

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Avaliação da interação entre leveduras isoladas de kombucha e
bactérias probióticas**

Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

**Avaliação da interação entre leveduras isoladas de kombucha e
bactérias probióticas**

Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan

São Paulo

2022



Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 9133 - 11430780 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Dissertação do(a) Senhor(a) Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira no Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 20 dias do mês de junho de 2022, no(a) realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Avaliação da interação entre leveduras isoladas de kombucha e bactérias probióticas"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Cristina Stewart Bittencourt Bogsan	Presidente	FCF - USP	Não Votante
Ana Lucia Barreto Penna	Titular	UNESP - Externo	<u>Aprovado</u>
Susana Marta Isay Saad	Titular	FCF - USP	<u>Aprovado</u>
Svetoslav Dimitrov Todorov	Titular	Externo	<u>Aprovado</u>

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Cleonice Estrela Cabral Goncalves _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 20 dias do mês de junho de 2022.

p/

Ana Lucia Barreto Penna

p/

Susana Marta Isay Saad

p/

Svetoslav Dimitrov Todorov

Cristina Stewart Bittencourt Bogsan
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em _____, e, portanto, o(a) aluno(a) _____ jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área de concentração: Tecnologia de Alimentos.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O48a Oliveira, Ícaro Alves Cavalcante Leite de
Avaliação da interação entre leveduras isoladas de kombucha e bactérias probióticas / Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira. - São Paulo, 2022.
94 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt

1. Probióticos. 2. Microbiologia. 3. Farmácia. 4. Tecnologia de Alimentos. 5. Alimentos Fermentados.
I. T. II. Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt, orientador.

Dedico este trabalho aos meus colegas cientistas do Brasil, por moverem montanhas com tão poucos recursos e por fazerem com amor aquilo que poucos compreendem o valor.

Agradecimentos

- Agradeço aos meus pais, **Miltomar** e **Bernadete**, ao meu irmão **Igor** e à minha família por possibilitarem que eu chegasse até aqui.
- Agradeço à Universidade de São Paulo e a todos seus funcionários, pois sem vocês esta instituição não funcionaria. Agradeço a todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP.
- Quero agradecer à CAPES pelo auxílio financeiro, pois sem bolsa eu não teria condição de fazer o mestrado na USP. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001
- Um sentimento de gratidão especial à minha orientadora **Cris**, pois ela acreditou no meu potencial desde o início, desde a nossa primeira entrevista por vídeo chamada, onde eu tremia de ansiedade e nervosismo. Sou muito grato pela pessoa incrível que você é! Tive uma sorte muito muito muito grande em ter você como orientadora, pois sei que jamais encontraria outra pessoa tão humana, empática e amiga, que possibilitou essa família que é o Bogsan's Lab.
- Quero agradecer também a uma amiga especial que fiz em São Paulo durante minha estadia por lá. Um agradecimento especial à **Roberta**, quem me acolheu como um irmão e que à ela sou extremamente grato. Os dias no laboratório eram sempre mais leves quando você estava lá e de fato vou levar você no coração para onde eu for, pois você é uma pessoa única e muito especial para mim.
- Gratidão por todos do Bogsan's Lab, principalmente **Daniel** e **Rayane**. Foram tantos os problemas que passamos e tantos planos frustrados. Felizmente tive vocês para ouvir eu reclamando das frustrações e do isolamento na pandemia. Apesar do pouco tempo que passamos juntos, vocês são muito especiais pra mim. Quero agradecer também à **Geovana**, **Karine**, **Mari**, **Kayque** e **Vic**. Sinto muita falta das resenhas no laboratório e na universidade. Um agradecimento especial à **Regina**, que pra mim é um verdadeiro exemplo de ser humano. Levarei pra sempre no coração as vivências e experiências que tivemos juntos.
- Quero agradecer à **Paulo** e **Bruna**, estando juntos desde a graduação, em 2014! Gratidão pelo tanto de tempo de atenção que me deram pra me ouvir reclamar dos problemas da vida e também por me ouvir falar de Genshin.
- **Ridel**, meu namorado, o que falar, né? O tanto que eu tenho a agradecer a você, não teria espaço o suficiente pra escrever aqui. Estamos juntos já há 6 anos e nesse tempo passamos por muita coisa. Você me acolheu quando eu precisei de abrigo, você me ouve

