchnikoff sugeriu que as bactérias produtoras de ácido láctico em leite fermentado poderiam conferir benefícios à saúde humana, e, assim, abriu-se o caminho para pesquisas sobre os seus potenciais efeitos benéficos (BERBEL *et al.*, 2016).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; HILL, *et al.*, 2014). Um microrganismo para ser considerado probiótico deve ser viável, benéfico à saúde humana; apresentar propriedades não patogênicas; ser resistente ao processamento tecnológico; apresentar-se como células viáveis e em quantidades adequadas; resistir às condições adversas do trato gastrointestinal, sobrevivendo aos efeitos do ácido clorídrico e dos sais biliares produzidos pelo sistema digestório; preferencialmente colonizar o intestino, mesmo que temporariamente; produzir substâncias antimicrobianas e apresentar influência sobre o sistema imunológico e as atividades metabólicas (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013; BRANDÃO, 2013).

A população microbiana comumente utilizada como probióticos é diversa e segundo Markowiak e Slizewska (2017) podem conter uma ou mais cepas microbianas selecionadas, pertencendo aos seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Além disso, cepas de bactérias Gram-

positivas pertencentes ao gênero *Bacillus* e algumas cepas de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* são comumente usadas como probióticos.

Os probióticos estão presentes no cotidiano na forma de suplementos alimentares (cápsulas, comprimidos ou suspensões aquosas) ou ainda incorporados em alimentos, como algumas fórmulas infantis, leites fermentados, iogurtes, queijos frescos ou sucos de frutas (CALATAYUD, 2021). No Brasil, sua comercialização está regulamentada através da Resolução RDC 241/2018 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2018) e instruções pelo Guia nº 21/2021 (BRASIL, 2021), conforme se devem avaliar três elementos principais: a comprovação inequívoca da identidade da linhagem do microrganismo, sua segurança e efeito benéfico, sendo o maior desafio a manutenção de sua viabilidade durante a etapa de processamento (SILVA JÚNIOR; GONZALEZ, 2022).

Entre as limitações para o uso correto de probióticos estão: as baixas definições de doses terapêuticas, variabilidades da microbiologia das cepas e fatores como tempo de utilização e técnicas invasivas e com alto custo de coleta de amostras, bem como a dificuldade de isolar e fornecer algumas cepas (FERREIRA; LIMA; FORTES, 2021). As recomendações para o uso de probióticos, principalmente na prática clínica, devem relacionar as cepas específicas com benefícios declarados a partir de estudos em seres humanos (CAMARGO; HUTH, 2021).

Sabe-se que um dos principais requisitos para seleção de probióticos, segundo Silva Júnior e Gonzalez (2022) é a capacidade de aderência à mucosa intestinal, que é considerada um pré-requisito para a colonização e otimização do sistema Imunológico. A ação destes microrganismos sobre os hospedeiros depende da quantidade da espécie existente no intestino, do tempo de permanência e do tempo no qual se mantém viáveis.

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no artigo 5º da Instrução Normativa nº 76, em seu Anexo III, estabelece que a quantidade mínima viável de probióticos, que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares, deve estar na faixa de 10^8 a 10^{10} UFC/g, na recomendação diária do produto para consumo (BRASIL, 2020).

Estudos diversos têm fornecido evidências clínicas dos benefícios gerados pelos probióticos em numerosas condições como, por exemplo, diarreia aguda (LEE *et al.*, 2015), intolerância à lactose (ALMEIDA *et al.*, 2012), doenças inflamatórias intestinais (CLARKE *et al.*, 2012) e efeitos adversos do uso de antibióticos (MAZIADÉ *et al.*, 2015). Além das afecções associadas ao TGI, também tem sido mostrado sua utilidade no tratamento de doenças alérgicas (ISOLAURI *et al.*, 2012) e na prevenção do câncer (NAMI *et al.*, 2014), além de melhorar a utilização de nutrientes e, por conseguinte, o valor nutricional dos alimentos (SAAD *et al.*, 2013).

Conforme Borges e Abreu (2020) estes microrganismos contribuem para a modulação do sistema imune, através da limitação da colonização patogênica e do controle de alterações inflamatórias, intestinais e alterações no metabolismo. Isto se deve ao fato, segundo Guillot (2020) de que a microbiota intestinal e seu microbioma atuam como reguladores chave de distintas funções no organismo humano, tendo no eixo microbioma-intestino-cérebro diversas ações no desenvolvimento e fisiologia cerebral.

De acordo com Ferreira, Lima e Fortes (2021), vários estudos apresentaram o efeito imunoestimulante dos probióticos, que pode estar associado a diversos fatores, tais como: a capacidade destes microrganismos interagirem com as placas de Payer, presentes no intestino, que resulta na estimulação dos linfócitos B, na produção de IgA e no favorecimento da atividade fagocitária inespecífica dos macrófagos alveolares, o que sugere que exista uma ação sistêmica, por secreção de mediadores que estimulam o sistema Imune.

Entre outros efeitos também se constata na literatura outros benefícios relacionados à importância dos probióticos para o tratamento de doenças crônicas como o câncer, a hipertensão e hipercolesterolemia, além de doenças inflamatórias intestinais e alergias alimentares (SILVA JÚNIOR; GONZALEZ, 2022). Alguns autores também apontam seus benefícios para o tratamento da COVID-19 (SUNDARARAMAN *et al.*, 2020). Em relação aos pacientes submetidos a tratamentos oncológicos, estes microrganismos podem possibilitar novas formas de tratamento, sem a necessidade do uso desenfreado de fármacos, o que contribui para a melhora da imunidade e no

enfrentamento de consequências decorrentes de novos hábitos da sociedade ocidental nas últimas décadas (CAMARGO; HUTH, 2021; MAIA; FIORIO; SILVA, 2018).

Vale também ressaltar que alguns autores defendem que a regulação da microbiota intestinal ocorre de maneira mais efetiva não através do consumo de probióticos, mas através de fontes como os alimentos, por meio de ajustes na dieta, o que evitaria problemas decorrentes de competições por sobrevivência com a microbiota primitiva (YANG *et al.*, 2019). Já outros defendem o uso de novas abordagens probióticas personalizadas, como os pós-bióticos, ou seja, o uso de metabólitos ou fragmentos derivados de microrganismos, que também desempenham papel vital na maturação do sistema imunológico (ZMORA *et al.*, 2018; ŻÓŁKIEWICZ *et al.*, 2020).

2.2.1 Leveduras Probióticas

As leveduras são microrganismos que pertencem ao reino Fungi e apresentam características morfológicas distintivas. Elas possuem uma parede celular rígida, de formato oval ou esférico, núcleo organizado com membrana nuclear e são capazes de se reproduzir tanto por métodos sexuais quanto assexuais, utilizando células especializadas conhecidas como esporos e brotamento (MOREIRA *et al.*, 2015).

São células eucarióticas amplamente utilizadas para a expressão de várias proteínas na produção de vacinas e produtos farmacêuticos. O mecanismo de expressão de proteínas nesses microrganismos é semelhante ao das células mamíferas. Em comparação com as bactérias, as células de leveduras apresentam vantagens, como velocidade de crescimento, modificação pós-traducional, expressão secretória e fácil manipulação genética (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020). Ainda, o tamanho das leveduras, que é 10 vezes maior do que o das bactérias e representa menos de 0,1% da microbiota intestinal, pode permitir uma melhor cobertura ao longo do TGI devido sua maior dimensão (HSIUNG *et al.*, 2021).

Das *et al.* (2022) referem que as leveduras têm sido consideradas importantes probióticos no microbioma humano e animal e suas características incluem autoagregação, coagregação, hidrofobicidade da superfície celular, tolerância ao TGI,

assimilação de colesterol, produção de exopolissacarídeos (EPS), produção de substâncias antimicrobianas e metabólitos.

Desde a década de 1950, a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) está disponível comercialmente, e a pesquisa clínica que a utilizou em 1977 mostrou de forma convincente sua natureza não patogênica para uso seguro (MCFARLAND, 2010). Muitos estudos indicam as propriedades da *S. boulardii* para tratar vários distúrbios do trato gastrointestinal, especialmente causados por patógenos como infecções por *Helicobacter pylori*, *Salmonella* e *Clostridium difficile* (HUDSON *et al.*, 2016). Esta cepa poderia fornecer melhor proteção contra infecções microbianas, bem como compostos tóxicos que poderiam prevenir danos às células epiteliais intestinais (CAPECE *et al.*, 2018).

Segundo Khatri *et al.* (2017) os agrupamentos filogenéticos de *S. boulardii* estão intimamente relacionados com cepas de *S. cerevisiae*. A prevalência de cepas de *Saccharomyces* no TGI humano é óbvia, dado que células vivas de *S. cerevisiae* e outros organismos relacionados têm sido consumidos intencionalmente por humanos há milhares de anos na forma de pão, cerveja e outros alimentos e bebidas fermentados. No entanto, apenas algumas cepas de *S. cerevisiae* demonstraram benefícios à saúde em humanos (FERNANDEZ-PACHECO *et al.*, 2018).

Arevalo-Villena *et al.* (2017) ressaltam que para fazer alimentos fermentados, cepas de leveduras têm sido utilizadas como cultura iniciadora. Durante este processo de fermentação, o probiótico pode produzir metabólitos secundários, como ácidos graxos, ésteres, acetatos e álcoois que conferem melhor aroma aos alimentos e bebidas. Isso melhora a qualidade geral dos alimentos que sofreram fermentação. As culturas iniciadoras pertencem, praticamente, às espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces*.

Segundo Agarbati *et al.* (2020), leveduras isoladas de laticínios e habitats naturais foram reconhecidas como probióticos, além de *Saccharomyces*, outros gêneros como *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* e *Pichia*, sendo que a lista de leveduras com potencial probiótico está em constante expansão, e *S. boulardii* ainda é a única levedura probiótica com um quadro regulamentar e ampla aceitabilidade comercial como suplemento.

Outras vantagens cruciais das leveduras probióticas incluem o aumento da ingestão alimentar, o fortalecimento do sistema imunológico, a prevenção de doenças gastrointestinais, a redução dos níveis de colesterol no sangue e, mais significativamente, a redução da ocorrência de câncer de cólon (SABER *et al.*, 2017). Na prevenção do câncer colorretal, leveduras probióticas como *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* e *S. cerevisiae* var. *bouardii* podem ter características anticancerígenas (SAMBRANI *et al.*, 2021).

Um dos motivos pelo qual o uso de leveduras como probióticos tem avançado é a sua resistência a antibacterianos. Os antibacterianos atuam principalmente ligando-se a células bacterianas, afetando células procariotas e essa resistência das leveduras é mais um benefício, pois a principal vantagem da terapia com probióticos é a ausência de efeitos colaterais, como a seleção de bactérias resistentes. Assim, os efeitos das leveduras probióticas devem ser semelhantes aos da microbiota normal do corpo humano (SHRUTHI *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2022).

2.3 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

A levedura metilotrófica *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*; anteriormente descrita como *Pichia pastoris*), é uma das principais plataformas para a produção de proteínas recombinantes (rProt). Como levedura metilotrófica, ela tem a capacidade de oxidar metanol para a geração de energia e formação de biomassa. Devido à sua facilidade de crescimento em meios de cultura relativamente baratos, foi inicialmente utilizada como fonte de proteína unicelular (SCP, *single-cell protein*). Com o tempo, tornou-se um sistema hospedeiro atraente para a produção de rProt de origens bacterianas, fúngicas, vegetais e mamíferas/humanas (KURTZMAN, 2009; AHMAD *et al.*, 2014; MACCANI *et al.*, 2014; PEÑA *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2019; BUSTOS *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2020).

Historicamente, segundo Zahrl *et al.* (2017), a levedura *K. phaffii* foi isolada pela primeira vez em 1920 por Guilliermond dos exsudatos de uma castanheira na França e foi nomeado *Zygosaccharomyces pastoris*. Num instante, foi categorizado o organismo para um novo gênero, *Komagataella* ou *Pichia* (YAMADA, *et al.*, 1995; NAUMOV; NAUMOVA; BOUNDY-MILLS, 2018), pertencente à família *Saccharomycetaceae* (MORIKAWA *et al.* 2007).

As principais vantagens deste organismo são a possibilidade de realizar fermentação de alta densidade de acordo com protocolos estabelecidos, engenharia genética flexível e adaptada para automação (BAGHBAN *et al.* 2018), modificações pós-traducionais eucarióticas (LAUKENS *et al.*, 2020; LAUKENS *et al.*, 2015), alta eficiência na secreção de proteínas e elevados rendimentos de biomassa, podendo atingir concentrações de biomassa superiores a 100 g/L de peso seco de células (HENRÍQUEZ *et al.*, 2019; HEISTINGER *et al.*, 2020; RASCHMANOVÁ *et al.*, 2021; MOHAMMADZADEH *et al.*, 2021).

K. phaffii possui morfologia celular oval ou esférica e é capaz de realizar glicosilação de proteínas de forma controlada, semelhante a células de mamíferos, o que a torna ideal para aplicações biotecnológicas. Sua parede celular robusta, composta por glucanos, quitina e manoproteínas, oferece resistência a estresses osmóticos e ambientais. A membrana celular, rica em esfingolipídios e ergosterol, e o aparelho de Golgi empilhado, conferem estabilidade e adaptação a condições adversas, como a presença de metanol (CEREGHINO; CREGG, 2000; HAMILTON *et al.*, 2003).

Devido à sua eficiência na expressão de proteínas recombinantes, *K. phaffii* é amplamente utilizada na produção de biofármacos, como enzimas, hormônios, anticorpos, vacinas e proteínas terapêuticas (GIBSON; SMITH, 2016; SIBIRNY; TROPSHA, 2016; WONG *et al.*, 2019). É essencial na produção de enzimas para aplicações em alimentos, detergentes, papel e celulose (KAINZ; KARSTEN, 2019), e também na fabricação de biocombustíveis, como etanol e biodiesel (ZHU; XIE 2020). Além disso, contribui para a produção de metabolitos secundários, como polissacarídeos e ácidos orgânicos (LIU *et al.*, 2018), e é utilizada na produção de biopesticidas (HUANG *et al.*, 2021), no tratamento de resíduos (RIBEIRO *et al.*, 2019), e em processos de acabamento de tecidos na indústria de vestuário (MOTA *et al.*, 2020). Sua capacidade para modificações pós-traducionais complexas e crescimento em meios de baixo custo torna-a uma ferramenta valiosa em pesquisas de expressão gênica e engenharia metabólica (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Conforme Gil de Los Santos *et al.* (2012) são escassas informações sobre as propriedades probióticas de *K. phaffii*, com isso os autores avaliaram essas propriedades de *K. phaffii* KM71H e *K. phaffii* recombinante, contendo o gene da toxina

alfa de *C. perfringens* em frangos de corte e compararam seu desempenho com *B. cereus*. Obtiveram como resultados o ganho de peso dos frangos que receberam as duas cepas de leveduras, com ganho de peso superior ao grupo controle. Foi avaliada também a soroconversão contra *C. perfringens*, a qual foi significativamente maior nos dois grupos que receberam a levedura.

França *et al.* (2015) realizaram testes adicionais com o objetivo de avaliar o efeito probiótico de *K. phaffii* X-33 e concluíram que essa levedura possui potencial para ser caracterizada como probiótica, pois permaneceu viável na alimentação animal por pelo menos dois meses, sendo inócua e capaz de resistir à passagem através do TGI de mamíferos, de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* *in vitro* e de proteger camundongos da infecção por *S. Typhimurium* e ainda observaram em estudos histopatológicos que não houve lesões e alterações morfológicas no baço, fígado e intestino e a ausência desta levedura nas microvilosidades do parênquima e lâmina própria do intestino de camundongos foram identificados.

Ainda visando o efeito probiótico de *K. phaffii*, Pinto *et al.* (2015) avaliaram o desempenho, mortalidade e uniformidade de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com diferentes probióticos na dieta e observaram que *K. phaffii* proporcionou às larvas um crescimento semelhante ao tratamento controle sem probiótico na ração.

Gil de Los Santos *et al.* (2018) referem e validam que *K. phaffii* X-33, cultivada no meio com efluente da indústria de arroz parboilizado suplementada com biodiesel glicerol pode ser utilizada como probiótico para frangos de corte, melhorando a resposta às vacinas e quando cultivada em caldo levedura, peptona e dextrose (yeast peptone dextrose -YPD), aumentou a eficiência alimentar.

Gaboardi *et al.* (2019), considerando os benefícios relatados da *K. phaffii* X-33 como probiótico e a falta de dados sobre seu efeito em codornas, avaliaram a levedura cultivada em meio de cultura padrão ou efluente industrial, quanto ao desempenho de codornas, a qualidade dos ovos, morfologia intestinal e modulação da resposta imune, concluindo que a suplementação de *K. phaffii* modulou o sistema imunológico das aves, aumentando os níveis de anticorpos em comparação ao controle e que essa resposta imunológica foi melhorada pela levedura, tanto cultivada em YPD quanto em resíduos

industriais, bem como o peso do ovo aumentou com *K. phaffii* cultivada em YPD, demonstrando assim ser um probiótico promissor para aves.

Birmann *et al.* (2021) avaliaram pela primeira vez, se *K. phaffii* KM71H atenuaria alterações comportamentais e neuroquímicas em modelos de comportamento tipo depressão induzidos por estresse de restrição e LPS (lipopolissacarídeo) em ratos. Concluíram que a levedura possui propriedades para uma nova proposta de probiótico com efeito antidepressivo, surgindo como uma estratégia terapêutica promissora para o transtorno depressivo maior e ainda observaram que a administração da levedura pode ser considerada segura, pois não alterou os níveis plasmáticos de marcadores de lesão hepática e renal, e na análise histopatológica, nenhuma lesão foi observada no intestino.

Diante disso, esta abordagem do efeito probiótico de *K. phaffii* tem sido pouco explorada, uma vez que os estudos têm sugerido que a levedura pode trazer benefícios ao animal no que se trata da estimulação do crescimento e imunidade, além de suprir eventuais deficiências nutricionais, que podem aparecer eventualmente em certas dietas para animais.

Assim, surge a necessidade de novas aplicações tecnológicas a fim de garantir a sobrevivência da levedura em matrizes alimentares, destacando-se, neste contexto, as técnicas de microencapsulação, valor funcional da levedura como vida útil e sobrevivência sob armazenamento e resistência térmica, tornando-se inovador e promissor para a tecnologia de alimentos.

2.4 Microencapsulação

O microencapsulamento configura-se como uma tecnologia que promove o revestimento fino de partículas sólidas, gotas de líquidos, microorganismos e dispersões (BARROSO *et al.*, 2021). Frakolaki *et al.* (2021) definem a microencapsulação como um processo físico, químico ou mecânico para aprisionar uma substância (agente ativo) em um material adequado (agente encapsulante) para produzir partículas com uma membrana semipermeável fina, mas forte, com diâmetros de alguns nanômetros a alguns milímetros.

As principais tecnologias de encapsulação são a nanoencapsulação e a microencapsulação. A nanoencapsulação é uma tecnologia que produz partículas ou sistemas com dimensões inferiores a 1µm e é utilizada para encapsular compostos bioativos por diferentes tipos de veículos de tamanho nano, como nanoemulsão, lipossomas ou nanocápsulas (SANTOS *et al.*, 2016). A microencapsulação é uma tecnologia que produz micropartículas com diâmetros na faixa de micrômetros (1 a 1000 µm) (CAMPOS *et al.*, 2013).

A microencapsulação tem sido aplicada em diferentes setores da indústria, principalmente na indústria farmacêutica e de alimentos (PAULO; SANTOS, 2017). Na indústria alimentícia são comumente utilizadas para o controle de liberação e o prolongamento da vida útil de agente ativo, para retardar reações oxidativas e mascarar aspectos sensoriais, mas tem sido pesquisada principalmente para microencapsular probióticos (ARSLAN-TONTUL; ERBAS, 2017).

Entre os produtos que despertam interesse para serem encapsulados para fins alimentícios, destacam-se os compostos bioativos, corantes, óleos, probióticos e enzimas (BARROSO *et al.*, 2021). Esses materiais são conhecidos por apresentarem sensibilidade a algumas condições ambientais, como temperatura, luz, oxigênio, pressão, além do ataque microbiano, reações químicas, bioquímicas e enzimáticas (SAIFULLAH, *et al.*, 2019; SHARMA, *et al.*, 2019; VALLDEPERAS, *et al.*, 2019; WEN, *et al.*, 2017).