quando preciso desabafar e me entende quando nem eu sei o que tá acontecendo. Nos tornamos melhores amigos e parece que nada deste sentimento mudou ao longo do tempo. Escrevo este agradecimento com os olhos marejados quando penso que passamos tantas dificuldades durante essa pandemia e durante o tempo que ficamos distantes. Todas as noites que passamos apenas conversando por vídeo chamada, pedindo comidas iguais fingindo que estávamos juntos comendo a mesma coisa, e assistindo os mesmos filmes e séries, só faltando a presença física um do outro. Felizmente eu tenho você na minha vida. Sou grato também por ter sequestrado da rua o **Gandalf, The Grey**, nosso gato, que me aturou em casa por meses a fio durante a pandemia. De certo modo, creio que isso faz de nós uma família e eu amo muito você por tudo isso.

- Quero agradecer também à todos os amigos que fiz e que participaram da minha vida em São Paulo de alguma forma. **Zukas, Lucas, Guilherme, Vitor, Jean**, todo o pessoal do **GNG** que me fizeram companhia virtual em muuuuuuuuuitos momentos quando a gente não podia ver ninguém pessoalmente.
- Um agradecimento super especial à **Fernando e Leo**, os cabeças da Cia dos Fermentados e Escola Fermentare. É um dos projetos mais lindos que eu conheço. Empoderamento alimentar, manifestação política contra todo o espectro de fatores da alimentação contemporânea. Eles são uma verdadeira inspiração e eu digo e repito que sou muito fanboy!
- Um agradecimento aos professores **Jorge Luiz Mello Sampaio e Eduardo Jorge Pilau** pelas parcerias de experimentos. Não se faz ciência sem ajuda e sem parceria, ainda mais no Brasil.
- Essa pandemia realmente não foi fácil para ninguém, já são 2 anos, dos quais passei muitos meses quase que completamente isolado, e sem estas pessoas eu tenho certeza que teria entrado em colapso em vários momentos. Minha gratidão plena a vocês e a tantas outras pessoas que não lembrei de escrever. Termino aqui aos prantos, pois foram momentos de dificuldade mas também de grandes alegrias. Deixo o mestrado com uma bagagem de experiência, aprendizados, conhecimento e também de incríveis momentos e memórias. Gratidão por tudo!

A Inteligência me mostra caminhos, a Experiência me ensina, a Disciplina me educa, mas só a Vontade me faz caminhar.

Resumo

OLIVEIRA, Í. A. C. L. **Avaliação da interação entre leveduras isoladas de kombucha e bactérias probióticas**. 2022. 94f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2022.

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de produtos probióticos é entender como os microrganismos interagem entre si e com o hospedeiro. Quando falamos em alimentos fermentados tradicionais, este obstáculo aumenta porque a matriz alimentar já possui um microbioma intrínseco. No entanto, também é conhecido que muitos microrganismos podem interagir e cooperar para sobreviver quando condições de estresse são encontradas. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras de quatro diferentes kombuchas em distintos momentos fermentativos e verificar a influência que leveduras isoladas de kombucha têm na manutenção da viabilidade da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em condições de aerobiose. *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia membranifaciens* foram leveduras encontradas nas kombuchas, das quais as duas últimas favoreceram a manutenção da alta viabilidade de HN019 em cocultura por 14 dias. Observou-se a viabilidade da bactéria acima de 9 log ao longo de todo o experimento, o que não foi observado em monocultura. Ademais, utilizou-se de análise de autoagregação, hidrofobicidade, atividade enzimática de proteases e fosfolipases das leveduras para analisar seu potencial patogênico. Observou-se que *R. mucilaginosa* demonstrou características semelhantes à *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii*, e sua interação benéfica com HN019 reforça a possibilidade de que esta levedura seja uma chave para a inserção da bactéria em uma kombucha probiótica. Análises metabólicas foram realizadas e encontrou-se uma vasta diversidade de dipeptídeos, principalmente os compostos de prolina, durante a cocultura da bactéria com as leveduras. Tais dipeptídeos apresentam importantes mecanismos de ação no controle biológico e *quorum sensing* de bactérias e leveduras, e supostamente regulam a manutenção das relações mutualísticas entre ambos microrganismos.