Barro *et al.* (2021) referem que a microencapsulação é um método promissor para proteger as células probióticas contra as condições adversas que elas podem enfrentar. A técnica consiste em um processo no qual as células probióticas são incorporadas a uma matriz ou membrana encapsulante, que promove sua proteção contra a degradação por fatores ambientais (YAO *et al.*, 2020; SHORI, 2017).

A tecnologia de encapsulamento de células probióticas segundo Krunic *et al.* (2019) atende a um requisito importante: elas devem permanecer viáveis, ativas e em número considerável, constatando-se que a encapsulação de culturas probióticas traz muitos benefícios, tais como: os probióticos em carreadores são protegidos de fatores externos e têm maior capacidade de sobreviver ao tempo e condição de armazenamento e

também a condições como pH baixo, presença de enzimas digestivas e sais biliares no TGI humano.

Conforme Silva *et al.* (2015) a microencapsulação promove a liberação controlada e otimiza o fornecimento dos probióticos no local de ação (região intestinal), potencializando a eficácia da respectiva cepa probiótica. Enquanto no alimento, esse processo também impede os microrganismos de se multiplicarem, o que poderia alterar suas características sensoriais. Além disso, o material de parede da encapsulação deve oferecer proteção durante seu processamento térmico, além de também atuar como protetor durante o armazenamento e no estômago, até que o probiótico seja entregue na porção intestinal.

Cabe ressaltar que o mecanismo de liberação dos probióticos no sistema intestinal irá depender da tecnologia e dos materiais de parede utilizados e de fatores como: alterações de pH, agentes quelantes, ação enzimática, tempo e força osmótica (GEBARA *et al.*, 2013; FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Segundo Vaniski *et al.* (2017) a escolha do método irá depender do tamanho desejado da microcápsula e da aplicação que será dada à mesma, bem como do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante.

De uma forma geral, os métodos são divididos de acordo com seu mecanismo de formação das partículas em físicos (*spray drying*, liofilização, evaporação de solventes, precipitação de fluídos supercríticos, etc.), químicos (complexação de inclusão molecular, polimerização *in situ*, etc.) e os físico-químicos (lipossomas, gelificação iônica, emulsificação, coacervação, etc.) (OZKAN, *et al.* 2019; SAIFULLAH, *et al.*, 2019).

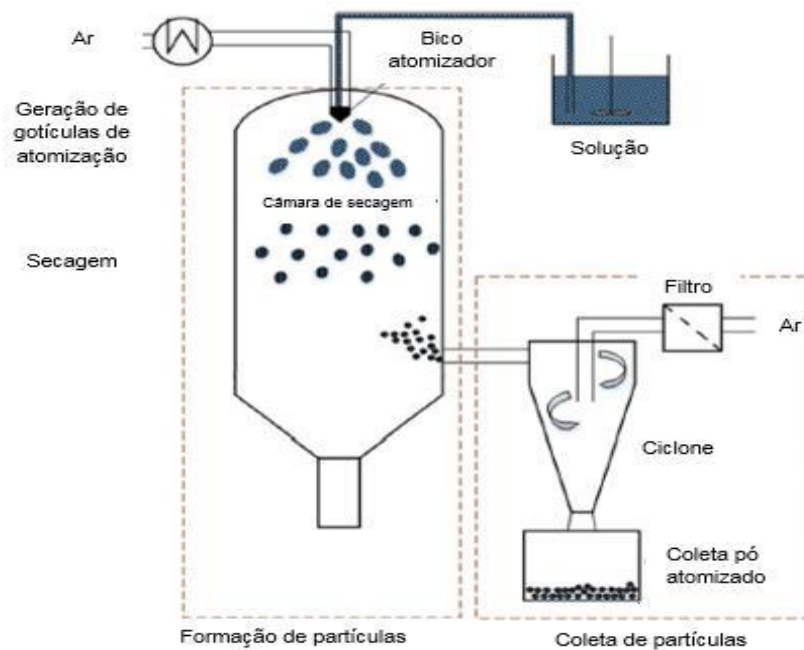
2.4.1 Microencapsulação por *spray drying*

Consiste em um processo de secagem utilizado na indústria de alimentos desde 1950 e bastante usual como técnica de encapsulamento (SOUZA SIMÕES, *et al.*, 2017), devido ao fato de permitir em uma única operação fazer a formação do material encapsulado e a sua secagem para obtê-lo na forma de pó. É uma técnica amplamente utilizada para o encapsulamento de bioativos (SHISHIR; CHEN, 2017), permitindo uma fácil adequação para a produção em escala industrial com mínimos custos operacionais e com processos simples e flexíveis (GERANPOUR; ASSADPOUR; JAFARI, 2020; SAIFULLAH, *et al.*, 2019).

Conforme Barro *et al.* (2021), *spray drying* é o método de microencapsulação com maior potencial, principalmente para modificar as condições durante a secagem por pulverização, para controlar o tamanho e a forma da partícula, possui alta estabilidade probiótica e baixa quantidade de degradação celular durante a secagem, se o processo e os parâmetros de formulação forem otimizados corretamente.

Especificamente, na Figura 1, percebe-se o funcionamento do *spray drying*, no qual ocorre o bombeamento da solução contendo o material ativo e o material de parede até a câmara de secagem, a qual possui o bico atomizador no seu interior. Esse apresenta um orifício de pequeno diâmetro em sua extremidade, o que faz com que as gotículas líquidas tenham uma área superficial elevada; assim, ao entrarem em contato com o ar quente na câmara de secagem elas passam para o estado sólido. As partículas de densidade mais elevada são coletadas na parte inferior da câmara de secagem, já as de densidade inferior consistem no produto de interesse, as quais são encaminhadas para o ciclone, onde serão coletadas (DAVIS; WALKER, 2018).

Figura 1 – Representação do funcionamento da secagem por *spray drying*



Fonte: Davis e Walker, 2018.

Durante o processo de *spray drying*, as células probióticas são submetidas ao calor ocorrendo a desidratação, o que pode danificar a membrana celular ou, em casos extremos, inativar completamente a cultura probiótica. Por sua vez, esse risco pode ser controlado ajustando-se os parâmetros do processo de secagem, como temperatura de saída, taxa de alimentação, temperatura de entrada, tempo de secagem e meio de secagem (BARRO *et al.*, 2021).

Normalmente usando temperaturas mais baixas de entrada / saída promove-se maiores taxas de sobrevivência de microorganismos probióticos, em função do menor grau de dano térmico nas células (LIU *et al.*, 2017). Além disso, escolher o material encapsulante mais eficiente, é primordial no emprego desta técnica (DIANAWATI *et al.*, 2015).

2.4.2 Materiais encapsulantes

Conseguir fornecer e manter a quantidade mínima necessária de células probióticas viáveis para conferir quaisquer efeitos positivos à saúde é um grande desafio, considerando sua sensibilidade ao processamento, armazenamento e entrega (BARRO *et al.*, 2021). Uma vez que para apresentar a funcionalidade probiótica ideal, esses microrganismos, conforme Frakolaki *et al.* (2021), devem sobreviver através do TGI em altas concentrações, atingindo 10^6 a 10^7 UFC g⁻¹ no ponto de entrega na região intestinal, já quando aplicada no alimento recomenda-se que essa concentração se mantenha, até o final da vida útil do produto.

Com isso, técnicas e materiais de parede para encapsulamento têm sido amplamente aplicados para aumentar a viabilidade de bactérias probióticas em produtos alimentícios e na sobrevivência no TGI durante a ingestão (CHAIKHAM *et al.*, 2012).

A escolha do material a ser utilizado como agente encapsulante deve considerar uma série de fatores, destacando-se propriedades físicas e químicas de compatibilidade destes em relação ao material a ser encapsulado. Em especial, a temperatura de transição vítrea do encapsulante, a superfície do núcleo encapsulado e fatores econômicos devem ser estudados (MARTÍN *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Conforme Viana *et al.* (2021) os encapsulantes devem atender ainda aos seguintes requisitos: boas propriedades de formação de filme, baixa higroscopicidade, baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos, sabor e odor suaves, fácil reconstituição e baixo custo.

O tipo, concentração e propriedades do material capsular afetam marcadamente a viabilidade dos probióticos encapsulados. Inúmeros biomateriais, incluindo carboidratos (lactose, maltodextrina, alginato, amido, amidos modificados e sacarose), lipídios (monoglicerídeos, diglicéridos e óleos hidrogenados) e proteínas (caseína, proteínas do soro do leite, gelatina e albumina) já foram estudados e mostram-se com potencial para serem utilizados no encapsulamento de probióticos, e, além destes outros podem ser usados desde que satisfaçam aos requisitos dos materiais

geralmente reconhecidos como seguro (*status* GRAS – Generally Recognized as Safe) (ABD EL-SALAM, EL-SHIBINY, 2015; ANTIGO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2014).

O material usado para a microencapsulação de probióticos deve ser biocompatível, permeável a nutrientes e metabólitos, para fornecer condições ideais para a funcionalidade das células aprisionadas, e biodegradável para garantir a liberação das células aprisionadas na região intestinal (cólon) do hospedeiro (MAHMOUD *et al.*, 2020).

Os carboidratos são materiais muito utilizados para microencapsulamento, por sua capacidade de se ligar a compostos, além de sua diversidade e baixo custo (HUANG *et al.*, 2017). Dentro dos carboidratos temos os prebióticos como os frutooligosacarídeos (FOS) e a inulina que segundo Sarao e Arora (2017), são resistentes ao suco gástrico e pancreático e quando presentes no intestino grosso, além do papel seletivo sobre *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* influenciam diversos aspectos da função intestinal, por meio da fermentação.

A inulina tem atraído muito a atenção de pesquisadores em virtude dos benefícios de natureza prebiótica e devido à sua baixa capacidade de hidrólise, quando presente no TGI, podendo ser utilizada na preparação de microcápsulas resistentes às variações de pH, demonstrando ainda, resultados significativos com relação a melhoria da viabilidade e altas taxas de sobrevivência durante o armazenamento na microencapsulação por *spray drying* (FERNANDES *et al.*, 2016; FRITZEN-FREIRE *et al.*, 2013; OKURU *et al.*, 2013). Algumas das propriedades da inulina no TGI incluem estimular a fermentação microbiana, diminuindo a absorção de gordura e colesterol e reduzindo o pH do lúmen a partir da produção de ácidos orgânicos. Portanto, possui um efeito direto na redução de distúrbios intestinais, constipação, hiperglicemia e câncer (FAYED *et al.*, 2019).

Roselen *et al.* (2019) demonstraram que a combinação de inulina e soro de leite como materiais encapsulantes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 na microencapsulação por *spray dryer* promoveu proteção à bactéria e alto rendimento de encapsulamento (94,61%). As contagens de células viáveis das microcápsulas permaneceram estáveis por seis meses de armazenamento. Ainda, a

microencapsulação mostrou proteção ao *Lactococcus* através da passagem simulada do TGI, bem como no teste de resistência térmica.

Santos *et al.* (2019) aplicaram as microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* em uma sobremesa simbiótica. As microcápsulas de inulina foram essenciais para garantir a sobrevivência dos probióticos após a secagem por pulverização, bem como para proteção dos mesmos às condições gastrointestinais simuladas.

As proteínas são geralmente consideradas materiais adequados para microencapsulamento em aplicações alimentares, especialmente em alimentos líquidos e semi-sólidos. Possuem a vantagem de desenvolver matrizes de tamanhos controlados, sem qualquer efeito adverso no sabor dos alimentos (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2015). Além disso, podem apresentar efeitos estabilizadores desejáveis na textura dos alimentos (VIANA *et al.*, 2021).

Proteínas de origem animal (proteína do soro, gelatina e caseína) e de origem vegetal (proteína de soja, de arroz, de ervilha) são comumente utilizadas na microencapsulação de microrganismos, pois tendem a fornecer características desejáveis de proteção, e de inferir compatibilidade, digestibilidade e agregar valor nutricional ao produto final (NESTERENKO, 2013; DOUGITIENGOC, 2012). Contudo, há a preferência por proteínas de origem vegetal, já que estas tendem causar menos alergias seguindo o caminho que a indústria de alimentos vem trilhando que reflete a tendência "verde" na indústria alimentar (NESTERENKO *et al.*, 2013).

Nesterenko *et al.* (2014) demonstraram a capacidade das proteínas vegetais de protegerem eficazmente os diferentes materiais ativos (hidrófilo ou hidrófobo, sólido ou líquido). No entanto, a eficiência da microencapsulação, a estabilidade e o tamanho das micropartículas podem ser afetadas por diversos parâmetros, tais como o núcleo ativo, as concentrações do material de parede, de temperatura, pH do meio, a técnica de encapsulamento, o uso de aditivos ou de proteínas combinadas com polissacarídeos. Proteínas extraídas a partir do arroz apresentam boa solubilidade, capacidade de emulsão, formação e estabilidade da espuma, dando-lhes as características adequadas para uso potencial como materiais de revestimento eficientes. Além disso, eles podem ser associados com polissacarídeos, auxiliando a microencapsulação.

A proteína do arroz, hipoalergênica e fonte essencial de proteína, pois possui subproduto derivado do farelo de arroz com perfil nutricional percebido como positivo, ainda apresenta propriedades emulsificantes que precisam melhor compreensão quanto à microencapsulação. Também, sabe-se que pouca informação está disponível na literatura contemporânea sobre a microencapsulação de probióticos utilizando a proteína de arroz e que novas aplicações e estudos devem ser analisados (GOMES; KUROSZAWA, 2020).

Kurek e Pratap-Singh (2020) examinaram as propriedades da emulsão e as propriedades de pós microencapsulados secos por pulverização preparados com óleo de semente de cânhamo usando uma combinação de maltodextrina com proteínas de cânhamo, de ervilha e de arroz como materiais de revestimento e descobriram que as proteínas do arroz e da ervilha são uma alternativa vegetal viável como material de parede, onde as microcápsulas de proteína de arroz apresentaram eficiência de encapsulamento de 80% e microcápsulas de proteína de ervilha representando a liberação mais baixa constantes de taxa e maior inibição oxidativa com carga de óleo de 10%.

Ainda podemos observar um estudo realizado com encapsulação através de proteína vegetal como material encapsulante utilizando probióticos conforme Arslan *et al.* (2015), onde utilizaram como materiais de parede gelatina, proteínas do soro concentrado, amido modificado, proteína de ervilha e goma arábica. Demonstraram que estes materiais não afetaram significativamente a taxa de sobrevivência de *S. boulardii* ao processo de microencapsulação, entretanto, nos estudos de digestibilidade *in vitro*, os testes realizados com goma arábica se mostraram mais resistentes em pH 1,5 e 2,0 e proteína de ervilha em pH 1,0 com uma taxa de sobrevivência que variou 60 a 70% para as células encapsuladas, comparadas a 24 - 45% das células livres.

2.5 Alimentos funcionais

A alimentação é uma necessidade básica primordial da vida que atende às necessidades nutricionais de um indivíduo. Os nutrientes como gorduras, carboidratos e proteínas garantem energia para o crescimento e manutenção, enquanto fatores não nutritivos (fibras, fitoquímicos, antioxidantes, vitaminas, minerais, probióticos, prebióticos, etc.) aumentam os benefícios à saúde humana (NATARAJ *et al.* 2020).

Segundo Albuquerque *et al.* (2021) para a grande maioria da população, o papel dos alimentos é de fundamental importância para uma boa qualidade de vida. A função inicial dos alimentos como fonte de energia e crescimento vem se transformando num perfil mais biológico, por meio de estudos da ação dos componentes presentes nos mesmos. Por conseguinte, são de total interesse do consumidor, produtos novos, de fácil acesso e alto valor nutritivo. Com isso, para atender esse novo mercado de consumo, o setor da produção alimentícia vem investindo na elaboração de “alimentos funcionais”, conhecidos ainda como nutracêuticos ou *foodiceuticals* ou *medifoods* (LORENZO *et al.*, 2018).

Santos Moraes *et al.* (2018) referem que os alimentos funcionais surgiram no Japão, em meados dos anos 1980, referindo-se aos alimentos que são capazes de apresentar benefícios fisiológicos e/ou redução de doenças, além das funções nutricionais básicas, sendo de suma importância a comprovação científica clínica da sua eficácia. Estando eles totalmente ligados ao estilo de vida, nota-se a necessidade de os alimentos funcionais englobarem fatores capazes de suprir o empobrecimento de nutrientes, podendo ser vistos como um escape para os consumidores que não possuem uma boa alimentação seja por questões rotineiras da atualidade ou por hábitos corriqueiros.

Com isso, os alimentos funcionais podem ser definidos como “qualquer alimento que tenha um impacto positivo na saúde, desempenho físico ou estado de espírito de um indivíduo, além de seu valor nutritivo” (AGUIAR *et al.*, 2019).

Arruda *et al.* (2017) afirmam que os alimentos funcionais podem ser classificados em função do próprio alimento ou da presença de componentes bioativos que estejam presentes na sua composição, como as fibras, os fitoquímicos, as vitaminas, os minerais essenciais, os peptídeos bioativos, os probióticos, as ervas, os ácidos graxos

como ômega 3. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos da nutrição convencional, sendo efeitos que se restringem à promoção de saúde e não à cura de doenças. Entre os alimentos funcionais, os alimentos com microrganismos probióticos são de grande importância, podendo-se ainda destacar os prebióticos e simbióticos.

Os probióticos estão entre os ingredientes alimentares funcionais amplamente estudados e aplicados e que representam um alimento funcional arquetípico (VANDENPLAS *et al.*, 2015), sendo definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (FAO, 2002; HILL *et al.*, 2014), ou seja, funcionam como um suplemento microbiano vivo, que afetam benéficamente a saúde, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (VANDENPLAS *et al.*, 2015).

2.5.1 Probióticos em alimentos

Muitas culturas probióticas estão disponíveis comercialmente, para aplicação em matrizes alimentares com o objetivo de desenvolver novos produtos funcionais (CHAMPAGNE *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). Embora o veículo mais comum para a entrega de probióticos sejam os produtos lácteos (MURTAZA *et al.*, 2017; TOMAR, 2019), existe uma procura de probióticos em matrizes não lácteas baseadas em vegetais como frutas e cereais (RANADHEERA *et al.*, 2018).

Matrizes alimentares são representadas como sendo um fator definitivo para a atividade e a viabilidade de um microrganismo. Toda cepa dispõe de alguma característica, tornando-se de suma importância o conhecimento de sua vida útil no produto, a começar pelo processo de produção até a finalização em seu período de armazenamento (PADILHA, 2013).

Contudo, para atender às especificações de um alimento probiótico, a bactéria deve ser inócua, possuir viabilidade para suportar a estocagem e o transporte, tolerar o pH do suco gástrico e possuir propriedades de resistência a fagos e oxigênio (MELO *et al.*, 2016). Ainda, de acordo com Wendling e Weschenfelder (2013), para que um alimento funcional contendo probióticos tenha eficácia, o número dos microrganismos adicionados deve estar viável, ativo e abundante até o final do período de validade.

Nesse contexto, a ANVISA instituiu o Guia nº 21/2021 para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Este guia preconiza que a matriz alimentar utilizada, assim como a dose avaliada em estudos, deve ser compatível com a dose e os alimentos nos quais os probióticos serão adicionados (BRASIL, 2021).

Perricone *et al.* (2015) referem que os probióticos foram primeiramente adicionados ao iogurte, assim como aos demais produtos lácteos fermentados. No entanto, segundo Montemurro *et al.*, 2021 nos últimos anos, novos alimentos e bebidas à base de plantas foram elaborados e disponibilizados no mercado para satisfazer a crescente demanda por alternativas aos produtos de origem animal. O leite e os derivados lácteos são considerados uma classe de alimentos com compostos essenciais para a nutrição humana. Todavia, pessoas que sofrem de problemas de saúde relacionados à ingestão elevada de colesterol na dieta, intolerância à lactose ou má absorção e alergia às proteínas do leite, devem consumir produtos alternativos. Além disso, a consciência geral dos consumidores sobre os efeitos de suas escolhas alimentares no meio ambiente e na saúde, além da tendência crescente do vegetarianismo/veganismo, estão levando a uma maior demanda por produtos à base de plantas.