Palavras-chave: microbioma, microbiota, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, *Rhodotorula*, alimentos fermentados, dipeptídeos

Abstract

OLIVEIRA, Í. A. C. L. **Evaluation of the interaction between isolated kombucha yeasts and probiotic bacteria.** 2022. 94f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2022.

One of the biggest challenges in the development of probiotic products is to understand how microorganisms interact with each other and with the host. When we talk about traditional fermented foods, this obstacle increases because the food matrix already has an intrinsic microbiome. However, it is also known that many microorganisms can interact and cooperate to survive when stressful situations are encountered. Thus, the objective of this work was to isolate yeasts from four different kombuchas at different fermentation times and to verify the influence that yeasts isolated from kombucha have on maintaining the viability of the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 under aerobic conditions. *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia membranifaciens* were yeasts found in kombuchas, of which the last two favored the maintenance of HN019 high viability in co-culture for 14 days. Bacteria viability above 9 log was observed throughout the experiment, which was not observed in monoculture. In addition, analysis of autoaggregation, hydrophobicity, enzyme activity of proteases and phospholipases of yeasts was used to analyze their pathogenic potential. It was observed that *R. mucilaginosa* demonstrated characteristics similar to *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii*, and its beneficial interaction with HN019 reinforces the possibility that this yeast is a key to the insertion of the bacterium in a probiotic kombucha. Metabolic analysis were performed and a wide diversity of dipeptides, mainly proline-based, was found during the co-culture of the bacteria with the yeasts. Such dipeptides have important mechanisms of action in the biological control and quorum sensing of bacteria and yeast, and supposedly regulate the maintenance of mutualistic relationships between both microorganisms.

Keywords: microbiome, microbiota, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, *Rhodotorula*, fermented foods, dipeptides

Lista de ilustrações

Figura 1 – Processo de domesticação de leveduras (por exemplo, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) de acordo com a intensidade dos processos de backslopping e principais efeitos observados relacionados à sobrevivência, reprodução, consumo de açúcares e metabólitos formados.	20
Figura 2 – Chá adoçado (seta azul) e um SCOBY (seta vermelha) (A); Kombuchas em fermentação com SCOBYS (seta vermelha) (B).	26
Figura 3 – Variedade de fungos em uma das placas onde as amostras de kombucha foram inoculadas. É possível observar colônias de diferentes cores e aspectos macroscópicos.	27
Figura 4 – Alguns dos isolados de leveduras separados por semelhança morfológica das colônias. Microrganismos isolados em diferentes tempos de fermentação de uma das kombuchas comerciais. Observam-se colônias de diferentes cores.	28
Figura 5 – Variedade de leveduras isoladas de kombucha vistas em microscópio (400x). Observam-se leveduras de diferentes morfologias, (A e D) arredondadas, (C) ovaladas e (B) células mais alongadas. Observam-se vacúolos no interior das células, identificadas como pontos mais claros e brilhantes no interior das células.	29
Figura 6 – Leveduras vistas em microscópio óptico (400x) e coradas com azul de metileno. As células observadas em coloração azul são consideradas mortas.	30
Figura 7 – Isolados de leveduras: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A) e <i>Pichia membranifaciens</i> (B).	36
Figura 8 – Colônias de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 crescendo em meio RCA após interação com as leveduras <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A), <i>Pichia membranifaciens</i> (B), levedura isolada i3 (C) e sem a interação com leveduras (D).	38
Figura 9 – Concentração celular de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 ao longo do experimento de interação com as leveduras. A bactéria em monocultura foi utilizada como controle experimental.	39
Figura 10 – Concentração celular em células por mililitro das leveduras ao longo do experimento de interação com a cepa probiótica <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019.	40
Figura 11 – Autoagregação relativa das leveduras estudadas em 23°C e 37°C. <i>S. boulardii</i> foi utilizada como controle para este experimento. (*) Diferença estatística significativa entre as temperaturas; (#) diferença estatística significativa entre as espécies.	43

Figura 12 – Hidrofobicidade relativa de superfície das leveduras estudadas em 23°C e 37°C. <i>S. boulardii</i> foi utilizada como controle para este experimento. (*) Diferença estatística significativa entre as temperaturas; (#) diferença estatística significativa entre as espécies.	44
Figura 13 – Fotografias da atividade enzimática de fosfolipases de <i>Candida</i> ssp.. Observe em A, atividade de fosfolipase evidente, com a formação de halo de invasão no substrato (Pz = 0,470) e em B a colônia sem a presença de halo, não evidenciando a atividade enzimática de fosfolipase por este isolado (Pz = 1).	46
Figura 14 – Fotografias das <i>P. membranifaciens</i> (A) e <i>R. mucilaginoso</i> (B) durante experimento atividade enzimática de fosfolipases em 23°C. Observa-se o halo de precipitação formado por <i>P. membranifaciens</i> demonstrando uma atividade moderada (Pz = 0,640), enquanto <i>R. mucilaginoso</i> não apresenta o halo de precipitação (Pz = 1).	46
Figura 15 – Fotografias das placas de cultura dos testes de atividade enzimática de protease (A) e atividade enzimática de fosfolipase (B) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>boulardii</i> . CNCM I-745 utilizada como controle.	47
Figura 16 – Rede de interação molecular dos microrganismos estudados. As esferas indicam possíveis compostos encontrados por Q-TOF. As cores indicam em que grupos foram identificados tais compostos, sendo vermelho (HN019 + <i>P. membranifaciens</i>), verde (HN019 + <i>R. mucilaginoso</i>), azul (HN019 + i3) e laranja (HN019). Os números referem-se ao peso molecular de cada aduto.	50
Figura 17 – Estrutura molecular de compostos encontrados por análise da rede de interação molecular. Compostos listados na Tabela 7.	51
Figura 18 – Espectros de fragmentação de tirosina e isoleucina-glutamato.	54
Figura 19 – Espectros de fragmentação de histidina-prolina e fructosil-lisina.	55
Figura 20 – Espectro de fragmentação de ácido 1,2,3,4-tetrahidroharmane-3-carboxílico.	56
Figura 21 – Fotografia de colônias de microrganismos que surgiram no local do inóculo de <i>R. mucilaginoso</i> após esta não crescer no teste de atividade enzimática de protease. A área marcada refere-se à zona do inóculo de <i>R. mucilaginoso</i> no meio.	61
Figura 22 – Trabalho apresentado no “13º Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos” - “Homemade and Commercial Kombucha Fermentation: Differences and Similarities“.	76
Figura 23 – Palestra do Núcleo de Estudos em Fermentações da Universidade Federal de Lavras - “Kombucha: da cozinha para Indústria”.	77
Figura 24 – Palestra do Núcleo de Estudos em Fermentações da Universidade Federal de Lavras - “Kombucha: definição legal e registro de estabelecimento”.	78
Figura 25 – Palestra do Núcleo de Estudos em Fermentações da Universidade Federal de Lavras - “Desenvolvimento de novas bebidas probióticas”.	79

Figura 26 – Artigo publicado na revista <i>Fermentation</i> (IF: 3,975)	80
Figura 27 – Artigo publicado na revista <i>Current Geriatrics Reports</i> (IF: 1,17)	81
Figura 28 – Participação como Revisor Técnico do livro “Fermentação à Brasileira”. Editora: Melhoramentos, 2020.	82
Figura 29 – Participação do Webinar “ <i>Fermented Foods and Health: Dows Today’s Science Support Yersterday’s Tradition?</i> “.	83
Figura 30 – Participação do “ <i>International Workshop on Advances of Probiotics and Prebiotics</i> “.	84
Figura 31 – Apresentação de trabalho na “XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia”.	84
Figura 32 – Participação no “ <i>International Symposium - Fungi: From The Environment To The Host</i> “.	85
Figura 33 – Histórico escolar do mestrado - parte 1 de 2.	86
Figura 34 – Histórico escolar do mestrado - parte 2 de 2.	87
Figura 35 – Currículo Lattes - parte 1 de 6.	88
Figura 36 – Currículo Lattes - parte 2 de 6.	89
Figura 37 – Currículo Lattes - parte 3 de 6.	90
Figura 38 – Currículo Lattes - parte 4 de 6.	91
Figura 39 – Currículo Lattes - parte 5 de 6.	92
Figura 40 – Currículo Lattes - parte 6 de 6.	93