Soares (2016) desenvolveu uma bebida funcional à base de extrato de caju (*Anacardium occidentale*) contendo *Lactobacillus casei* livre e microencapsulado. A bebida de caju foi elaborada com 45% de polpa e adição de 10% de açúcar; já as microcápsulas foram preparadas pelo método de emulsão/gelificação interna, com o alginato como agente encapsulante e posterior revestimento das esferas com quitosana. A análise sensorial demonstrou que as bebidas foram aceitas pelos provadores, apesar das microesferas terem sido percebidas. Os autores concluíram que a bebida de caju serviu como um substrato favorável para sobrevivência de *L. casei* livre e microencapsulado, e que a microencapsulação é uma técnica promissora para prolongar a viabilidade das células e a sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas.

Fujii *et al.* (2017) ressaltam que a soja pode ser utilizada em casos de alergias e intolerâncias e, portanto, formularam uma bebida de extrato de soja sabor morango,

pêssego e uva com *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*. Nesse estudo, foram utilizados sucos isentos de conservantes com adição de açúcar e edulcorante artificial de sucralose em suas formulações. A cultura mista foi inoculada e a bebida foi armazenada durante 30 dias sob refrigeração. O crescimento microbiano, pH, acidez e sólidos solúveis foram avaliados após 0h, 24h, 15 dias e 30 dias. Os resultados indicaram uma maior taxa de crescimento microbiano no 15º dia e ao longo do período de armazenamento houve um aumento da acidez, redução do pH e dos sólidos solúveis. Portanto, o extrato de soja pode ser utilizado como substrato para o desenvolvimento das bactérias probióticas, proporcionando um aumento no potencial de propriedades funcionais.

O extrato de castanha de caju conforme Bruno *et al.*, (2020), foi avaliado como matriz para fornecer *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*, a fim de desenvolver uma bebida probiótica não láctea. Todas as bactérias avaliadas foram capazes de sobreviver nesta matriz alimentar em temperatura a 4°C por 30 dias.

Tendo em vista o efeito bioterapêutico dos probióticos e que uma variedade de bioativos tem sido empregados nos últimos anos para a elaboração de alimentos funcionais, percebe-se que essa é uma área potencialmente promissora, pois possibilita a elaboração de alimentos com propriedades benéficas que tenham aceitabilidade perante consumidores, mantendo os padrões de qualidade exigidos pela legislação brasileira e ainda beneficiando aqueles que apresentam especificações alimentares, como alergias e/ou intolerâncias alimentares, veganos, bem como todos que buscam uma manutenção saudável da microbiota intestinal e qualidade de vida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a sobrevivência da levedura *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*) cepa X-33 livre e microencapsulada aplicada em uma matriz alimentar não láctea.

3.2 Objetivos específicos

- Obter biomassa de *K. phaffii* X-33 em escala laboratorial;
- Produzir microcápsulas com *K. phaffii* por *spray drying*;
- Avaliar a morfologia das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar eficiência do encapsulamento, bem como o rompimento das cápsulas de *K. phaffii*;
- Avaliar a sobrevivência da levedura livre e encapsulada:
 - sob armazenamento em diferentes temperaturas;
 - sob as condições gastrointestinais simuladas e
 - quanto à resistência térmica sob diferentes temperaturas;
- Avaliar a sobrevivência da levedura livre e encapsulada quando aplicada em matriz alimentar não láctea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições de cultivo e fermentação de *K. phaffii*

A levedura *K. phaffii* cepa X-33, pertencente ao estoque do Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), foi cultivada de acordo com França *et al.* (2015) com modificações, no tempo de cultivo e na utilização de sacarose durante as fermentações, em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) por 48 h a 28 °C, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. A levedura foi conservada em glicerol (30%) e YPD (70%) sob congelamento (-20 °C).

Para o processo de fermentação foram adicionados, em cuba de 10 L do biorreator (Bioflo110, New Brunswick) contendo 4 L de caldo YPD, 500 mL de sacarose e 500 mL de inóculo ($> 11 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o cultivo foi incubado a 28 °C, 500 rpm, 1 vvm de ar por 24 h, com a adição de antiespumante 204 (Sigma®) durante a fermentação. Após a fermentação, o cultivo foi centrifugado a $5000 \times g$ por 15 min a 4 °C e o *pellet* contendo as células foi lavado em solução salina 0,9% e mantido sob refrigeração a 4 °C.

Para a contagem de células viáveis, uma alíquota foi coletada e a concentração determinada por plaqueamento das diluições decimais em salina 0,9%, em placas com ágar YPD. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h e as contagens foram expressas como log unidade formadora de colônia por grama ($\log \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$).

As fermentações foram realizadas três vezes, durante três semanas consecutivas, para avaliar a produtividade de massa celular úmida (biomassa celular) e determinar a sobrevivência das células viáveis.

Para controle foi utilizada a levedura *S. boulardii* adquirida em comércio local (Floratil®, Brasil), a qual foi cultivada e fermentada nas mesmas condições de *K. phaffii*. *Pellets* de células das leveduras foram mantidos refrigerados a 4 °C e ressuspensos em solução salina 0,9% durante todo o experimento.

4.2 Microencapsulação das leveduras

A microencapsulação foi realizada segundo Rosolen *et al.* (2019) com modificações no tipo de proteína utilizada como material encapsulante. Optou-se, como solução encapsulante, uma mistura de 12% de proteína de arroz, 10% de inulina e 1,25% de aerosil (Farma-química, Málaga, Espanha) dissolvidos em água destilada estéril, resultando em um teor de sólidos totais de 23,25% (m.v⁻¹), seguido de tratamento térmico a 65 °C por 30 min e homogeneização em agitador orbital a 150 rpm a 28 °C por 16 h.

As suspensões das células de *K. phaffii* (11,6 log UFC.g⁻¹) e *S. boulardii* (11,5 log UFC.g⁻¹) foram adicionadas à solução encapsulante e mantidas homogeneizadas por agitador magnético, sendo assim submetidas ao processo de secagem por *spray drying* (LabMiq – MSDi 1.0, São Paulo, SP, Brasil). Os parâmetros operacionais utilizados foram 100 °C de temperatura de entrada, 68 °C de saída, com vazão de alimentação de 0,25 Lh⁻¹ e vazão de ar de secagem 3,00 m³ min⁻¹. O produto final seco foi coletado em frascos estéreis e armazenado a temperaturas de -20 °C, 4 °C e 25 °C.

4.3 Teste de rompimento das microcápsulas e eficiência do encapsulamento

4.3.1 Teste de rompimento das microcápsulas

Conforme Rosolen *et al.* (2019) com modificações, no pH da solução salina com pepsina, duas soluções em triplicata, foram usadas para determinar a ruptura das microcápsulas: tampão phosphate buffered saline (PBS) (100 mM, pH 7,4) e solução salina 0,5% (m.v⁻¹) pH 3,0 contendo 3 mg mL⁻¹ de pepsina. Com isso, 0,1 g das leveduras microencapsuladas foram ressuspensas em 1 mL de cada solução, misturadas em vórtex e mantidas em agitador orbital a 150 rpm a 37 °C por 30, 60 e 120 min.

Alíquotas foram coletadas e analisadas para avaliar a contagem de células viáveis, conforme descrição do item 4.1 e a concentração de células expressa como log UFC.g⁻¹.

4.3.2 Eficiência do encapsulamento

A taxa de sobrevivência do microrganismo durante o processo pode ser observada através da Eficiência do Encapsulamento (EE), a qual foi calculada de acordo com a Equação 1, conforme proposto por Nunes *et al.* (2018):

$$EE(\%) = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde N é o número de células viáveis ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de matéria seca em microcápsulas e N_0 é o número de células viáveis ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de matéria seca nas soluções de alimentação (antes da secagem).

4.4 Morfologia das microcápsulas

A caracterização da morfologia das partículas das microcápsulas, após 20 dias de armazenamento a 4 °C, foi analisada através da visualização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Jeol modelo JSM 6610 LV, Tóquio, Japão) a uma voltagem de aceleração de 10 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Com isso, cada microcápsula passou pelo processo de preparação da amostra, o qual se trata da fixação de carbono dupla face revestida com ouro por aspersão (Leica, modelo EM SCD 500, Wetzlar, Alemanha). E posteriormente foi visualizada por MEV, nas dimensões 2000 x, 3500 x e 5000 x, em modo de alto vácuo para examinar a estrutura da superfície.

4.5 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas sob armazenamento, condições gastrointestinais simuladas, resistência térmica e aplicada em matriz alimentar

4.5.1 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas sob armazenamento em diferentes temperaturas

Conforme Roselen *et al.* (2019) com modificações, no período de armazenamento e pH da solução salina com pepsina, foi avaliada a sobrevivência das leveduras livres (biomassa úmida sem solução salina) e microencapsuladas durante o armazenamento por 0, 7, 15, 30 e 60 dias sob temperaturas de -20 ± 1 °C (congelamento), 4 ± 1 °C (refrigeração) e 25 ± 1 °C (ambiente).

Para a determinação da sobrevivência das células livres de *K. phaffii* e *S. boulardii* foi utilizado 0,1 g da biomassa úmida do microrganismo em 1 mL de salina estéril 0,9% (m.v⁻¹) e a mistura foi homogeneizada em vórtex. Para as microcápsulas utilizou-se 0,1 g do pó em 1 mL de solução salina 0,5% (m.v⁻¹) pH 3,0 contendo 3 mg mL⁻¹ de pepsina e a mistura foi homogeneizada em agitador orbital a 150 rpm a 37 °C por 30 min. Todas as análises foram determinadas em triplicata.

Ainda, durante nove meses as células livres, suspensas em solução salina 0,9% e armazenadas em temperatura de refrigeração (4 °C), foram avaliadas quanto a sobrevivência a cada três meses.

Alíquotas foram coletadas e analisadas para avaliar a contagem de células viáveis conforme descrição do item 4.1 e a concentração de células expressa como log UFC.g⁻¹.

4.5.2 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas sob condições gastrointestinais simuladas

A sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas expostas às condições gástricas simuladas e aos sais biliares foi avaliada segundo Roselen *et al.* (2019). Microcápsulas armazenadas por 30 dias e leveduras livres por seis meses, sob temperatura de 4 °C, foram avaliadas quanto à sobrevivência durante 60 min de exposição a fluidos gástricos e 240 min a fluidos intestinais simulados.

Para isso, 0,1 g de células livres e microencapsuladas foram expostas a 1 mL de suco gástrico e intestinal. O suco gástrico simulado consistiu em 3,0 mg mL⁻¹ de pepsina em solução salina a 0,5% (mv⁻¹), acidificado com ácido clorídrico a pH 2,0, 2,5 e 3,0. O suco intestinal simulado consistiu em 1,0 mg mL⁻¹ de pancreatina em solução salina a 0,5% (mv⁻¹) e o pH ajustado para 8,0, com ou sem bile bovina a 0,5%. As soluções foram esterilizadas por filtração usando um filtro de membrana de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, GmbH, Goettingen, Alemanha) e as amostras em triplicata foram incubadas a 37 °C em agitador orbital a 150 rpm.

Alíquotas foram coletadas e analisadas para avaliar a contagem de células viáveis conforme descrição do item 4.1 e a concentração de células expressa como log UFC.g⁻¹.

4.5.3 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas quanto à resistência térmica sob diferentes tempos e temperaturas

A resistência térmica das células das leveduras livres e microencapsuladas foi avaliada conforme proposto por Pinto *et al.* (2015) e Roselen *et al.* (2019) com modificações no tempo em banho termostático, onde 1 g de células livres (massa úmida) e microcápsulas foram transferidas para tubos de ensaio, em triplicata, contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% (m.v⁻¹), utilizando temperaturas de 60 °C, 65 °C e 70 °C por 0, 10, 20 e 30 min, em banho termostático (QUIMIS, Brasil) seguido de resfriamento imediato por imersão em banho de gelo por 10 min.

Alíquotas foram coletadas e analisadas para avaliar a contagem de células viáveis conforme descrição do item 4.1 e a concentração de células expressa como log UFC.g⁻¹.

4.5.4 Sobrevivência das leveduras livres e encapsuladas aplicada a matriz alimentar

Uma formulação de extrato de castanha, denominado comercialmente de leite vegetal de castanha 100% natural (*A tal da castanha*®, Brasil), foi utilizada para aplicação das leveduras livres (massa úmida) e leveduras microencapsuladas.

Tubos de ensaio foram preparados, em triplicata, com 0,5 g de leveduras livres armazenadas por nove meses sob temperatura de 4 °C (aproximadamente 10,7 log UFC.g⁻¹ de *K. phaffii* e 10,5 log UFC.g⁻¹ de *S. boulardii*) a 10 mL de leite vegetal, correspondendo a 5% do produto pronto. Da mesma forma, foi mantida uma proporção de 5% para as leveduras microencapsuladas armazenadas por 20 dias sob temperatura de 4 °C, adicionando 0,5 g das cápsulas (aproximadamente 9,8 log UFC.g⁻¹ de *K. phaffii* e *S. boulardii*) em 10mL de leite vegetal. A distribuição uniforme das leveduras nas formulações foi obtida através da homogeneização em agitador orbital.

Para o controle foram preparados tubos de ensaio contendo 10 ml de leite vegetal sem leveduras livres e encapsuladas.

Com isso, todos os tratamentos foram protegidos da luz e armazenados sob refrigeração a 4 °C durante 28 dias e submetidos à análise de sobrevivência celular nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento, onde alíquotas foram coletadas e analisadas para avaliar a contagem de células viáveis conforme descrição do item 4.1 e a concentração de células expressa por log UFC.g⁻¹.

Durante o tempo de armazenamento as medições de pH foram realizadas utilizando um potenciômetro (VATVI, China).

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste t e à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey para os dados paramétricos e, para os dados não paramétricos, o teste chi-squared e Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação das médias em um nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produtividade da biomassa celular e contagem das células viáveis após a fermentação

A produtividade da biomassa celular e a contagem das células viáveis das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* foram obtidas após três fermentações e centrifugações consecutivas.

Os resultados podem ser observados na Tabela 1, onde *K. phaffii* obteve produtividade de biomassa úmida significativamente superior a *S. boulardii* nas duas primeiras fermentações, tendo produtividade igual na terceira. Observou-se ainda que *K. phaffii* e *S. boulardii*, apresentaram na primeira e terceira fermentação, concentrações de células viáveis sem diferença significativa. Todavia, na segunda fermentação, *K. phaffii* apresentou contagem de células viáveis superior a *S. boulardii*, com diferença significativa.

Tabela 1 – Produtividade da biomassa celular e contagem das células viáveis das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* após três fermentações.

Leveduras	Produtividade / Contagem	Fermentações		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a
<i>K. phaffii</i>	Biomassa (g)	267 ^a	230 ^a	209 ^a
	Contagem (log UFC.g ⁻¹)	11,9±0,16 ^a	11,9±0,16 ^a	11,8±0,26 ^a
<i>S. boulardii</i>	Biomassa (g)	230 ^b	217 ^b	209 ^a
	Contagem (log UFC.g ⁻¹)	11,8±0,31 ^a	11,7±0,34 ^b	11,7±0,34 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor. Os resultados da biomassa e contagem representam a média ± desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas teste t e chi-squared ao nível de 5% de significância.

K. phaffii pode crescer em meios de baixo custo com alta densidade celular, atingindo uma concentração de biomassa superior a 100 g/L de peso seco de célula (HENRÍQUEZ *et al.*, 2019; HEISTINGER *et al.*, 2020).

Neste estudo, percebeu-se que um litro de caldo (YPD mais sacarose) produziu durante 24 h aproximadamente 47,1 g de massa úmida da *K. phaffii* e 43,7 g de *S.*

boulardii. Gil de los Santos *et al.* (2012) observaram que *K. phaffii* X-33 cultivada por 70 h em efluente de arroz parboilizado suplementado com glicerol de biodiesel rendeu 2,1 g/L de biomassa seca. Sendo assim, a produtividade da biomassa celular possivelmente pode depender do meio de cultivo o qual a levedura será fermentada e da forma a qual a biomassa se encontra, úmida ou seca.

Gaboardi *et al.* (2019), considerando os benefícios relatados de *K. phaffii* X-33 como probiótico, avaliaram a levedura cultivada em meio YPD ou efluente industrial e observaram contagem das células nos dois meios de cultivo de $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$. No presente estudo foi obtida contagem acima de $11 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de ambas leveduras, demonstrando um bom crescimento nas condições de fermentação utilizadas e potencial para uma elevada produção, importante para o desenvolvimento tecnológico de produtos alimentícios.

5.2 Teste de ruptura das microcápsulas, sobrevivência e eficiência do encapsulamento (EE)

A ruptura de microcápsulas probióticas revestidas com inulina, conforme estudos, pode ser realizada utilizando fluido gástrico simulado (0,5% de solução salina e 3 mg mL^{-1} de pepsina) (ROSELEN *et al.*, 2019) ou solução tampão de PBS 100 mM (FRITZEN-FREIRE *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2015).

Nesse contexto, os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 2) mostram que estas soluções foram eficientes para liberar as leveduras encapsuladas em todos os tempos analisados. No entanto, o uso de fluido gástrico simulado promoveu uma maior exposição das leveduras encapsuladas em 30 min e a contagem de células viáveis foi significativamente maior em comparação ao uso de tampão PBS em todos os tempos analisados.

Observa-se uma diferença significativa na redução da sobrevivência de *K. phaffii* e *S. boulardii* após 30 min em solução tampão PBS quando comparada com fluido gástrico simulado e que é visível o decréscimo na concentração de células viáveis a cada tempo, para ambas as leveduras. Esses resultados indicam que quanto menor o tempo de rompimento, maior o número de células viáveis sobreviventes e que mesmo

tendo esse decréscimo a cada aumento no tempo, o uso de fluido gástrico simulado para rompimento promoveu uma maior exposição de células, comparando com tampão PBS.

Este resultado corrobora com os de Roselen *et al.* (2019) os quais demonstraram que uso de fluido gástrico simulado promoveu a exposição das bactérias encapsuladas em 30 e 60 min, e a contagem de células viáveis foi significativamente maior em comparação ao uso de tampão PBS.

Tabela 2 – Sobrevivência das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* após ruptura das microcápsulas através da imersão em PBS ou fluidos gástricos simulados durante três tempos de exposição a 37 °C.

Leveduras	Soluções	Número de células viáveis (log UFC.g ⁻¹)			
		Tempos (min)			
		Antes da secagem	30	60	120
<i>K. phaffii</i>	Solução salina 0,5% (pH 3,0) e pepsina (3mg mL⁻¹)	11,6±0,01 ^A	11,1±0,06 ^{aB}	10,8±0,06 ^{aC}	9,3±0,01 ^{aD}
	PBS (100mM, pH 7,4)	11,6 ±0,01 ^A	10,3±0,08 ^{bB}	9,5±0,14 ^{bC}	7,7±0,06 ^{bD}
<i>S. boulardii</i>	Solução salina 0,5% (pH 3,0) e pepsina (3mg mL⁻¹)	11,5 ±0,01 ^A	11,0±0,01 ^{aB}	10,5±0,02 ^{aC}	8,8±0,03 ^{aD}
	PBS (100mM, pH 7,4)	11,5±0,01 ^A	10,2±0,01 ^{bB}	9,5±0,64 ^{bC}	7,2±0,06 ^{bD}

Fonte: Elaborado pelo autor. Os resultados representam a média ± desvio padrão. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre si para o fator solução e letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas entre si para o fator tempo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. A ausência de letras indica que não houve diferença significativa.

Estudos que avaliaram a taxa de sobrevivência de microrganismos durante o processo *spray drying* utilizando a inulina como material encapsulante observaram, através da EE, uma sobrevivência que variou entre 89,68 a 94,61% (ROSOLEN, *et al.*, 2019; NUNES, *et al.*, 2018).

Kurek e Pratap-Singh (2020) examinaram as propriedades de pós microencapsulados secos por pulverização preparados com óleo de semente de

cânhamo, usando uma combinação de maltodextrina com proteínas de cânhamo, ervilha e arroz como materiais de revestimento, e descobriram que as proteínas do arroz e da ervilha são uma alternativa vegetal viável como material de parede, onde as microcápsulas de proteína de arroz apresentaram EE de 80%.

Posteriormente, Savoldi *et al.* (2022) concluíram que a combinação de proteína de arroz com maltodextrina foi eficiente para microencapsular *S. boulardii* por *spray drying* obtendo um EE de 79,88%.

Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 3) mostram EE de 95,7% para *K. phaffii* e *S. boulardii*, estando essas taxas de sobrevivência acima da variação esperada conforme Huq *et al.* (2013) que referem variação de 70 a 85%. Percebe-se, ainda, que ambas as leveduras apresentaram similaridades nas reduções das células viáveis após *spray drying*, sem diferenças significativas.

Possivelmente a EE encontrada neste estudo se deve a junção da inulina com a proteína de arroz, como materiais encapsulantes, visto que a inulina tem demonstrado resultados significativos com relação à viabilidade celular após a microencapsulação por *spray drying* (FERNANDES *et al.*, 2016; FRITZEN-FREIRE *et al.*, 2013; OKURU *et al.*, 2013; ROSOLEN, *et al.*, 2019; NUNES, *et al.*, 2018) e proteínas vegetais, como a de arroz, tem apresentado a capacidade de protegerem eficazmente os diferentes materiais ativos (hidrófilo ou hidrófobo, sólido ou líquido), apresentando capacidade de emulsão, formação e estabilidade da espuma, dando-lhes as características adequadas para uso potencial como materiais de revestimento eficientes (NESTERENKO *et al.*, 2014).

Tabela 3 – Sobrevivência das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* e eficiência do encapsulamento após *spray drying*.

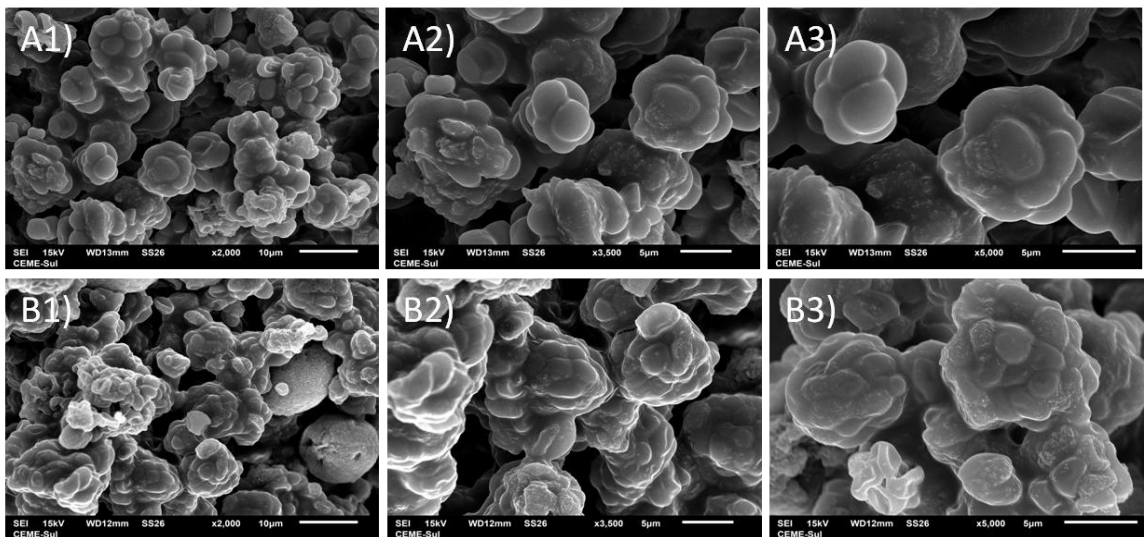
Leveduras	Número de células viáveis (log UFC.g ⁻¹)		Redução (log UFC.g ⁻¹)	Eficiência de Encapsulamento (EE%)
	Antes da secagem por pulverização	Após secagem por pulverização		
<i>K. phaffii</i>	11,6±0,01	11,1±0,06	0,5±0,02 ^a	95,7±0,06 ^a
<i>S. boulardii</i>	11,5 ±0,01	11,0±0,01	0,5±0,02 ^a	95,7±0,06 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor. Os resultados representam a média ± desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste t ao nível de 5% de significância.

5.3 Morfologia das microcápsulas

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das microcápsulas contendo leveduras encapsuladas com proteína de arroz e inulina, após 20 dias de armazenamento a 4 °C, representada na Figura 2, aponta a esfericidade das microcápsulas formadas, conforme as micrografias com ampliação de 2000x, 3500x e 5000x.

Figura 2 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das leveduras microencapsuladas com proteína de arroz e inulina por *spray dryer* após 20 dias de armazenamento a 4 °C.



Fonte: Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL), Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A1), A2) e A3): *K. phaffii* nas dimensões 2000x, 3500x e 5000x. B1), B2) e B3): *S. boulardii* nas dimensões 2000x, 3500x e 5000x.

De modo geral, observa-se que para as duas leveduras, *K. phaffii* e *S. boulardii*, há formação de partículas esféricas de superfície irregular, com presença de protuberâncias e rugosidades. Tal resultado é descrito por Saavedra *et al.* (2015), que utilizou como material encapsulante uma proteína vegetal de soja e maltodextrina e para Savoldi *et al.* (2022), que microencapsulou *S. boulardii* com proteína de arroz e maltodextrina, ambos utilizando *spray drying*.

A formação de rugosidades nas micropartículas, segundo Costa *et al.* (2015), tem sido atribuída à velocidade de secagem e propriedades viscoelásticas do material de

parede, sendo que essa característica não é considerada adequada, pois micropartículas com superfícies irregulares podem apresentar rápida liberação do material encapsulado, características observadas nas micropartículas avaliadas pelos autores, que produziram partículas utilizando proteína vegetal de ervilha como material encapsulante por *spray drying*.

Ainda, Premi e Sharma (2017) referem que a aplicação de proteínas como material de parede geralmente pode levar a variações mais extensas e não uniformidade na morfologia das partículas.

Rosolen *et al* (2019), os quais utilizaram como material encapsulante soro de leite e inulina para produzir microcápsulas com *L. lactis* R7, perceberam que após 7 dias de armazenamento, a microcápsula apresentou formato e paredes contínuas, sem rachaduras ou fissuras na partícula. Porém, após 64 dias de armazenamento, a forma esférica permaneceu, mas com irregularidades na superfície, possivelmente devido a ação do tempo de armazenamento aliada a fatores como umidade, atividade de água e degradação parcial dos componentes da parede.

Nesse estudo não foram observadas fissuras nas microcápsulas obtidas e as irregularidades encontradas nas microcápsulas desse estudo podem ter tido influência do microrganismo utilizado para encapsular, onde leveduras apresentam tamanhos maiores que bactérias, do tipo de proteína utilizada como material encapsulante e do tempo de armazenamento.

5.4 Sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas sob armazenamento em diferentes temperaturas

Na Figura 3 estão apresentados os resultados referentes à sobrevivência das células livres e microencapsuladas de *K. phaffii* e *S. boulardii* nas temperaturas de -20 °C, 4 °C e 25 °C, durante 60 dias de armazenamento.

Quando analisadas as leveduras livres, as quais estavam mantidas refrigeradas a 4 °C e suspensas em solução salina 0,9%, a concentração de células viáveis iniciais no tempo zero foi de 11,3 log UFC.g⁻¹ para *K. phaffii* livre (KPL) e 11,2 log UFC.g⁻¹ para

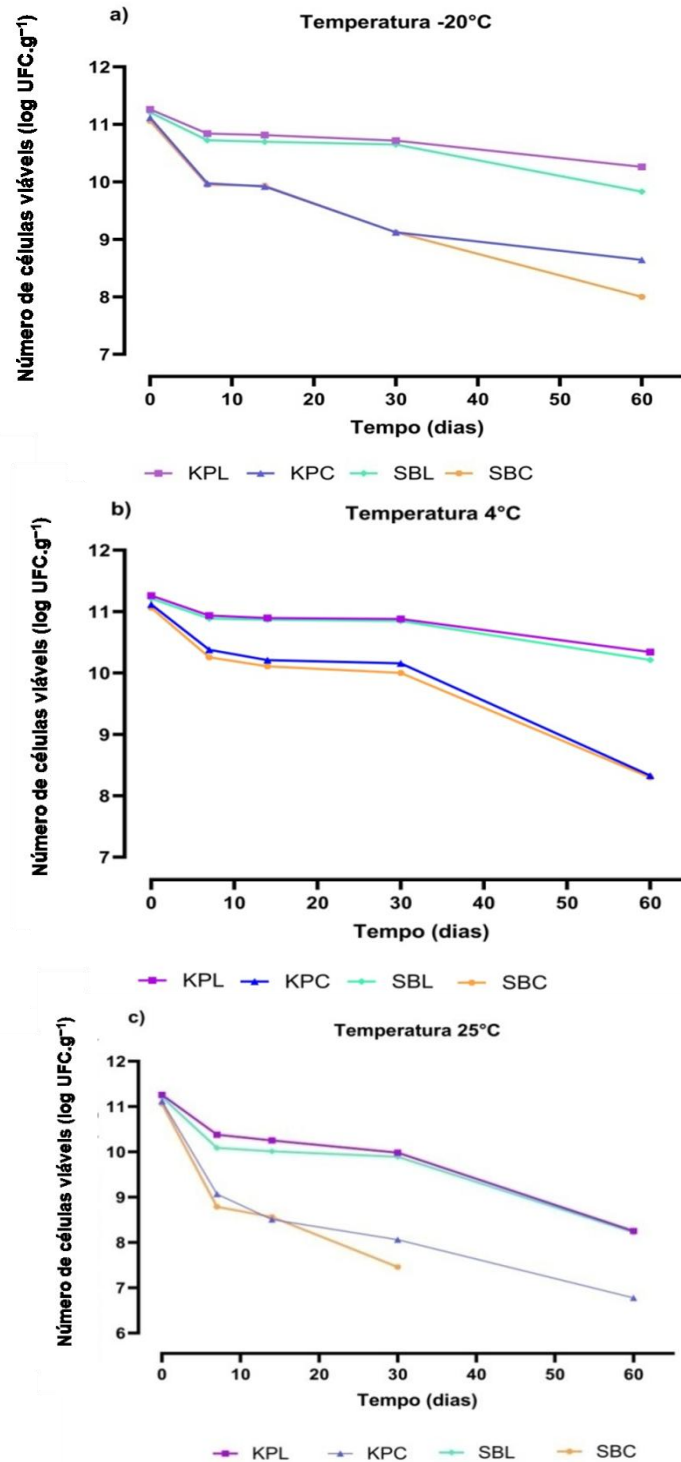
S. boulardii livre (SBL). Apartir do primeiro dia, essas leveduras permaneceram em frascos estéreis sem solução salina, apenas a biomassa celular úmida, em todas as temperaturas analisadas.

A taxa de sobrevivência das leveduras em microcápsulas foi avaliada no tempo zero, logo após a técnica de *spray drying* e a concentração de células viáveis nessas microcápsulas foi de 11,1 log UFC.g⁻¹ para *K. phaffii* microcápsula (KPC) e 11 log UFC.g⁻¹ para *S. boulardii* microcápsula (SBC). Observa-se que todas as formas das leveduras iniciaram com concentrações viáveis de células acima ou igual a 11 log UFC.g⁻¹.

Para as temperaturas de -20 °C e 4 °C, observou-se um comportamento semelhante entre as leveduras livres até os 30 dias, com concentrações de células viáveis nesse período acima de 10 log UFC.g⁻¹, demonstrando uma redução na sobrevivência comparada ao zero dia (> 11 log UFC.g⁻¹) e sobrevivência de células mais expressiva em temperatura de 4 °C e para KPL.

Percebe-se que a temperatura de 25 °C apresentou menor taxa de sobrevivência em todos os tempos, e apartir dos 30 dias, as leveduras livres apresentaram concentrações de células viáveis de 9 log UFC.g⁻¹, tendo uma redução significativa quando analisadas nos 60 dias, com sobrevivência de 8,3 log UFC.g⁻¹ para KPL e 8,2 log UFC.g⁻¹ para SBL.

Figura 3 – Sobrevivência das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii*, livres e microencapsuladas, durante 60 dias de armazenamento nas temperaturas de congelamento, -20 °C (a), refrigeração, 4 °C (b) e ambiente, 25 °C (c).

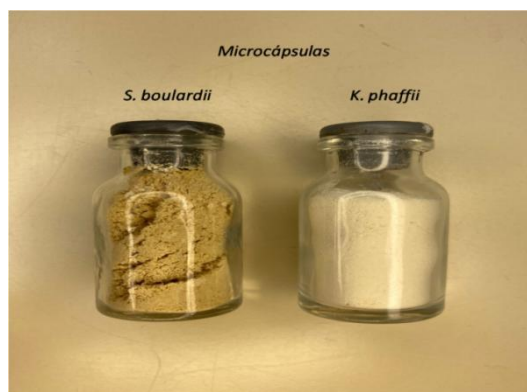


Fonte: Elaborado pelo autor. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ desvios padrão. KPL: *K. phaffii* livre; KPC: *K. phaffii* microcápsula; SBL: *S. boulardii* livre; SBC: *S. boulardii* microcápsula.

As concentrações das células viáveis das leveduras encapsuladas foram menores, com diferenças significativas, comparadas às das células das leveduras livres a partir do sétimo dia e a temperatura de 4 °C foi a que manteve as concentrações das células viáveis sem variações até os 30 dias, para as microcápsulas, com taxa de sobrevivência acima de 10 log UFC.g⁻¹, para ambas leveduras encapsuladas. Na temperatura de -20 °C as microcápsulas com as leveduras também se mantiveram sem variações em suas concentrações até os 30 dias, porém com taxa de sobrevivência acima de 9 log UFC.g⁻¹, concluindo os 60 dias para ambas leveduras encapsuladas e temperaturas (4 °C e -20 °C) com sobrevivência acima de 8 log UFC.g⁻¹.

Ainda sobre as microcápsulas, percebeu-se na temperatura de 25°C que, ao sétimo dia, a taxa de sobrevivência da KPC reduziu para 9,1 log UFC.g⁻¹, e para SBC reduziu para 8,8 log UFC.g⁻¹, demonstrando diferença significativa. A KPC manteve-se estável com concentrações de células viáveis acima de 8 log UFC.g⁻¹ nos 14 e 30 dias, e a SBC variou sua taxa de sobrevivência no mesmo período, 8 log UFC.g⁻¹ e 7 log UFC.g⁻¹, respectivamente. E ao finalizar o período de 60 dias, a SBC não apresentou células viáveis, fato esse observado através da coloração das microcápsulas (Figura 4), apresentando a SBC, coloração escura, enquanto a KPC, coloração clara (comum desde início do armazenamento).

Figura 4 – Microcápsulas de *K. phaffii* e *S. boulardii* sob armazenamento de 60 dias e temperatura de 25 ± 1 °C (ambiente).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante desses resultados, percebe-se que a temperatura de 4 °C manteve de forma mais expressiva as concentrações de células viáveis para as leveduras livres e microencapsuladas durante todo o tempo de armazenamento, sendo estes valores considerados acima do mínimo preconizado para apresentar potencial probiótico no alimento (6 Log UFC.g^{-1}) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2002; PAPADOPOULOU *et al.*, 2018).

Na literatura sabe-se pouco quanto à taxa de sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas sob armazenamento em diferentes temperaturas. Savoldi *et al.* (2022), ao avaliarem a sobrevivência de *S. boulardii* microencapsulada com proteína de arroz e maltodextrina durante o armazenamento de 20 dias sob refrigeração (4 °C), observaram que aos 10 dias a taxa de sobrevivência manteve-se estável ($6,45 \text{ log UFC.g}^{-1}$), porém aos 20 dias esta viabilidade reduziu drasticamente para $5,01 \text{ log UFC.g}^{-1}$.

Roselen *et al.* (2019) demonstraram que a combinação de inulina e soro de leite como materiais encapsulantes de *L. lactis* subsp. *lactis* R7 na microencapsulação por *spray drying* promoveu proteção a bactéria e as contagens de células viáveis das microcápsulas permaneceram estáveis por seis meses de armazenamento com

concentrações de células viáveis acima de 8 log UFC.g⁻¹ e ao final de 14 dias houve redução na sobrevivência das células livres e microencapsuladas de *L. lactis*.

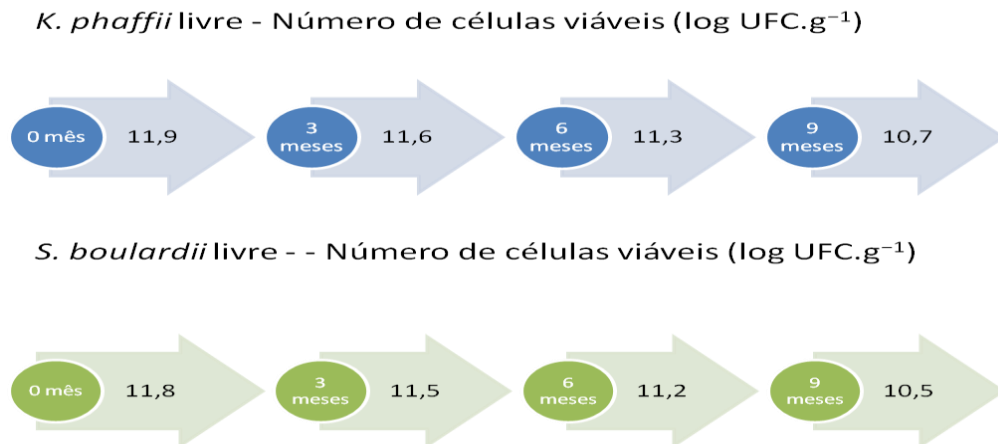
No presente estudo, a combinação de inulina e proteína de arroz como materiais encapsulantes das leveduras, assim como as leveduras na forma livre, apresentaram melhores resultados na temperatura de 4 °C, o que vem, ao encontro ao observado por Dianawati *et al.* (2016), que referem que as baixas temperaturas de armazenamento (4 – 7 °C) são descritas como tendo melhor viabilidade de bactérias probióticas por longos períodos (até 20 meses).

Entretanto, a encapsulação desse estudo, não promoveu a proteção, pois as taxas de sobrevivência foram maiores com as leveduras livres. Possivelmente as causas da encapsulação não terem promovido proteção às células das leveduras durante o armazenamento, como esperado, podem ser devido às irregularidades na superfície das microcápsulas que tenham influenciado a uma degradação do material encapsulante durante o armazenamento e as células das leveduras tenham se injuriado após o processo de *spray drying* e durante o armazenamento.

Costa *et al.* (2015) referem que as irregularidades nas microcápsulas podem apresentar rápida liberação do material encapsulado, características observadas nas micropartículas avaliadas pelos autores, que produziram partículas utilizando proteína vegetal de ervilha como material encapsulante por *spray drying*.

Na Figura 5, é possível acompanhar a linha do tempo representando a taxa de sobrevivência das leveduras livres sob armazenamento de nove meses mantidas em refrigeração (4 °C) e suspensas em solução salina 0,9%. Percebe-se que as leveduras mantiveram as células viáveis ao longo desses meses. Provavelmente, a solução salina protegeu a massa celular das leveduras, assim como a refrigeração. Pode-se, ainda, enfatizar a *K. phaffii*, a qual em todos os meses avaliada, apresentou uma acentuada expressão de células viáveis quando comparada a *S. boulardii*.

Figura 5 – Linha do tempo da taxa de sobrevivência ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de *K. phaffii* e *S. boulardii* livres sob armazenamento de nove meses e temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (refrigeração).



Fonte: Elaborado pelo autor.

França *et al.* (2015) avaliaram o efeito probiótico de *K. phaffii* X-33 e observaram que a levedura permaneceu viável e persistiu em concentração adequada na dieta dos animais por pelo menos dois meses em refrigeração (4°C), ressaltando os resultados encontrados neste estudo.

Ainda, Gaboardi *et al.* (2019) observaram, em seu estudo, a viabilidade celular de *K. phaffii* X-33 e que os *pellets* de células da levedura mantidos refrigerados a 4°C , ressuspensos em solução salina 0,9%, durante todo o experimento, permaneceram viáveis por aproximadamente três meses, com redução na viabilidade celular apenas no último mês, em $0,5 \log.\text{mL}^{-1}$.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que essas células de leveduras livres e microencapsuladas, principalmente de *K. phaffii*, podem ser armazenadas à temperatura de refrigeração (4°C) e portanto, tem potencial para possível aplicação em alimentos com bases não-lácteas de armazenamento menos oneroso, sendo que é possível ainda aplicar a levedura em sua forma livre, tendo em vista sua resistência ao armazenamento.