Lista de tabelas

Tabela 1 – Valores de referência para análise do potencial Pz e Prz dos experimentos de atividade enzimática.	33
Tabela 2 – Valores de referência para análise do crescimento das colônias durante os testes de atividade enzimática.	33
Tabela 3 – Amostras de kombucha e seus respectivos valores de pH nos dia 0 e 10 de fermentação	35
Tabela 4 – Espécies de leveduras isoladas e identificadas em cada kombucha.	36
Tabela 5 – Atividade enzimática de fosfolipases das leveduras estudadas.	48
Tabela 6 – Atividade enzimática de proteases das leveduras estudadas.	49
Tabela 7 – Compostos encontrados através de QTOF, após dinâmica de interação entre a bactéria e as leveduras. G1 (HN019 + <i>P. membranifaciens</i>), G2 (HN019 + <i>R. mucilaginoso</i>), G3 (HN019 + i3) e G4 (HN019).	52

Lista de abreviaturas e siglas

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
BGC	Biosynthetic Gene Clusters
BOD	Biologic Oxygen Demand
COVID-19	Corona Virus Disease 19
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EFSA	European Food Safety Authority
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight
MATH	Microbial Adhesion To Hydrocarbons
MRS	De Man, Rogosa & Sharpe
MYP	Mannitol egg Yolk Polymyxin agar
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
N°	Número
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PRR	Pattern Recognition Receptor
Q-TOF	Quadrupole - Time of Flight
RAC	Resposta Ambiental Central
RCA	Reinforced Clostridial Agar
RCM	Reinforced Clostridial Medium
REA	Resposta ao Estresse Ambiental
SA	Sabouraud Agar
SCOBY	Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast
pH	Potencial Hidrogeniônico

Sumário

1	Introdução	17
2	Revisão da Literatura	18
2.1	Leveduras	18
2.1.1	Alimentos fermentados e a domesticação das leveduras	19
2.2	Kombucha	21
2.3	Interações entre microrganismos	23
3	Objetivos	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	Materiais e Métodos	26
4.1	Aquisição e manutenção da kombucha	26
4.2	Isolamento das leveduras e identificação	26
4.3	Interação preliminar entre leveduras e <i>Bifidobacterium animalis subsplactis</i> HN019	28
4.4	Análise metabólica (Q-TOF)	30
4.5	Manutenção das viabilidades e concentrações celulares ao longo das interações	31
4.6	Teste de hidrofobicidade e autoagregação	31
4.6.1	Teste de hidrofobicidade relativa de superfície	31
4.6.2	Teste de autoagregação	32
4.7	Teste de atividade de proteases e fosfolipases	32
4.7.1	Teste de atividade enzimática de proteases	33
4.7.2	Teste de atividade enzimática de fosfolipases	33
4.8	Análises estatísticas	34
5	Resultados e Discussão	35
5.1	Isolamento e identificação das leveduras	35
5.2	Teste de interação entre leveduras e bactérias	36
5.2.1	Efeito das leveduras na sobrevivência da cepa probiótica.	38
5.3	Potencial probiótico e patogênico das leveduras	42
5.3.1	Autoagregação e Hidrofobicidade	42
5.3.2	Atividade de proteases e fosfolipases	45
5.4	Análise metabólica das interações	49
5.5	Potencial biotecnológico	56

6	Conclusões	62
7	Financiamento	63
	Referências	64
	ANEXOS	75
	ANEXO A – Atividades Complementares	76
	ANEXO B – Histórico Escolar	86
	ANEXO C – Currículo Lattes	88

1 Introdução

Pouco se sabe sobre interações ecológicas em ecossistemas microscópicos, dadas as limitações tecnológicas que dificultam ou inviabilizam a compreensão sobre os fenômenos de interação que ocorrem em tais ecossistemas [1]. A atenção sobre a complexidade das interações em comunidades microbianas tem ganhado forte visibilidade na comunidade científica, uma vez que temáticas como microbiota e microbioma têm se tornado importantes pontos a se considerar entre os fatores do desenvolvimento de patologias e manutenção da homeostase [2–4]. Dentre os potenciais biotecnológicos destes estudos, ressalta-se a utilização de probióticos para gerar alterações consideráveis em diversos aspectos fisiológicos, neurológicos e imunológicos de um organismo [5].