5.5 Sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas sob simulação quanto às condições gastrointestinais

Ambientes ácidos e alcalinos desempenham um papel crítico nas funções metabólicas dos microrganismos, que afetam os seus padrões de crescimento em sistemas modelo e preparações alimentares (DUONGTHINGOC, *et al.* 2013).

Ghorbani-Choboghlo *et al.* (2019) relataram a sobrevivência de *S. boulardii* microencapsulada com alginato de sódio utilizando a técnica de extrusão e o efeito no meio simulado do TGI. Os resultados mostraram significativa sobrevivência de *S. boulardii* microencapsulada em comparação com *S. boulardii* livre em todas as condições gástrica e intestinal, com pH alcalino apresentando melhores resultados que pH ácido.

No entanto, a Tabela 4 demonstra que a forma livre das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* apresentou maior sobrevivência às condições gastrointestinais comparada às microcápsulas que estavam armazenadas por 30 dias sob temperatura de 4 °C. E, mesmo depois de passar pelas condições gástricas, com quantidade de células viáveis superior às condições intestinais, as leveduras livres ainda resistiram mais nas condições intestinais, com quantidade de células viáveis acima de 10 log UFC.g⁻¹.

Já as microcápsulas revestidas com proteína de arroz e inulina forneceram uma quantidade de microrganismos sobreviventes às condições gástricas com variação de 6 a 9 log UFC.g⁻¹ e às condições intestinais, variando de 7 a 8 log UFC.g⁻¹. Este resultado possivelmente pode ter relação com as irregularidades nas microcápsulas que podem ter apresentado rápida liberação do material encapsulado, interferindo na sobrevivência das células das leveduras.

Vale ressaltar que não há relatos na literatura sobre estudo da sobrevivência de leveduras probióticas microencapsuladas com proteína de arroz e inulina por *spray drying* em passagem pelo TGI simulado relacionando o tempo de armazenamento, principalmente no que se trata de *K. phaffii* X-33.

Todavia, Savoldi *et al.* (2022) concluíram que a microencapsulação com proteína de arroz e maltodextrina, contribuiu para a sobrevivência de *S. boulardii* em condições

gástricas simuladas em pH 3,0 com redução de aproximadamente, um ciclo logarítmico durante o processo de digestibilidade, que passou de 6,50 para 5,40 log UFC g⁻¹.

Corroborando com esses resultados, o presente estudo também teve melhores taxas de sobrevivência no pH 3,0 para todas as leveduras livres e microencapsuladas, sendo superior aos demais valores de pH e condições intestinais, variando de 9 a 11 log UFC.g⁻¹ e apresentando diferença significativa. Entretanto foi observado maior sobrevivência com a forma livre de ambas as leveduras.

Tabela 4 – Sobrevivência das leveduras, *K. phaffii* e *S. boulardii*, livres e microencapsuladas expostas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

Condições gastrointestinais	Número de células viáveis (log UFC.g ⁻¹)			
	<i>K. phaffii</i>		<i>S. boulardii</i>	
	Livres	Microcapsulas	Livres	Microcapsulas
Gástrica pH 2,0	10,9±0,05 ^a	6,7±0,03 ^c	10,4±0,87 ^b	6,6±0,06 ^c
Gástrica pH 2,5	10,9±0,05 ^a	9,1±0,21 ^c	10,7±0,11 ^b	8,2±0,39 ^d
Gástrica pH 3,0	11,1±0,06 ^a	9,5±0,05 ^b	11,1±0,06 ^a	9,2±0,06 ^c
Intestinal com bile	10,7±0,03 ^a	7,8±0,02 ^c	10,5±0,13 ^b	7,2±0,06 ^d
Intestinal sem bile	10,8±0,05 ^a	8,6±0,04 ^c	10,6±0,10 ^b	8,6±0,04 ^c

Fonte: Elaborado pelo autor. Os resultados representam a média ± desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Observa-se na Tabela 4 que *K. phaffii* livre apresentou maior concentração de células viáveis em todas as condições gastrointestinais, exceto no pH 3,0 que apresentou concentrações similares a *S. boulardii* livre. Resultado que corrobora com o encontrado por França *et al.* (2015), onde a sobrevivência de *K. phaffii* X-33 livre ao estresse do trato gastrointestinal *in vitro* ocorreu em número suficientemente elevado para ter efeitos benéficos.

As microcápsulas das leveduras apresentaram concentrações de células viáveis acima de 6 log UFC.g⁻¹ no pH 2,0, sendo a menor sobrevivência encontrada comparando com os demais pH. Percebe-se que nesta condição gástrica *K. phaffii* livre (10,9±0,05 log UFC.g⁻¹) apresentou maior capacidade de sobrevivência comparada a *S. boulardii* livre (10,4±0,87 log UFC.g⁻¹) com diferença significativa.

Quanto às condições intestinais com bile percebe-se que ocorreu diferença significativa nas concentrações de células viáveis entre *K. phaffii* ($10,7 \pm 0,03 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) e *S. boulardii* ($10,5 \pm 0,13 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) na forma livre e que esta condição apresentou menor número de células viáveis quando comparada às condições sem bile, para ambas leveduras e suas formas, livre e encapsulada. Também na condição intestinal sem bile foi encontrado diferença significativa entre *K. phaffii* ($10,8 \pm 0,05 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) e *S. boulardii* ($10,6 \pm 0,10 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) na forma livre.

Portanto, temos que a *K. phaffii* livre e microencapsulada, apresentaram taxa de sobrevivência expressiva em todas as condições gastrointestinais, destacando a forma livre. No entanto, ressaltamos a necessidade de mais estudos para avaliar o efeito da microencapsulação da *K. phaffii* X-33 e sua sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas.

5.6 Resistência térmica das leveduras livres e microencapsuladas sob diferentes temperaturas

Os resultados da avaliação da resistência das células de leveduras livres e encapsuladas ao tratamento térmico estão apresentados na Tabela 5, tendo como parâmetro a contagem de células no tempo zero.

Em todos os tratamentos térmicos a célula livre de *S. boulardii* não apresentou resistência ao processo, porém observou-se sobrevivência das células microencapsuladas de *S. boulardii* em todos os tempos avaliados a 60 °C e em 10 min a 65 °C.

Já a microcápsula de *K. phaffii* apresentou maior proteção às células pela exposição ao calor em comparação com *S. boulardii* microencapsulada em todos os tempos a 60 °C e nos tempos de 10 min e 20 min a 65 °C, com diferença significativa na taxa de sobrevivência, com contagens variando entre 10 a 9 $\log \text{ UFC.g}^{-1}$ para 60 °C e 8 a 7 $\log \text{ UFC.g}^{-1}$ para 65 °C, demonstrando que quanto maior a temperatura e tempo de exposição, menor a taxa de sobrevivência.

Em todas as temperaturas e tempos, exceto na temperatura de 70 °C por 20 min e 30 min, as células livres de *K. phaffii* apresentaram taxa de sobrevivência variando

entre 10 e 7 log UFC.g⁻¹ e apresentaram maiores concentrações de células viáveis (diferença significativa) quando comparados às duas leveduras encapsuladas. Todavia, na temperatura de 60 °C por 10 e 20 min, as células livres e microencapsuladas de *K. phaffii* permaneceram estáveis, não havendo diferença significativa entre as suas contagens.

Estudos avaliando a resistência térmica de leveduras probióticas livres e a proteção oferecida pelo microencapsulamento com variadas temperaturas de aquecimento são escassos. Contudo, percebe-se que a combinação de inulina e proteína de arroz no microencapsulamento demonstraram eficácia quanto à resistência térmica de *S. boulardii* microencapsulada, corroborando com Rosolen *et al.* (2019), que referem a proteção das microcápsulas com bactérias e material encapsulante de inulina e soro de leite durante o tratamento térmico.

Tabela 5 – Resistência ao tratamento térmico das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii*, livres e microencapsuladas.

Tempo (min)	Temperaturas (°C)	Número de células viáveis (log UFC.g ⁻¹)			
		Células livres		Células encapsuladas	
		<i>K. phaffii</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>K. phaffii</i>	<i>S. boulardii</i>
0	60 / 65 / 70	10,9±0,04 ^a	10,9±0,03 ^a	10,8±0,03 ^b	10,7±0,02 ^b
	60	10,2±0,05 ^a	NV	10,2±0,06 ^a	9,8±0,29 ^b
10	65	9,5±0,01 ^a	NV	8,2±0,09 ^b	7,7±0,00 ^c
	70	7,7±0,00	NV	NV	NV
	60	10,1±0,09 ^a	NV	10,1±0,01 ^a	9,6±0,05 ^b
20	65	8,4±0,91 ^a	NV	7,7±0,00 ^b	NV
	70	NV	NV	NV	NV
	60	9,9±0,03 ^a	NV	9,3±0,02 ^b	9,2±0,05 ^b
30	65	7,8±0,17	NV	NV	NV
	70	NV	NV	NV	NV

Fonte: Elaborado pelo autor. Os resultados representam a média ± desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância. A ausência de letras indica que não houve diferença significativa. NV = não viável.

Sabe-se que as leveduras possuem uma parede celular rígida (MOREIRA *et al.*, 2015), são células eucarióticas (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020), modestas em sua faixa de temperatura, sendo relatadas como fisiologicamente ativas de -5 °C a aproximadamente 60 °C, e que o aquecimento gradual induz resistência térmica em *S.*

cerevisiae, enquanto a exposição ao choque térmico resulta em altas taxas de morte celular (GUYOT *et al.*, 2015).

Embora *S. boulardii* seja resistente a condições ácidas e a alguns patógenos, não possui a mesma robustez que *K. phaffii* em termos de resistência a solventes, altas temperaturas e variações extremas de pH. Essa limitação restringe seu uso a ambientes biológicos e probióticos, em contraste com *K. phaffii*, que é mais adequada para aplicações industriais devido à sua maior resistência a condições adversas (CEREGHINO; CREGG, 2000; CZERUCKA *et al.*, 2007).

O fato da *S. boulardii* livre não ter apresentado taxa de sobrevivência nas variadas temperaturas pode estar relacionado ao choque térmico ou a própria característica da membrana e parede celular da levedura. Já *K. phaffii* livre, que demonstrou elevadas taxas de sobrevivência às temperaturas avaliadas, apresenta potencial comercial e sua aplicação pode ser uma inovação tecnológica em diversas matrizes alimentares. Mesmo que ambas as leveduras pertençam à mesma família, elas possuem características diferentes, e por isso, ressalta-se a necessidade de mais estudos acerca dessas diferenças.

5.7 Sobrevivência das leveduras livres e microencapsuladas aplicadas a uma matriz alimentar sob armazenamento

Considerando todos os resultados citados neste estudo, percebe-se que as leveduras apresentaram potencial para serem aplicadas em matrizes alimentares e, conforme a Figura 6, *K. phaffii* livre permaneceu estável no leite de castanha por sete dias, tendo uma queda significativa a partir de 14 dias, mas permanecendo com taxa de sobrevivência eficiente até os 28 dias ($9,8 \log \text{UFC.g}^{-1}$), sendo assim notável sua sobrevivência de forma significativa com os demais ensaios experimentais. Já *S. boulardii* livre, durante o processo, apresentou redução significativa na sobrevivência a partir de sete dias e aos 28 dias apresentou sobrevivência de $8,9 \log \text{UFC.g}^{-1}$.

As microcápsulas com as leveduras quando foram aplicadas no alimento, apresentavam 20 dias de armazenamento sob refrigeração (4°C), e iniciaram com contagens acima de $9 \log \text{UFC.g}^{-1}$, enquanto as leveduras livres acima de $10 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Observa-se que as microcápsulas com *K. phaffii* mantiveram-se estáveis aos

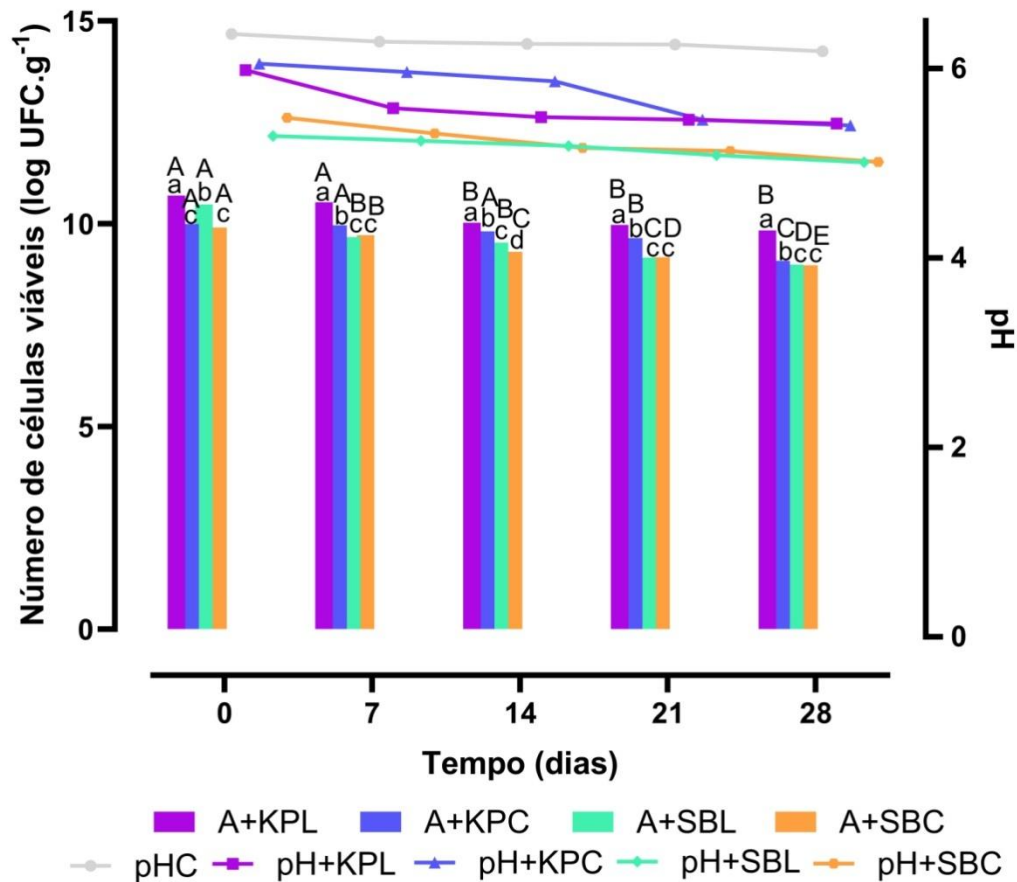
14 dias e, a partir dos 21 dias, ocorreu redução na sua sobrevivência de forma significativa, porém mantiveram-se concentrações de células viáveis aos 28 dias de 9,1 log UFC.g⁻¹. Já *S. boulardii* microencapsulada apresentou redução significativa na sua sobrevivência aos sete dias e entre 14 e 21 dias manteve-se estável, ocorrendo redução da sua sobrevivência aos 28 dias (8,9 log UFC.g⁻¹).

Observa-se ainda que o grupo controle durante todo o período de armazenamento não demonstrou crescimento de microrganismos em placas contendo meio YPD, por tal motivo não se encontra na Figura 6 sua viabilidade celular.

Bruno *et al.* (2020) avaliaram o leite de castanha de caju como matriz para fornecer cepas probióticas comerciais (*Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*), a fim de desenvolver uma bebida probiótica não láctea e concluíram que todas as bactérias avaliadas foram capazes de sobreviver nesta matriz alimentar abaixo de 4°C por 30 dias e que a matriz alimentar não afetou as bactérias.

Cunha Júnior *et al.* (2021) desenvolveram e caracterizaram uma bebida, à base de extrato de castanha-do-Brasil, fermentada por *Lactobacillus casei* e adicionada de inulina, sob armazenamento durante 28 dias em refrigeração (4 °C). O probiótico *L. casei* apresentou contagens no dia zero de 9,48 log UFC.mL⁻¹ e no dia 28, de 8,59 log UFC.mL⁻¹, tendo uma redução em sua sobrevivência, mas mantendo sua sobrevivência viável até o final do armazenamento.

Figura 6 – Sobrevivência das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* livres e microencapsuladas, e alterações de pH durante o armazenamento a 4 °C em leite de castanha.



Fonte: Elaborado pelo autor. A+KPL: leite de castanha com *K. phaffii* livre; A+KPC: leite de castanha com *K. phaffii* microcápsula; A+SBL: leite de castanha com *S. boulardii* livre; A+SBC: leite de castanha com *S. boulardii* microcápsula; pHK: pH leite de castanha; pHK+KPL: pH leite de castanha com *K. phaffii* livre; pHK+KPC: pH leite de castanha com *K. phaffii* microcápsula; pHK+SBL: pH leite de castanha com *S. boulardii* livre; pHK+SBC: pH leite de castanha com *S. boulardii* microcápsula. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre si para o fator alimento com formas diversas das leveduras e letras diferentes sobrescritas maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre si para o fator alimento com levedura específica pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Durante o período de análise, vimos que o pH do grupo controle manteve-se aos 28 dias acima de 6,0, não sendo observada nenhuma anormalidade (Figura 6).

É notável que o pH do leite com as leveduras encapsuladas permaneceu maior que o pH do leite com as leveduras livres, até aproximadamente os 14 dias para *K. phaffii* e 7 dias para *S. boulardii*. Esta última, em sua forma livre, apresentou valores de pH desde

o início significativamente inferiores, variando entre 5,3 e 5,0. *K. phaffii* livre apresentou valores de pH significativamente acima de *S. boulardii* livre. Com isso, temos nesse estudo que a medida que o pH reduz, a taxa de sobrevivência sofre redução, porém as leveduras permaneceram viáveis durante todo o período avaliado.

Estes resultados corroboram com os do estudo de Bruno *et al.* (2020), que analisaram *B. animalis* no leite de castanha e também observaram uma redução significativa do pH, que passou de 6,45 para 5,65 após 30 dias de armazenamento. Embora o pH tenha reduzido durante o armazenamento da bebida de castanha de caju, *B. animalis* também permaneceu viável durante todo o período avaliado.

Ainda, Cunha Júnior *et al.* (2021) observaram que o pH da bebida fermentada com *L. casei* reduziu significativamente ao longo do armazenamento, iniciando com 5,56 e concluindo com 5,16. Já na amostra controle, não houve alterações significativas nos valores de pH.

Dessa forma, temos que a utilização do leite de castanha sem presença de açúcares e conservantes, mostrou-se viável para manter a sobrevivência das leveduras na sua forma livre e microencapsulada durante os 28 dias de armazenamento sob 4 °C.

Pontanto, este estudo demonstrou que é possível desenvolver um produto de origem vegetal, simbiótico e hipoalergênico, elaborado apartir da castanha como matéria-prima, fonte de levedura probiótica, com presença do prebiótico inulina e proteína vegetal de arroz, sendo um produto prático e de destacável valor nutricional, com potencial para atender as premissas de restrições alimentares e/ou ideológicas e contribuindo para o equilíbrio da microbiota intestinal.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produtividade da biomassa celular e contagens das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* durante as fermentações, atingiram concentrações e taxas de sobrevivências adequadas. A combinação de proteína de arroz e inulina utilizada como material encapsulante não conferiu maior proteção para ambas as leveduras durante o armazenamento de 60 dias, sendo que a temperatura de 4 °C foi a que manteve mais estáveis as leveduras livres e microencapsuladas.

Quanto à resistência à passagem pelo TGI simulado, a microencapsulação não protegeu as células de leveduras dos efeitos dos sucos gástricos e intestinais, pois as células livres obtiveram melhores taxas de sobrevivência.

No teste de resistência térmica, a microencapsulação protegeu *S. boulardii* na temperatura de 60 °C durante os três tempos analisados e 65 °C por 10 min, e *K. phaffii* livre teve sobrevivência significativamente maior no teste térmico e *S. boulardii* livre não resistiu ao aquecimento.

A aplicação das leveduras em leite de castanha mostrou-se eficiente e manteve as leveduras viáveis, tanto na sua forma livre como microencapsulada, durante os 28 dias de armazenamento a 4 °C, possibilitando a obtenção de um produto funcional, não lácteo, hipoalergênico e simbiótico, combinando leveduras probióticas com prebióticos, como a inulina, a fim de intensificar os efeitos de ambos no equilíbrio da microbiota intestinal.

Pode-se compreender que *K. phaffii* livre apresentou taxas de sobrevivências superiores a *S. boulardii* em algumas análises realizadas, apresentando potencial para novos estudos visando a aplicação em alimentos, microencapsulação com outros materiais encapsulantes e como agente profilático e terapêutico na promoção e prevenção de doenças. Isso fortalecerá a conquista do setor de tecnologia de alimentos e indústria farmacêutica, assim como a biotecnologia, regulamentando e implementando no mercado uma nova levedura probiótica, no setor de alimentos e saúde.

7 MANUSCRITO 1 – Potencial probiótico da levedura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*): revisão sistemática

SANTOS, E. D.¹; MESSENBURGER, G. P.²; COLLARES, L. N.³; CORRÊA, Y. M.⁴; RASCH, I. B. D.⁵; FURTADO, M. R.⁶; DIAZ, P. S.⁷

Ediane Deijaly dos Santos^{1,*} deijaly@hotmail.com; Gabriel Peres Messenburger³ gabrielmessenburger@gmail.com; Lucas das Neves Collares³ lucasnevescollares@gmail.com; Yasmim de Macedo Corrêa² yasmimcorress2@gmail.com; Isabela Boldrini Dutra Rasch² isabelabrasch@gmail.com; Marcelo Rosado Furtado² marcelorosado2011@hotmail.com; Patrícia Diaz de Oliveira^{1,2} bilica.diaz@gmail.com.

¹Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas, Av Eliseu Maciel - Campus Capão do Leão - Pelotas - RS / Brasil.

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Unidade de Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas, Av Eliseu Maciel - Campus Capão do Leão - Pelotas - RS / Brasil.

³Departamento de Nutrição, Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas, Campus Anglo, Gomes Carneiro n1, Porto, Pelotas - RS / Brasil.

*Autor Correspondente: Ediane Deijaly dos Santos. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, UFPel, Av Eliseu Maciel, Campus Capão do Leão, Pelotas - RS - Brasil. deijaly@hhotmail.com

Número de telefone: 55 (84) 987363360

Manuscrito escrito conforme normas do periódico Applied Microbiology and Biotechnology.

RESUMO

Os benefícios dos probióticos vêm ganhando interesse e popularidade na comunidade científica. Durante algum tempo, as leveduras têm sido relatadas quanto sua eficácia como probióticos, especialmente *Saccharomyces boulardii*, enquanto *Komagataella phaffii*, (anteriormente *Pichia pastoris*), é considerada uma levedura relevante para a produção industrial de proteínas com diversas vantagens, como alta eficiência secretora e rendimentos de biomassa. Dessa forma, posteriormente, o efeito probiótico de *K. phaffii* tem apresentado interesse quanto aos benefícios de seu consumo e com isso o estudo trata de uma revisão sistemática das propriedades e dos efeitos probióticos dessa levedura. Foram utilizados dados disponíveis em diferentes bases de dados (Pubmed, Embase, Lilacs, Scopus, Web of Science, Science Direct e Periódicos Capes), seguindo as seguintes etapas: formulação da pergunta, coleta de dados (identificação), seleção (exclusão), definição das características de elegibilidade e análise das evidências selecionadas. Foram identificados 126 artigos, onde, através do processo de seleção, seis artigos foram aprovados. O efeito probiótico de *K. phaffii* tem sido evidenciado por alguns estudiosos, onde a levedura demonstrou benefícios aos animais no que trata da estimulação do crescimento e imunidade, bem como resistiu às condições do TGI, promoveu proteção contra patógenos, permaneceu viável na alimentação dos animais sob armazenamento em refrigeração e ainda apresentou efeito antidepressivo promissor. Todavia, existem poucos estudos científicos relacionados ao tema, visto que esses experimentos científicos são importantes para comprovar e/ou verificar o potencial probiótico de *K. phaffii*, uma vez que a demanda por novos probióticos cresce a cada dia.

Palavras chave: *Komagataella phaffii*; *Pichia pastoris*; leveduras; probióticos.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são células eucarióticas amplamente utilizadas para a expressão de várias proteínas na produção de vacinas e produtos farmacêuticos. O mecanismo de expressão de proteínas nesses microrganismos é semelhante ao das células mamíferas. Em comparação com as bactérias, células de leveduras apresentam vantagens na modificação pós-traducional, expressão secretória e fácil manipulação genética (KARBALAE *et al.*, 2020). Ainda, o tamanho das leveduras, que é 10 vezes maior do que o das bactérias e representa menos de 0,1% da microbiota intestinal, pode permitir uma melhor cobertura ao longo do trato gastrointestinal (TGI) devido sua maior dimensão (HSIUNG *et al.*, 2021).

Conforme Das *et al.* (2022), as leveduras têm sido consideradas importantes probióticos no microbioma humano e animal e suas características incluem autoagregação, coagregação, hidrofobicidade da superfície celular, tolerância ao TGI, assimilação de colesterol, produção de exopolissacarídeos (EPS), produção de substâncias antimicrobianas e metabólitos. Incluindo, também, a imunomodulação através da manutenção geral da microbiota intestinal apartir de interações precisas.

Desde a década de 1950, a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) está disponível comercialmente como suplemento, e a pesquisa clínica que a utilizou começou em 1977, e mostrou de forma convincente sua natureza não patogênica para uso seguro (MCFARLAND, 2010) e que esta cepa pode fornecer melhor proteção contra infecções microbianas, bem como compostos tóxicos que podem prevenir danos às células epiteliais intestinais (CAPECE *et al.*, 2018).

Komagataella phaffii (*K. phaffii*; anteriormente descrita como *Pichia pastoris*) é uma espécie de levedura relevante para a produção industrial de proteínas. Esta espécie é amplamente aplicada como hospedeiro heterólogo de produção de proteínas, e sua utilização tem sido amplamente relatada na literatura (KURTZMAN, 2009; AHMAD *et al.*, 2014; MACCANI *et al.*, 2014; PEÑA *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2019; BUSTOS *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2020).

Historicamente, segundo Zahrl *et al.* (2017), a levedura *K. phaffii* foi isolada pela primeira vez em 1920 por Guilliermond dos exsudatos de uma castanheira na França e foi nomeado *Zygosaccharomyces pastoris*. Logo então, foi categorizado o organismo para um novo gênero, *Komagataella* ou *Pichia* (YAMADA, *et al.*, 1995; NAUMOV;

NAUMOVA; BOUNDY-MILLS, 2018), pertencente à família *Saccharomycetaceae* (MORIKAWA *et al.* 2007).

As principais vantagens deste organismo são a possibilidade de realizar fermentação de alta densidade de acordo com protocolos estabelecidos, engenharia genética flexível e adaptada para automação (BAGHBAN *et al.* 2018), modificações pós-traducionais eucarióticas (LAUKENS *et al.*, 2020; LAUKENS *et al.*, 2015), alta eficiência na secreção de proteínas e elevados rendimentos de biomassa, podendo atingir concentrações de biomassa superiores a 100 g/L de peso seco de células (HENRÍQUEZ *et al.*, 2019; HEISTINGER *et al.*, 2020; RASCHMANOVÁ *et al.*, 2021; MOHAMMADZADEH *et al.*, 2021).

Dessa forma, a abordagem do efeito probiótico de *K. phaffii* tem sugerido interesse na busca desse benefício, tendo em vista as vantagens dessa levedura. Portanto, o estudo propôs revisar a literatura a fim de reunir informações científicas quanto ao efeito probiótico de *K. phaffii* por permanecer ainda desconhecido em diversas aplicações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Design de estudo

Esta revisão sistemática foi conduzida de acordo com as recomendações do Cochrane Handbook for Systematic Reviews e relatada seguindo as diretrizes Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (PAGE *et al.*, 2021).

2.2 Questão de pesquisa

O objetivo deste estudo foi avaliar as evidências disponíveis sobre o efeito probiótico de *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*).

2.3 Critério de eleição

Para atingir o objetivo da pesquisa de avaliar o efeito probiótico de *K. phaffii*, aplicamos critérios de inclusão e exclusão. Não houve restrição quanto ao idioma dos estudos avaliados na busca. Foram excluídos os estudos que não avaliaram o efeito probiótico de *K. phaffii*, revisões narrativas, revisões sistemáticas, metanálises e estudos em andamento. Foram incluídos todos os estudos que avaliaram o efeito probiótico de *K. phaffii*.

2.4 Estratégia da pesquisa

Realizamos as buscas nas seguintes bases de dados (Pubmed, Embase, Lilacs, Scopus, Web of Science, Science Direct e Periódicos Capes) até janeiro de 2024, sem restrição de data. A estratégia de pesquisa incluiu várias combinações de termos de texto livre relacionados com *Pichia pastoris* (por exemplo, '*Pichia pastoris*', '*Komagataella phaffii*') e probiótico. Os operadores booleanos OR e AND foram utilizados para construir a estratégia de busca com esses descritores (Tabela 1).

Tabela 1: Estratégia de busca com descritores.

Data base	Termos	Resultados
PubMed	(((((<i>Pichia pastoris</i> [Title/Abstract]) OR (<i>P. pastoris</i> [Title/Abstract])) OR (<i>P. pastoris</i> [Title/Abstract])) OR (<i>Komagataella phaffii</i> [Title/Abstract])) OR (<i>K phaffii</i> [Title/Abstract])) AND ((Probiotic[Title/Abstract]) OR (Probiotics[Title/Abstract]))	20
Lilacs	(<i>Pichia pastoris</i> OR <i>P. pastoris</i> OR <i>P pastoris</i> OR <i>Komagataella phaffii</i> OR <i>K phaffii</i>) AND (probiotic OR probiotics OR probiotico)	1
EMBASE	#1 ' <i>pichia pastoris</i> ':ab,ti OR 'p. pastoris':ab,ti OR 'p pastoris':ab,ti OR ' <i>komagataellaphaffii</i> ':ab,ti OR 'k phaffii':ab,ti OR ' <i>komagataella pastoris</i> ':ab,ti#2 probiotic:ab,ti OR probiotics:ab,ti#3#1 AND #2	23
Scopus	((TITLE-ABS-KEY (<i>pichia</i> AND <i>pastoris</i>) OR TITLE-ABS-KEY (<i>p.</i> AND <i>pastoris</i>) OR TITLE-ABS-KEY (<i>p</i> AND <i>pastoris</i>) OR TITLE-ABS-KEY (<i>komagataella</i> AND <i>phaffii</i>) OR TITLE-ABS-KEY (<i>k</i> AND <i>phaffii</i>))) AND ((TITLE-ABS-KEY (<i>probiotic</i>) OR TITLE-ABS-KEY (<i>probiotics</i>)))	33
Web of Science	#1 <i>Pichia pastoris</i> (Topic) or <i>P. pastoris</i> (Topic) or <i>P pastoris</i> (Topic) or <i>Komagataella phaffii</i> (Topic) or <i>K phaffii</i> (Topic) #2 probiotic Probiotic (Topic) or Probiotics (Topic) #3 #1 AND #2	34
CAPES	Title: (<i>Pichia Pastoris</i> OR <i>P. pastoris</i> OR <i>P pastoris</i> OR <i>Komagataella phaffii</i> OR <i>K phaffii</i>) AND (Probiotic OR probiotics)	3
Science Direct	Title, abstract, keywords: (<i>Pichia pastoris</i> OR <i>P. pastoris</i> OR <i>P pastoris</i> OR <i>Komagataella phaffii</i> OR <i>K phaffii</i>) AND (probiotic OR probiotics)	12
Total		126

Fonte: Elaborado pelos autores.

2.5 Seleção do estudo

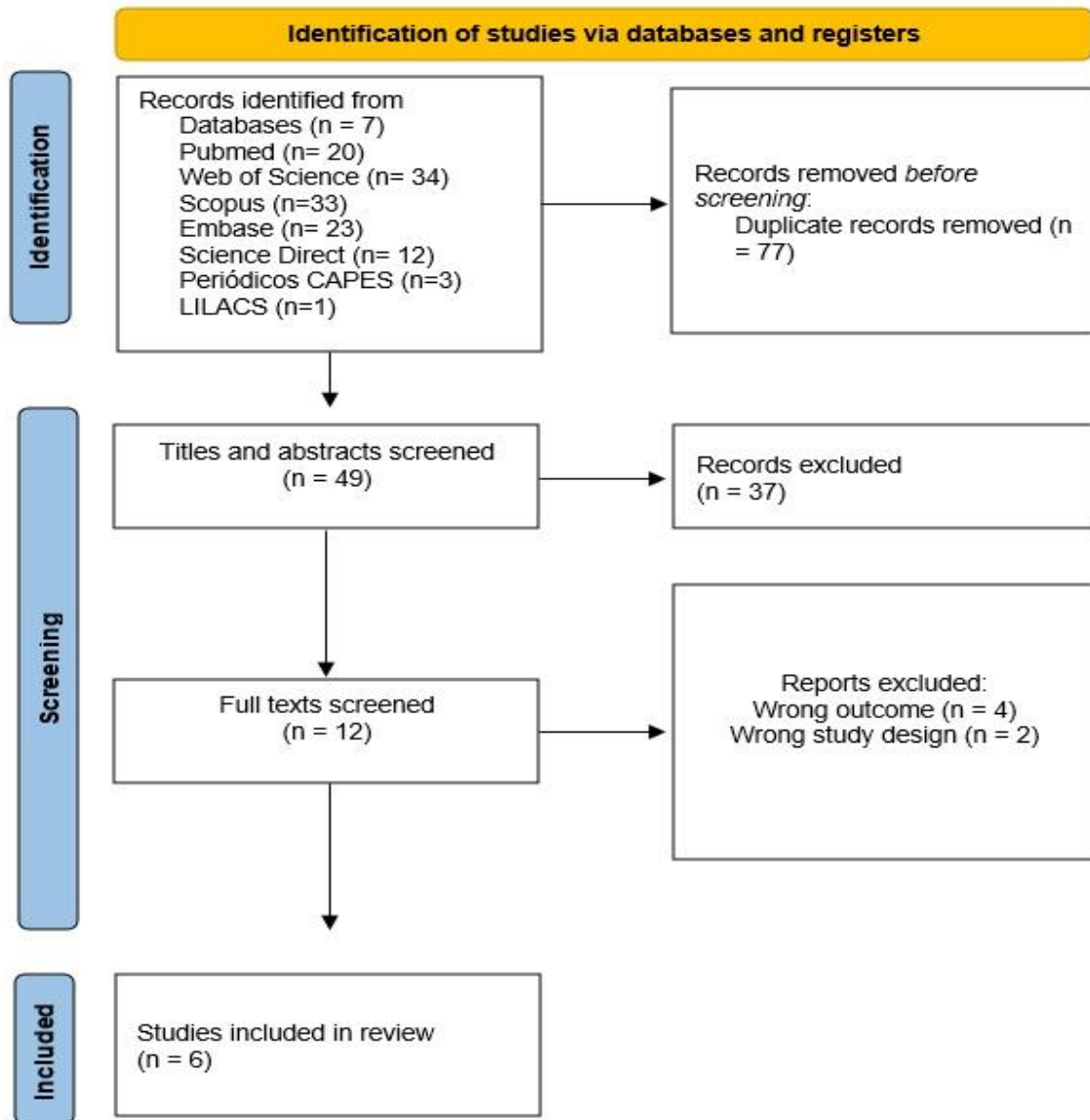
Após a realização das buscas em múltiplas bases de dados, foi realizada uma revisão manual para excluir artigos duplicados. Dois revisores independentes (IBDR e YMC) avaliaram minuciosamente os títulos, resumos e textos completos dos artigos. Eventuais divergências surgidas durante o processo de revisão foram resolvidas por consenso e, caso necessário, um terceiro revisor (ED) foi consultado, para dirimir as divergências. Além disso, foi realizada uma busca manual nas referências de todos os estudos incluídos nesta revisão sistemática para identificar quaisquer artigos adicionais que não tenham sido descobertos através da busca eletrônica. Todo o processo de seleção dos estudos foi facilitado utilizando a plataforma Rayyan (OUZZANI *et al.*, 2016).

3 RESULTADOS

Para esta revisão sistemática de estudos que avaliaram o efeito probiótico de *K. phaffii*, conforme Figura 1, um total de 126 registros foram recuperados das sete bases de dados eletrônicas Pubmed, Embase, Lilacs, Scopus, Web of Science, Science Direct e Periódicos Capes. A seguir, ao retirar as duplicatas, foram excluídos 77 artigos.

Durante a triagem por meio da verificação do título e/ou resumo utilizando os critérios de exclusão e inclusão, foram analisados 49 artigos, sendo que posteriormente, 12 artigos passaram para a fase da leitura completa dos documentos, onde dois revisores independentes (IBDR e YMC) avaliaram minuciosamente os títulos, resumos e textos completos dos artigos e ainda um terceiro revisor (ED) foi consultado para dirimir as divergências. Desses, quatro trabalhos foram excluídos por falta de informação sobre efeito probiótico de *K. phaffii* e dois por serem de revisão. Assim, seis artigos foram considerados adequados quanto ao critério de eleição para inclusão nesta revisão sistemática.

Figura 1 - Fluxograma da metodologia utilizada na seleção dos artigos a serem incluídos na revisão sistemática.



Fonte: Adaptado e traduzido de PRISMA (PAGE *et al.*, 2021).

Os seguintes dados foram extraídos dos artigos: autor, ano de publicação, país onde o estudo foi realizado, aspectos metodológicos (característica da amostra, tratamento e cepa da levedura estudada com dose em Unidade Formadora de Colônia) e os principais resultados (Tabela 2).

Tabela 2 - Pesquisas sobre o efeito probiótico de *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*) em estudo *in vivo*.

Autores, País, Ano	Característica da amostra	Tratamentos e cepa levedura (dose UFC)	Resultados
Gil de Los Santos <i>et al.</i> , Brasil, 2012.	Frangos	Todos os grupos receberam ração. Grupo 2, 3 e 4 receberam 6 log UFC.g ⁻¹ de <i>P. pastoris</i> KM71H, <i>P. pastoris</i> KM71H recombinante com <i>C. perfringens</i> e <i>B. cereus</i> , respectivamente.	Ganho de peso dos frangos que receberam <i>P. pastoris</i> e soroconversão contra <i>C. perfringens</i> maior, nos dois grupos que receberam a levedura.
França <i>et al.</i> , Brasil, 2015.	Camundongos	Aproximadamente 7 log UFC.g ⁻¹ de <i>P. pastoris</i> X-33 ou <i>S. boulardii</i> foram adicionados à ração pré-moída.	<i>P. pastoris</i> X-33 permaneceram viável na ração por pelo menos dois meses, resistiu à passagem do TGI, inibiu o crescimento de <i>S. Typhimurium in vitro</i> , protegeu camundongos da infecção por <i>S. Typhimurium</i> e não observou lesões nos estudos histopatológicos.
Pinto <i>et al.</i> , Brasil, 2015.	Larvas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	Todos os grupos receberam ração. Grupo 2, 3 e 4 receberam 9 log UFC.g ⁻¹ de <i>P. pastoris</i> , <i>S. boulardii</i> , <i>B. cereus</i> , respectivamente.	<i>P. pastoris</i> proporcionou às larvas um crescimento semelhante ao tratamento controle.
Gil de Los Santos <i>et al.</i> , Brasil, 2018.	Frangos	Todos os grupos receberam ração. Grupo SBY, PPE e PPY receberam 7 log UFC.g ⁻¹ de <i>S. boulardii</i> cultivada em YPD, <i>P. pastoris</i> X-33 cultivada em efluente de parboilização de arroz e <i>P. pastoris</i> X-33 cultivado em YPD, respectivamente.	<i>P. pastoris</i> X-33 cultivada em efluente de arroz parboilizado suplementado com biodiesel glicerol melhorou a resposta às vacinas e quando cultivada em YPD aumentou a eficiência alimentar.
Gaboardi <i>et al.</i> , Brasil, 2019.	Codornas	Grupo controle recebeu dieta basal sem levedura; Grupo T2 e T3 receberam dieta basal suplementada com 7 log UFC.g ⁻¹ de <i>P. pastoris</i> X-33 produzida em efluente de arroz parboilizado e produzida em meio YPD, respectivamente.	<i>P. pastoris</i> X-33 melhorou resposta imunológica das codornas, tanto a cultivada em YPD quanto em resíduos industriais e o peso do ovo aumentou com <i>P. pastoris</i> cultivada em YPD.
Birmann <i>et al.</i> , Brasil, 2021.	Camundongos	Administrado <i>K. pastoris</i> KM71H (8 log UFC.g ⁻¹ /animal, via intragástrica) em modelos animais de comportamento depressivo induzido por estresse.	<i>K. pastoris</i> KM71H possui efeito antidepressivo, não alterou os níveis plasmáticos de marcadores de lesão hepática e renal e na análise histopatológica nenhuma lesão foi observada.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Dentre os artigos incluídos na revisão, a maioria descreve *K. phaffii* com *P. pastoris* ou ainda *K. pastoris* e 50% trabalharam com *K. phaffii* X-33, 33,3% com a *K. phaffii* KM71H e 16,7% não citam o tipo de cepa, sendo que em todos estudos suplementaram os animais com a levedura, através de rações ou sob gavagem, com doses variando de 6 a 9 log UFC.g⁻¹.