Convencionalmente, probiótico é definido como, um “organismo vivo que quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício ao hospedeiro” [6]. Dessarte, a utilização de linhagens isoladas ou formulações multicepas têm demonstrado forte impacto sobre diversas patologias e alterações fisiológicas como diabetes, obesidade, síndrome metabólica, doença de Crohn, entre outras [7–10]. Contudo, a maior parte das formulações utilizadas atualmente, consistem em produtos de cepa única que não refletem minimamente a real condição em um microambiente estável e favorável ao hospedeiro [5, 11]. Usualmente, estudos que retomam a utilização de formulações multicepa não visam compreender as interações entre os diferentes microrganismos e como estas interações contribuem nos mecanismos de ação dos probióticos. Ademais, estudos demonstram que a utilização de formulações multicepa onde existem interações simbióticas entre os microrganismos utilizados, apresentam maior eficácia de utilização [12], e este fato pode ser justificado por diversos fatores.

Comunidades biológicas estáveis são formadas quando os microrganismos em conjunto suprem as janelas metabólicas da rede, formando interações complexas de competição, mutualismo e simbiose [13]. Estas redes de interação possibilitam que os microrganismos subjuguem adversidades variegadas como estresse oxidativo ou ação de sais biliares [14], bem como podem possibilitar um aprimoramento nas capacidades probióticas de linhagens conhecidas [15, 16]. Dessarte, leveduras oriundas de kombucha encerram um alto potencial biotecnológico no desenvolvimento de probióticos mais eficazes e seguros, possibilitando sua utilização como um adjuvante no desenvolvimento de novos alimentos e formulações probióticas, tal como em alimentos que apresentam uma grande variedade de microrganismos, tanto quanto os alimentos fermentados tradicionais.

2 Revisão da Literatura

Estudos dispendiosos sobre a utilização de microrganismos com potencial uso terapêutico retomam o início do século XX [17]. Muito foi acrescentado ao *pool* de conhecimento disposto sobre probióticos, e atualmente, diversos efeitos e produtos com alegação probiótica são reportados [5]. Dentre os efeitos mais alegados sobre probióticos, ressalta-se aqueles voltados à manutenção do trânsito intestinal e recuperação da microbiota, mas diversos outros efeitos podem ser observados, desde a repercussão na modulação imune, metabolismo energético a atividade neurofisiológica [5, 12, 18]. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação dos mesmos ou como eles interagem com outros microrganismos, o que diminui a credibilidade sobre sua utilização e gera muitos vieses sobre suas condições de uso [11]. Os principais desafios no estudo sobre probióticos encontram-se no esclarecimento sobre suas interações com a microbiota do hospedeiro, uma vez que cada microbioma é teoricamente único, característico de cada indivíduo [13]. Este fator funciona como fulcro sobre as disposições onde os efeitos observados dos probióticos são contraditórios ou pouco elucidados, e justifica ensaios sobre redes de interação microbiana.

2.1 Leveduras

Leveduras são microrganismos eucariotos unicelulares pertencentes ao reino *Fungi*, apresentam um formato circular a oval e podem medir cerca de 4 μm a 10 μm de diâmetro. Sua reprodução ocorre sexuadamente ou assexuadamente por brotamento, no qual a célula filha cresce a partir de um ponto da parede celular da célula mãe, podendo ser liberada após finalizado seu crescimento, ou mantendo sua associação com a célula parental, o que pode resultar na formação de pseudo-hifas ou grumos [19]. Ainda, apresentam parede celular com cerca de 250 nm de espessura, sendo composta basicamente por quitina (β -(1,4) N-acetilglucosamina), mananas, manoproteínas e glucanas (β -(1,3) e/ou β -(1,6)) [19,20]. Algumas leveduras apresentam a capacidade de formação de micélio verdadeiro, comportando-se como um fungo filamentosos, assim como *Candida albicans* [21]. De fato, a capacidade de dimorfismo de algumas leveduras, reflete a presença de mecanismos evolutivos e conservados de adaptação ao meio em que se encontram, permitindo que diversas espécies possam sobreviver em diferentes condições ambientais [22].