Dessa forma, percebe-se que o efeito probiótico da levedura foi avaliado quanto à viabilidade celular e estabilidade da levedura na ração (dois dos estudos), peso e conversão alimentar dos animais (quatro dos estudos), resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e *in vivo* (um dos estudos), capacidade de inibição e ação antibacteriana (dois dos estudos), modulação das respostas imunológicas (três dos estudos), análises histopatológicas e marcadores bioquímicos (quatro dos estudos).

Todavia, os resultados encontrados nesta revisão sistemática mostram que existem poucos trabalhos realizados com *K. phaffii* avaliando seu efeito probiótico nos últimos treze anos. Levando assim, uma tendência no aumento do número de pesquisas no tema nos próximos anos, uma vez que cinco dos seis trabalhos foram realizados nos últimos dez anos, sendo um deles realizados nos últimos quatro anos e que todos os estudos citados nessa revisão utilizaram animais para avaliar o efeito probiótico de *K. phaffii*.

Recentemente, o uso de leveduras como probiótico tem levantado interesse e atenção e, diante destes resultados, mais pesquisas são necessárias para investigar novas características de *K. phaffii* com potenciais propriedades probióticas em benefícios de animais e seres humanos.

4 DISCUSSÃO

De acordo com os estudos aqui revisados, as evidências apontam eficácia nas propriedades probióticas de *K. phaffii* e conforme Das *et al.* (2022), os probióticos são micróbios vivos e não patogênicos que são cruciais para a manutenção da saúde humana e as leveduras têm sido consideradas um importante probiótico no microbioma humano.

Um microrganismo para ser considerado probiótico deve ser viável, benéfico à saúde humana, apresentar propriedades não patogênicas, ser resistente ao processamento tecnológico, apresentar-se como células vivas e em quantidades adequadas, resistir às condições adversas do trato gastrointestinal, sobrevivendo aos efeitos do ácido clorídrico e dos sais biliares produzidos pelo sistema digestório, colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, produzir substâncias antimicrobianas e apresentar influência sobre o sistema imunológico e as atividades metabólicas (FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014; WENDLING; WESCHENFELDER, 2013; BRANDÃO, 2013).

Gaboardi *et al.* (2019) reforça ainda que um dos requisitos para que um microrganismo seja utilizado como probiótico é a capacidade de preservar sua viabilidade por longos períodos sob condições de armazenamento.

Vale ressaltar que dentre os estudos encontrados nesta revisão os quais observaram viabilidade celular e estabilidade de *K. phaffii* na ração dos animais temos por meio de França *et al.* (2015) relato que a concentração de células viáveis de *P. pastoris* X-33 permaneceu estável na ração dos animais por pelo menos 2 meses (7 logUFC.g⁻¹), as quais foram armazenadas a 4°C até o uso e a cada 7 dias quantificava (log UFC.g⁻¹) para avaliar a viabilidade e estabilidade.

Gaboardi *et al.* (2019) validaram em seu estudo a viabilidade celular de *P. pastoris* X-33, a qual foi mantida sem diminuição na concentração de células viáveis, provavelmente porque a levedura fresca foi adicionada à dieta todas as semanas e que os *pellets* de células da levedura mantidos refrigerados a 4°C, ressuspensos em solução salina 0,9%, durante todo o experimento, permaneceu viável por

aproximadamente três meses, com redução na viabilidade celular apenas no último mês, em 0,5 log. mL⁻¹.

As concentrações de probióticos no alimento considerados acima do mínimo preconizado para ter efeitos benéficos *in situ* é de 6 log UFC.g⁻¹ (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2002; PAPADOPOULOU *et al.*, 2018) e com isso, percebe-se que *K. phaffii* demonstrou poder manter esse número e, conseqüentemente, o efeito probiótico e potencial para o desenvolvimento tecnológico de produtos alimentícios funcionais, pois as células da levedura permaneceram viáveis durante o tempo de armazenamento e sob temperatura de refrigeração nas rações dos animais.

Saber *et al.* (2017) referem que outras vantagens das leveduras probióticas incluem o aumento da ingestão alimentar, o fortalecimento do sistema imunológico, a prevenção de doenças gastrointestinais e a redução dos níveis de colesterol no sangue.

Entre os estudos incluídos nesta revisão, percebe-se que o peso e a conversão alimentar dos animais, foram melhorados com a suplementação de *K. phaffii*. Gil de Los Santos *et al.*, (2012) conferem que o maior ganho de peso foi obtido pelos frangos de corte alimentados com *P. pastoris* recombinante (2,36 kg), seguidos por aqueles que receberam *B. cereus* var. *toyoi* (2,28 kg), *P. pastoris* KM71H (2,17 kg) e ração não suplementada (2,12 kg) e que a melhor conversão alimentar foi obtida pelo grupo que recebeu *P. pastoris* recombinante (2,35), seguido pelos grupos *P. pastoris* KM71H, *B. cereus* e controle (2,41, 2,5 e 2,58, respectivamente). Com isso, as taxas de conversão alimentar mostraram que os animais suplementados com *P. pastoris* recombinante consumiram 8,9% e com *P. pastoris* KM71H 6,6% menos ração do que o grupo controle para atingir o mesmo peso vivo.

No entanto, Pinto *et al.* (2015) observaram em seu estudo com larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) que *Bacillus cereus* var. *toyoi* apresentou os melhores resultados, pois ao final da primeira semana as larvas desse tratamento pesaram 25% mais que as do controle e ao final do experimento a diferença aumentou para 28% e que *P. pastoris* proporcionou às larvas um crescimento semelhante ao tratamento controle.

Gil de Los Santos *et al.* (2018) demonstram que grupo de frangos suplementados com *P. pastoris* X-33 cultivada em meio de efluente da indústria de arroz parboilizado

suplementado com biodiesel glicerol apresentou os melhores ganhos de peso aos 42 dias de idade, que nos dias 7, 14 e 21 foram 19%, 15% e 8,7% maiores, respectivamente, do que o grupo controle e a melhor conversão alimentar, 8,2% superior ao grupo controle, foi obtida pelo grupo suplementado com *P. pastoris* X-33 cultivado em meio YPD aos 42 dias.

Ainda no estudo da Gaboardi *et al.* (2019) foi conferido que o peso do ovo das codornas aumentou com a suplementação de *P. pastoris* X-33 cultivada em YPD, demonstrando assim ser uma levedura probiótica promissora para aves.

A capacidade de sobrevivência dos microrganismos sob condições do TGI simulado tem sido geralmente considerada uma característica chave na seleção de potenciais probióticos. A cepa probiótica deve tolerar o ácido estomacal seguido por concentrações mais altas de sais biliares no TGI. Esta característica é crucial para manter a viabilidade e a taxa de sobrevivência dos probióticos no ambiente hostil do TGI (KIZERWETTER-ŸWIDA; BINEK, 2016).

Silva Júnior e Gonzalez (2022) reforçam que a capacidade de adesão à mucosa intestinal é considerada um pré-requisito para a colonização e otimização do sistema Imunológico e que a ação destes microrganismos sobre os hospedeiros depende da quantidade da espécie existente no intestino, do tempo de permanência e do tempo no qual se mantém vivos.

É importante ressaltar que dentre os estudos incluídos nesta revisão, apenas um avaliou, pela primeira vez, a resistência de *K. phaffii* às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e *in vivo*, no qual França *et al.* (2015) referem que *P. pastoris* X-33 sobreviveu às condições simuladas do TGI em uma concentração suficientemente elevada para ter efeitos benéficos *in situ*, porque sua taxa de sobrevivência à exposição consecutiva às condições gástricas e intestinais foi de 76,8%. No estudo *in vivo* a levedura sobreviveu às condições do TGI de camundongos, uma vez que após 24 horas de administração da levedura, cerca de $6,84 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ foram encontrados em fezes frescas, 48 horas após a aplicação do tratamento, foram obtidos $2,87 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ e nenhum crescimento foi observado após 72 horas.

No entanto, observa-se que são necessários mais estudos avaliando a taxa de sobrevivência dessa levedura em condições gastrointestinais com variações de pH e

presença ou ausência da bile, visto que conforme Duongthingoc *et al.* (2013) ambientes ácidos e alcalinos desempenham um papel crítico nas funções metabólicas dos microrganismos, que afetam os seus padrões de crescimento.

Kuritza *et al.* (2014) relatam que a inclusão de probióticos no início da vida pode proteger contra patógenos oportunistas, colonizando o TGI com espécies benéficas e, assim, prevenindo a colonização de patógenos na região intestinal.

Além da competição por espaço físico na adesão intestinal, os probióticos produzem substâncias antimicrobianas capazes de inibir muitos patógenos e também são uma alternativa aos conservantes sintéticos aplicados em alimentos, pois podem melhorar a segurança e qualidade dos produtos alimentares. Os isolados de levedura probiótica mostraram notável atividade antimicrobiana contra patógenos (RAGAVAN; DAS, 2017).

A capacidade de inibição e ação antibacteriana de *K. phaffii* encontrada nos estudos desta revisão foram demonstrados por França *et al.* (2015), que evidenciaram que *P. pastoris* X-33 inibiu o crescimento de *S. Typhimurium* em ambos os meios de cultura (YPD e LB) após 24 horas de incubação e que a população de *S. Typhimurium* foi reduzida em aproximadamente 43% (de $2,1 \times 10^8$ para $1,2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) no caldo LB e 86% (de $1,0 \times 10^9$ a $1,4 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) em caldo YPD quando as bactérias foram co-cultivadas com a levedura, em comparação com o crescimento do grupo controle (apenas bactérias). O tempo de geração da bactéria aumentou também quando cultivada na presença de *P. pastoris* X-33 (36min), sendo que a bactéria cresceu rapidamente quando cultivada sozinha (24min) em ambos os caldos.

Ainda pode ser observado conforme França *et al.* (2015) que a adesão de *S. Typhimurium* às células intestinais foi reduzida em aproximadamente 47% (7,6–4,0%), quando incubada por 1 h com *P. pastoris* X-33, em comparação com bactérias incubadas isoladamente ($p < 0,05$). E que por fim, o potencial protetor desta cepa de levedura nos experimentos de desafio com *S. Typhimurium* em animais suplementados com a levedura por gavagem ou na dieta conferiram aumento na taxa de sobrevivência de 30% e as lesões nos animais sobreviventes foram reduzidas.

A eficácia da *K. phaffii* contra infecções garantem, através desses resultados o potencial das propriedades antimicrobianas dessa levedura e a capacidade de diminuir a adesão bacteriana às células intestinais, sendo promissores.

Gil de Los Santos *et al.* (2018) referem que uma das propriedades importantes dos probióticos é a sua capacidade de modular as respostas imunológicas e que depende das características do imunógeno e do adjuvante usado nas vacinas.

Dessa forma através dos resultados desta revisão quanto a modulação das respostas imunológicas, Gil de Los Santos *et al.*, (2012) demonstraram que *P. pastoris* KM71H e sua construção recombinante contendo o gene da toxina alfa de *Clostridium perfringens* aumentaram a soroconversão contra a toxina alfa de *Clostridium perfringens* em animais suplementados.

No estudo de Gil de Los Santos *et al.* (2018), frangos de corte fêmeas com um dia de idade foram vacinados contra bursite infecciosa (DII) e os títulos de anticorpos anti-DII foram medidos por ELISA, e foi observado que o grupo suplementado com *P. pastoris* X-33 cultivada no meio contendo efluente da indústria de arroz parboilizado suplementada com biodiesel glicerol apresentou melhora na resposta à vacina, sugerindo que a levedura tem efeito imunomodulador.

Gaboardi *et al.* (2019) vacinaram aves contra Doença de Newcastle (NDV), Bronquite Infecciosa Aviária (IBV) e Doença de Gumboro nos dias 1 e 28 e observaram que a suplementação de *P. pastoris* X-33 modulou o sistema imunológico das aves, aumentando os níveis de anticorpos anti-IBV, anti-NDV e anti-Gumboro em comparação ao controle e concluíram que a resposta imunológica das codornas foi melhorada pela *P. pastoris* X-33, tanto cultivada em meio YPD quanto em resíduos industriais.

No que trata as análises histopatológicas e marcadores bioquímicos, observa-se nos estudos desta revisão, conforme o estudo de Gil de Los Santos *et al.*, (2012), que nenhuma lesão significativa foi encontrada na análise histopatológica dos animais suplementados com *P. pastoris* KM71H. Mesmo nos grupos com maior ganho de peso, a integridade hepática foi preservada sem sinais de degeneração.

Ainda, França *et al.* (2015) conferiram, na análise histopatológica ausência de lesão nos animais suplementados com *P. pastoris* X-33, sem alterações nas microvilosidades intestinais e na lâmina própria, assim como Gil de Los Santos *et al.*

(2018) que não detectaram quaisquer efeitos indesejáveis nos animais suplementados com *P. pastoris* X-33.

Da mesma forma, Gaboardi *et al.* (2019) validam em seu estudo que a suplementação de codornas com *P. pastoris* X-33 cultivada em efluente de arroz parboilizado e glicerol de biodiesel e em YPD, não apresentaram alterações morfológicas no fígado e duodeno, ou seja, sem revelações de lesões.

Birmann *et al.* (2021) reforçam a atividade probiótica de *K. pastoris* KM71H após sua administração ($8 \log \text{UFC.g}^{-1}$) por 14 dias consecutivos em camundongos suíços induzidos por estresse e inflamação, onde observaram que não houve alterações no hemograma e leucograma, nos níveis de AST e ALT (marcadores de dano hepático) e uréia e creatinina (marcadores de dano renal), na temperatura corporal e na histopatologia do intestino, confirmando a segurança de seu uso. E ainda, destacam pela primeira vez que *K. pastoris* KM71H pode ser uma nova proposta para um probiótico com efeito antidepressivo promissor, visto aos efeitos antioxidantes induzidos pelo tratamento com a levedura, uma vez que sua administração atenuou o aumento dos níveis de espécies reativas e peroxidação lipídica.

Portanto, esta revisão apresenta aspectos importantes encontrados nos estudos mencionados quanto às propriedades probióticas de *K. phaffii*, sendo até o momento a primeira revisão sistemática que compila as pesquisas que avaliaram o efeito probiótico de *K. phaffii*. Desta forma fica evidente a necessidade de mais estudos quanto aos benefícios que essa levedura pode promover, tendo potencial tecnológico e inovador.

5 CONCLUSÃO

A levedura *Komagataella phaffii*, conhecida por sua característica de expressar proteínas heterólogas, (tornando-se mais reconhecida em aplicações na produção industrial de proteínas), demonstrou, em vários estudos, conforme esta revisão sistemática, outras propriedades importantes como o potencial probiótico. A levedura demonstrou benefícios aos animais dos estudos em questão, no que trata da estimulação do crescimento e a imunidade, resistiu às condições do TGI, promoveu proteção contra patógenos, permaneceu viável na alimentação dos animais e sob armazenamento em refrigeração e ainda apresentou efeito antidepressivo promissor. Todavia, nos últimos anos existem poucos estudos científicos relacionados ao efeito probiótico dessa levedura, visto que esses experimentos científicos são importantes para comprovar e/ou verificar o potencial probiótico de *K. phaffii*, uma vez que a demanda por novos probióticos cresce a cada dia. Portanto, explorar as propriedades probióticas de *K. phaffii* caracteriza uma estratégia interessante no desenvolvimento de inovação tecnológica na área de alimentos, como produção de alimentos funcionais e em saúde, através de um agente profilático e terapêutico.

REFERÊNCIAS

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Preparação e propriedades de probióticos encapsulados à base de proteínas do leite: uma revisão. **Ciência e Tecnologia de Laticínios**, v. 95, p. 393–412, 2015.

AGARBATI, A., *et al.* Potential probiotic yeasts sourced from natural environmental and spontaneous processed foods. **Foods**, v. 9, n. 287, 2020.

AGUIAR, L. M. Consumo de alimentos funcionais e seus efeitos fisiológicos. Em MRS Campos, editora. Compostos bioativos: benefícios para a saúde e aplicações potenciais (pp. 205-225).

AHMAD, M., *et al.* Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 98, p. 5301–5317, 2014.

ALBUQUERQUE, A. P., *et al.* Utilização de carregadores probióticos de polpa de fruta em pó como alimento funcional: aspectos gerais e perspectivas. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v. 24, 2021.

ALMEIDA, C. C., *et al.* Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 247-251, 2012.

ANTIGO, J. L. D., *et al.* Microencapsulação de corante de beterraba (*Beta vulgaris* L.) utilizando maltodextrina e goma xantana como agentes encapsulantes e aplicação em iogurte. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, p. 1–25, 2020.

AREVALO-VILLENA, M., *et al.* Biotechnological application of yeasts in food science: starter cultures, probiotics and enzyme production. *J Appl Microbiol.*, v. 123, p. 1360-1372, 2017.

ARRUDA, E. F., *et al.* Avaliação de sorvete tipo iogurte à base de soja com a adição de microrganismos probióticos. **Episteme Transversalis**, v. 6, p. 1-23, 2018.

ARSLAN, S. *et al.* Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: *Bouardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, p.685-690, 2015.

ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 18, p. 160-169, 2017.

BAGHBAN, R., *et al.* New Developments in *Pichia pastoris* Expression System, **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, p. 451-47, 2018.

BARRO, N.P.R. *et al.* Microencapsulation of Probiotic *Lactobacillus helveticus* with Different Wall Materials by Spray drying. **Biointerface Research in Applied Science**, v.11, n.4, p.11221-11232, 2021.

BARROSO, T. L. C. T., *et al.* Tecnologia de encapsulamento na área de alimentos: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, 2021.

BERBEL, C. Z., *et al.* Probióticos o tratamento da dermatite atópica e acne. **Visão Acadêmica**, v. 17, n. 2, p. 94- 115, 2016.

BIRMANN, P. T., *et al.* *Komagataella pastoris* KM71H modulates neuroimmune and oxidative stress parameters in animal models of depression: A proposal for a new probiotic with antidepressant-like effect. **Pharmacological Research**, v. 171, 2021.

BORGES, A. F.; ABREU, V. R. F. de. Uso de probióticos em indivíduos HIV positivos. **HU Revista**, v. 46, n.1, p. 1–7, 2020.

BRANDÃO, I. M. Utilização de prebióticos e probióticos em pediatria. **Scire Salutis**, v. 3, n. 2, p. 86-98, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Guia nº 21, versão 22, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União. Poder Executivo. Brasília, DF, 2018. Disponível em https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf. Acesso em 27 de maio de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa nº 76, de 5 de novembro de 2020, dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União. Poder Executivo. Brasília, DF. 2020. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5809185/IN_76_2020_COMP.pdf/28f071f8-8079-4671-a1ec-b47c8dd30917. Acesso em 27 de maio de 2024.

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

BUSTOS, C., *et al.* Advances in Cell Engineering of the *Komagataella phaffii* Platform for Recombinant Protein Production. **Metabolites**, v. 12, 2022.

BRUNO, L. M., *et al.* Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 604-607, 2020.

CALATAYUD, G. Á. Probióticos en pediatría. **Canarias Pediátrica**, v. 45, n. 2, p. 176-183, 2021.

CAMARGO, S.; HUTH, A. O uso de probióticos no tratamento de pacientes oncológicos imunossuprimidos. In: **Congresso Internacional em Saúde**, n. 2009, p. 1–13, 2021.

CAMPOS, E., *et al.* Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 2005-2021, 2013.

CAPECE, A., *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 22-30, 2018.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2020.

CHAIKHAM, P. *et al.* Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.9, p.2229-2238, 2012.

CHAMPAGNE, C. P., *et al.* Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 160-166, 2018.

CLARKE, G., *et al.* Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome - focus on lactic acid bacteria. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 35, n. 4, p. 403-413, 2012.

COSTA, A. M. M. *et al.* Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. **Food Chemistry**, v. 168, p. 157–166, 2015.

CUNHA JÚNIOR, P. C., *et al.* Symbiotic drink based on Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K): production, characterization, probiotic viability and sensory acceptance. **Ciência Rural**, v.51, n. 2, 2021.

CRYAN, J.F., BOEHME, M., DINAN, T.G. Is the fountain of youth in the gut microbiome? **J. Physiol**, p. 2323–2324, 2019.

DAS, N.; RAGAVAN, M. L.; MANDAL, S. K. Recent advances on efficacy of probiotic yeasts in human welfare: an overview. **JMBFS – Journal Microbiol Biotech Food Sciences**, v. 12, n. 3, 2022.

DAVIS, M.; WALKER, G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 269, p. 110-127, 2018.

DIANAWATI, D., *et al.* Sobrevivência de bactérias probióticas microencapsuladas após processamento e durante armazenamento: uma revisão. **Revisões Críticas em Ciência Alimentar e Nutrição**, v. 56, p. 1685–1716, 2016.

DUONGTHINGOC, D., *et al.* Studies on the viability of *Saccharomyces boulardii* within microcapsules in relation to the thermomechanical properties of whey protein. **Food Hydrocolloids**, v. 42, n. 2, p.232-238, 2013.

ECKBURG, P.B., *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, p. 1635–1638, 2005.

FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v.19, p. 55–71, 2021.

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization / World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002.

FARMER, A. D.; AZIZ, Q. Mechanisms and management of functional abdominal pain. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.107, p. 347–354, 2014.

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

FAYED, B. *et al.* The application of multi-particulate microcapsule containing probiotic bacteria and inulin nanoparticles in enhancing the probiotic survivability in yoghurt. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* The application of multi-particulate microcapsule containing probiotic bacteria and inulin nanoparticles in enhancing the probiotic survivability in yoghurt. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 2019.

FERNANDES, R. V. de B., *et al.* Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 133–142, 2016.

FERNANDEZ-PACHECO, P., *et al.* Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. **LWT – Food Science and Technology**, v. 97, p. 332-340, 2018.

FERREIRA, J. V.; LIMA, F. C.; FORTES, R. Costa. Aspectos clínicos da suplementação de probióticos em pacientes oncológicos: Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 115718–115738, 2021.

FLINT, H. J., *et al.* The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nature Reviews Gastroenterology Hepatology**, v. 9, p. 577–589, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [s. l.], p. 1–11, 2002. Disponível em: <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>. Acesso em: 07 de junho de 2024.

FRAKOLAKI, G. *et al.* A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.61, n.9, p.1515-1536, 2021.

FRANÇA, R. C., *et al.* *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 7953–7961, 2015.

FREITAS, J. B., *et al.* Sementes e nozes comestíveis cultivadas no Brasil como fontes de proteína para nutrição humana. **Ciências Alimentares e Nutricionais**, v. 3, p. 857-862, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B., *et al.* Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 39-44, 2013.

GABOARDI, G. C., *et al.* Influence of *Pichia pastoris* X-33 produced in industrial residues on productive performance, egg quality, immunity, and intestinal morphometry in quails. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

GEBARA, C. *et al.* Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.51, p.872-878, 2013.

GERANPOUR, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Recent advances in the spray drying encapsulation of essential fatty acids and functional oils. **Trends in Food Science and Technology**, v. 102, p. 71-90, 2020.

GIBSON, D. G., SMITH, H. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. In **Methods in Molecular Biology**, v. 1309, p. 395-412, 2016.

GIL DE LOS SANTOS, D.; TURNES, C. G.; CONCEIÇÃO, F. R. Bioremediation of Parboiled Rice Effluent Supplemented with Biodiesel-Derived Glycerol Using *Pichia pastoris* X-33. **The Scientific World Journal**, 2012.

GHORBANI-CHOBOGHLO, H., *et al.* Effect of microencapsulation on *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* viability in the gastrointestinal tract and level of some blood biochemical factors in *wistar* rats. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 160-165, 2019.

GIL DE LOS SANTOS, D., *et al.* Probiotic effect of *Pichia pastoris* X-33 produced in parboiled rice effluent and YPD medium on broiler chickens. **Plos One**, v. 13 ,2018.

GIL DE LOS SANTOS, J. R., *et al.* Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 448-451 ,2012.

GOMES, M. H. G; KUROZAWA, L. E. Melhoria das propriedades funcionais e antioxidantes da proteína do arroz por hidrólise enzimática para microencapsulação de óleo de linhaça. **J. Eng. de Alimentos**, v. 267, 2020.

GOMES, F.; SANTOS, L. C.; WELTER, Á. MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL POR PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA DEPRESSÃO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Singular. Saúde e Biológicas**, v. 1, n. 1, 2020.

GONSALVES, J. K. M. da C., *et al.* Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, [S.l.], v.5, n.11, 2009.

GUILLOT, C. C. Microbiota intestinal y trastornos del comportamiento mental. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 92, n. 2, p. 1–15, 2020.

GUILLIERMOND, A. *Zygosaccharomyces pastori*, nova espécie de levedura com cópula heterogâmica. **Touro. Soc. Mycol**, v. 36, p. 203–211, 1920.

GUYOT, S., *et al.* Surviving the heat: heterogeneity of response in *Saccharomyces cerevisiae* provides insight into thermal damage to the membrane. **Environmental Microbiology**, v. 17, ed. 8, p. 2982–2992, 2015.

HAMILTON, S. R., *et a.* *Pichia pastoris* as a Host for the Production of Recombinant Proteins: Overview and Perspectives. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 265-277, 2003.

HE, H., *et al.* A Combinational Strategy for Effective Heterologous Production of Functional Human Lysozyme in *Pichia pastoris*. *Front. Bioeng. Biotechnol*, v. 8, p. 1–12, 2020.

HEISTINGER, *et al.* Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. **Microbiology**, v. 166, p. 614–616, 2020.

HENRÍQUEZ, *et al.* Whole cell biosynthetic activity of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) GS115 strains engineered with transgenes encoding *Chromobacterium violaceum* ω -transaminase alone or combined with native transketolase. **Biotechnology Progress**, v. 36, n. 01, 2019.

HILL, C., *et al.* The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology e Hepatology**, v.11, p. 506-514, 2014.

HOU, K., *et al.* Microbiota in health and diseases. **Sig Transduct Target Ther**, v. 7, n. 135, 2022.

HSIUNG, R. T., *et al.* In vitro properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, p. 113-124, 2021.

HUANG, S., *et al.* Secagem por pulverização de probióticos e outras bactérias de qualidade alimentar: uma revisão. **Tendências em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 63, p. 1–17, 2017.

HUANG, X., *et al.* Production and Application of Biopesticides from *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, p. 13427-13435, 2021.

HUDSON, L. E., *et al.* Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. **PLoS One**, v. 11, 2016.

IÇIER, F. *et al.* Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, p.57-64, 2015.

ISOLAURI E., *et al.* Probiotics in the development and treatment of allergic disease. **Gastroenterology Clinics Of North America**, v. 41, n. 4, p. 747-762, 2012.

KAINZ, B., KARSTEN, K. Enzymes Produced by *Pichia pastoris* for Industrial Applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 46, p. 1229-1240, 2019.

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

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal Cellular Physiology**, v. 235, p. 5867–5881, 2020.

KIZERWETTER-ŸWIDA, M.; BINEK, M. Avaliação de propriedades potencialmente probióticas de cepas de *Lactobacillus* isoladas de galinhas. **Pol J Vet Sci**, v. 9, p. 15–20, 2016.

KHATRI, I., *et al.* Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-12, 2017.

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

KRUNIĆ, T.Ž.; OBRADOVIĆ, N.S.; RAKIN, M.B. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture. **Food Chemistry**, v.293, p.74-82, 2019.

KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probióticos na produção avícola. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1457–1465, 2014.

KUREK, M. A.; PRATAP-SINGH, A. Plant-Based (Hemp, Pea and Rice) Protein–Maltodextrin Combinations as Wall Material for Spray-Drying Microencapsulation of Hempseed (*Cannabis sativa*) Oil. **Foods**, v. 9, 2020.

KURTZMAN, C.P. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 36, p. 1435–1438, 2009.

LAI, G. C., *et al.* The mammalian mycobiome: a complex system in a dynamic relationship with the host. **WIREs Systems Biology and Medicine**, v. 11, 2019.

LAU, K., *et al.* Bridging the gap between gut microbial dysbiosis and cardiovascular diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 859, 2017.

LAUKENS, B., *et al.* Engineering the *Pichia pastoris* N-Glycosylation Pathway Using the GlycoSwitch Technology. **Glyco-Engineering**, v. 1321, 2015.

LAUKENS, B., *et al.* Off-target glycans encountered along the synthetic biology route toward humanized N-glycans in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, p. 2479-2488, 2020.

LEE, D. K., *et al.* Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, n. 2, p. 237-244, 2015.

LI, Y., *et al.* Construction of multilayer alginate hydrogel beads for oral delivery of probiotics cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 924-930, 2017.

LIU, H., *et al.* Abordagens protetoras e mecanismos de microencapsulação para a sobrevivência de bactérias probióticas durante o processamento, armazenamento e digestão gastrointestinal: uma revisão. **Revisões Críticas em Ciência Alimentar e Nutrição**, v. 59, p. 2863–2878, 2017.

LIU, W., *et al.* Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* for the Production of Valuable Metabolites. **Metabolic Engineering**, v. 48, p. 1-9, 2018.

LORENZO, J.M., *et al.* Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – a review. **Trends Food Sci Technol**, 2018.

MACAULEY-PATRICK, S., *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

MAHMOUD, M. *et al.* Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. **Heliyon**, v.6, n.3, p.1-14, 2020.

MAIA, P. L.; FIORIO, B. C.; SILVA, F. R. A influência da microbiota intestinal na prevenção do câncer de cólon. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 47, n. 1, p. 182–197, 2018.

MACCANI, A., *et al.* *Pichia pastoris* secretes recombinant proteins less efficiently than Chinese hamster ovary cells but allows higher space-time yields for less complex proteins. **Biotechnol. J.**, v. 9, 526–537, 2014.

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, 2017.

MARTÍN, J. M., *et al.* Microencapsulation of Bacteria : A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MAZIADE, P. J., *et al.* A decade of experience in primary prevention of clostridium difficile infection at a community hospital using the probiotic combination *Lactobacillus acidophilus* Cl1285, *Lactobacillus casei* Lbc80r, and *Lactobacillus rhamnosus* C1r2 (Bio-K+). **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, p. S144–S147, 2015.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, 2010.

MEIRA, S. M. M., *et al.* Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p.119–127, 2012.

MELO, T. A., *et al.* Levantamento e caracterização dos produtos probióticos disponíveis no mercado varejista da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 10, p. 1-3, 2016.

MILANI, C., *et al.* The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and Molecular*, v. 81, n. 4, 2017.

MILLER, L. E., *et al.* Contemporary meta-analysis of short-term probiotic consumption on gastrointestinal transit. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 5122, 2016.

MOHAMMADZADEH, R., *et al.* Practical Methods for Expression of Recombinant Protein in the *Pichia pastoris* System. **Current Protocols**, v. 1, 2021.

MONTEMURRO, M., *et al.* Plant-Based Alternatives to Yogurt: State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. *Foods*, v.10, p.1–21, 2021.

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

MORIKAWA, Y., *et al.* Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Virology**, v. 81, p. 9911–9921, 2007.

MOTA, S. M., *et al.* Enzymatic Treatments Using *Pichia pastoris*-Derived Enzymes in the Textile Industry. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v, 59, p. 10554-10564, 2020.

MURTAZA, M. A., *et al.* Survival of micro-organisms and organic acid profile of probiotic Cheddar cheese from buffalo milk during accelerated ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 562-571, 2017.

NAMI, Y., *et al.* Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YLstrain on cancer cells. **Anaerobe**, v. 28, p. 29-36, 2014.

NATARAJ, B.H., *et al.* Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p.168, 2020.

NAUMOV, G; NAUMOVA, E. S.; BOUNDY-MILLS, K. L. Descrição de *Komagataella mondaviorum* sp. nov., uma nova espécie irmã de *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1197-1207, 2018.

NESTERENKO, A., *et al.* Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**. v. 42, p. 469–479. 2013.

NESTERENKO, A., *et al.* The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 95-102, 2014.

NUNES, G. L., *et al.* Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 89, p. 128-133, 2018.

OKURO, Paula K. *et al.* Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v. 53, p. 9-102, 2013.

OUZZANI, M.; HAMMADY, H., FEDOROWICZ, Z., ELMAGARMID, A. RAYYAN – a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*, 2016.
<https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>.

OZKAN, G., *et al.* A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, v. 272, p. 494-506, 2019.

PADILHA, M. Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência in vivo. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, 2013.

PAGE, M.J., *et al.* A declaração PRISMA 2020: uma diretriz atualizada para relatar revisões sistemáticas. **BMJ**, 2021.

PAPADOPOULOU, O. S., *et al.* Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. **Food microbiology**, v. 74, p. 21-33, 2018.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science & Engineering: C**, v. 77, p. 1327-1340, 2017.

PEÑA, D.A., *et al.* Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab. Eng.*, v. 50, p. 2–15, 2018.

PERRICONE, M., *et al.* Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. **Beverages** 2015, v.1, p. 95-103, 2015.

PINTO, S. S. *et al.* Potencial uso de concentrado de soro de leite e prebióticos como agentes carreadores para proteger *Bifidobacterium-BB-12* microencapsulado por spray dryer. **Food Research International**, v. 67, p. 400-408, 2015.

PINTO, V. B. *et al.* Performance of jundiá larvae, *Rhamdia quelen*, fed on probiotic supplemented diets. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 37, n. 3, p. 215-220, 2015.

PREMI, M.; SHARMA, H. K. Efeito de diferentes combinações de maltodextrina, goma arábica e concentrado de proteína de soro de leite no comportamento de encapsulamento e estabilidade oxidativa do óleo de coxinha seca por spray (*Moringa oleifera*). **Internacional J. Biol. Macromol**, v. 105, p. 1232–1240, 2017.

QUIGLEY, E. M. M.; GAJULA, P. Recent advances in modulating the microbiome. **F1000 Research**, v. 9, n. 46, 2020.

RAGAVAN, M. L.; DAS, N. Isolamento e caracterização de potenciais leveduras probióticas de diferentes fontes. **J Pharm Clin Res**, v. 10, p. 451-455, 2017.

RANADHEERA, C. S., *et al.* Non-bovine milk products as emerging probiotics carriers: recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109-114, 2018.

RASCHMANOVÁ, H., *et al.* Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 4397-44144, 2021.

RIBEIRO, M. F., *et al.* Application of *Pichia pastoris* in Wastewater Treatment and Biotransformations. **Bioresource Technology**, 274, 220-229, 2019.

RINNINELLA, E., *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, v. 7, n. 14, 2019.

RODRIGUES, F. J., *et al.* Células probióticas encapsuladas: técnicas relevantes, fontes naturais como materiais encapsulantes e aplicações em alimentos – Uma revisão narrativa. **Food Research International**, v.137, 2020.

ROSOLEN, M. D., *et al.* Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. **LWT – Food Science and Technology**, v.115, p.108411, 2019.

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

SAAD, N., *et al.* An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2013.

SAAVEDRA, J. Porras, *et al.* Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 152, p.105–112, 2015.

- SABER, A., *et al.* Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. **Crit Rev Microbiol**, v. 43, p. 96-115, 2017.
- SAMBRANI, R., *et al.* Recent advances in the application of probiotic yeasts, particularly *Saccharomyces*, as an adjuvant therapy in the management of cancer with focus on colorectal cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 951-960, 2021.
- SAIFULLAH, M., *et al.* Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 866, p. 230-251, 2019.
- SAVOLDI, T. E., *et al.* Microencapsulation of *Saccharomyces boulardii* using vegan and vegetarian wall materials. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2022.
- SAMBRANI, R., *et al.* Recent advances in the application of probiotic yeasts, particularly *Saccharomyces*, as an adjuvant therapy in the management of cancer with focus on colorectal cancer. **Molecular Bio Rep**, v. 48, p. 951-960, 2021.
- SANTOS, D. X. dos, *et al.* Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. **Food Science and Technology**, v. 99, p. 404-410, 2019.
- SANTOS MORAES, M., *et al.* Efeitos funcionais dos probióticos com ênfase na atuação do kefir no tratamento da disbiose intestinal. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v.14, p. 144-156, 2018.
- SANTOS, P. P., *et al.* Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, p. 23-33, 2016.
- SANTOS, R. C. S dos., *et al.* Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por atomização. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, p. 759–767, 2015.
- SANTOS, R. O., *et al.* Prebiotic flours in dairy food processing: technological and sensory implications. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 1-10, 2018.
- SANTOS, J. A. S. dos. Efeitos dos probióticos no sistema imunológico de indivíduos com colite ulcerativa: uma revisão bibliográfica. 2022.
- SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344–371, 2017.
- SHARMA, S., *et al.* Efficacy of free and encapsulated natural antioxidants in oxidative stability of edible oil: Special emphasis on nanoemulsion-based encapsulation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 91, p. 305-318, 2019.

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

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

SHORI, A.B. Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. **HAYATI Journal of Biosciences**, v.24, n.1, p.1-5, 2017.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 65, p. 49-67, 2017.

SIBIRNY, A. A., TROPSHA, E. V. Applications of *Pichia pastoris* in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 34, p. 733-742, 2016.

SILVA JÚNIOR, E. L. da; GONZALEZ, L. F. C. A importância dos probióticos para o sistema imunológico. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, 2022.

SILVA, T.M., *et al.* Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v.37, n.5, p.49-55, 2015.

SOUZA SIMÕES, L. de, *et al.* Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 23-45, 2017.

SUNDARARAMAN, A. *et al.* Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 19, p. 8089–8104, 2020.

SUVARNA, S., *et al.* Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, p. 745 – 753, 2018.

TENGELER, A. C; KOZICZ, T.; KILIAAN, A. J. Relationship between diet, the gut microbiota, and brain function. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 8, p.603-617, 2018.

TOMAR, O. The effects of probiotic cultures on the organic acid content, texture profile and sensory attributes of Tulum cheese. *International Journal of Dairy Technology*, v. 72, p. 218-228, 2019.

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

VALLDEPERAS, M., *et al.* Enzyme encapsulation in nanostructured self assembled structures: Toward biofunctional supramolecular assemblies. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 44, p. 130-142, 2019.

VAN HERPE, D., *et al.* OPENPichia: building a free-to-operate *Komagataella phaffii* protein expression toolkit. **bioRxiv**, 2022.

VANDENPLAS, Y., *et al.* Probióticos: uma atualização. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 6-21, 2015.

VANISKI, R.; CORTI, D.; DRUNKLER, D.A. Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**, v.8, n.1, p.156 -184, 2017.

VIANA, C. C. R., *et al.* Microencapsulamento de bactérias probióticas: uma breve revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 13, 2021.

YAMADA, Y., *et al.* The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 439–444, 1995.

YANG, B., *et al.* Effects of regulating intestinal microbiota on anxiety symptoms: A systematic review. **General Psychiatry**, v. 32, n. 2, p. 1–9, 2019.

YAO, M. *et al.* Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.19, n.2, p.857-874, 2020.

ZAHRL, R. J. *et al.* Biotecnologia de sistemas para produção de proteínas em *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 17, 2017.

ZMORA, N., *et al.* Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. **Cell**, v. 174, n. 6, p. 1388-1405, 2018.

ŻOLKIEWICZ, J., *et al.* Postbiotics-a step beyond pre-and probiotics. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 1–17, 2020.

ZHU, T., *et al.* *Pichia pastoris* as a Versatile Cell Factory for the Production of Industrial Enzymes and Chemicals: Current Status and Future Perspectives. **Biotechnol. J.**, v. 14, e1800694, 2019.

ZHU, M., XIE, D. Biocombustíveis e Bioenergia: Produção e Aplicações com *Pichia pastoris*. **Renewable Energy**, v. 153, p. 1293-1305, 2020.

WEIS, Roland. High-Throughput Screening and Selection of *Pichia pastoris* Strains. **Recombinant Protein Production in Yeast**, v. 1923, 2019.

WENDLING, L.K; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados: uma revisão. **Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49 – 57, 2013.

WEN, P., *et al.* Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 70, p. 56-68, 2017.

WONG, C. T., *et al.* *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*): A Review of Recombinant Protein Expression and Production. **Biotechnology Reports**, v. 21, 201