Os mecanismos adaptativos presentes em leveduras abrangem diversas manobras moleculares e metabólicas que possibilitaram que estes microrganismos participassem intrinsecamente do desenvolvimento da humanidade como civilização. Profusas espécies de leveduras apresentam Respostas Ambientais Centrais (RAC) ou Resposta ao Estresse Ambiental (REA), que consistem na modulação e ativação de genes responsáveis por mecanismos de tolerância ao estresse [23]. Por consequência, pode-se observar a indução de poliploidia, multiplicação de grandes fragmentos em cromossomos, variação de *loci* em retrotransposons, como das famílias

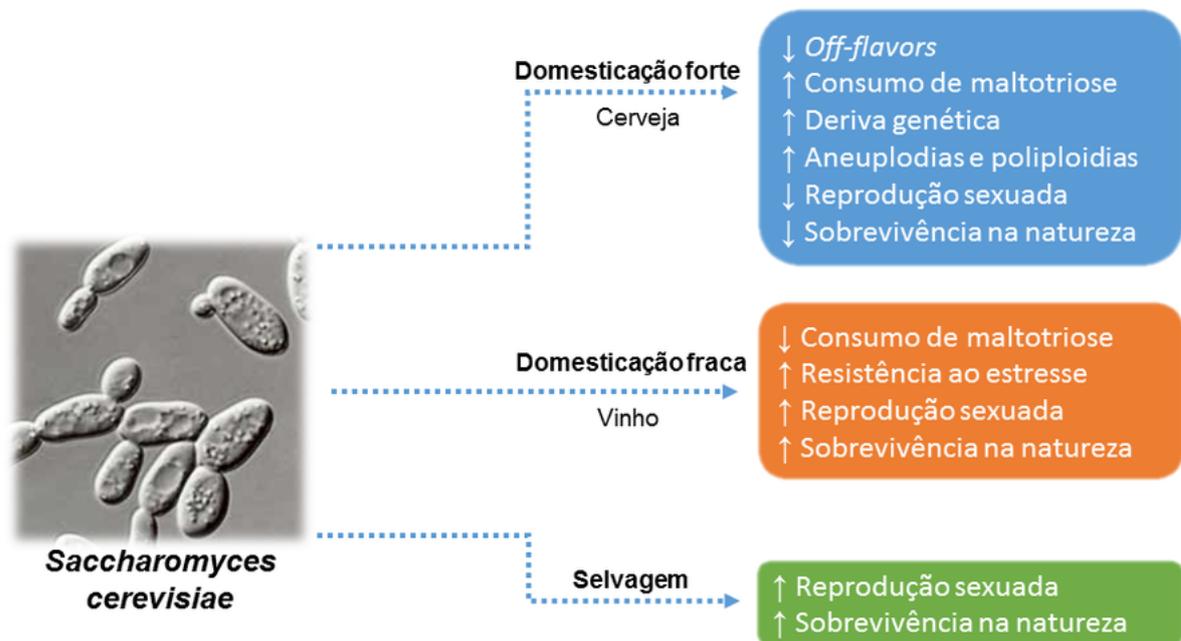
Ty(1-5), entre outros [24–26]. Tais mecanismos possibilitam grande versatilidade metabólica, permitindo que leveduras possam ser encontradas em ambientes de condições extremas (extremófilas e extremotolerantes), sendo tal característica enfatizada quando comparadas a outras células eucariotas [27].

2.1.1 Alimentos fermentados e a domesticação das leveduras

O processo de fermentação foi de grande importância para o início da civilização. Fermentar é uma das formas mais antigas de preservação de alimentos, e acredita-se que esta foi de suma importância no processo de mudança do comportamento nômade, caçador/coletor, de hominídeos pré-históricos, possibilitando seu assentamento e subsequente surgimento da agricultura na então denominada revolução neolítica [28, 29]. Admite-se que provavelmente o consumo de bebidas alcoólicas tenha impulsionado o desenvolvimento da agricultura e contribuído para o aprimoramento de técnicas de fermentação rudimentares [29]. De fato, observa-se que o consumo tradicional de alimentos e bebidas fermentadas ocorre em praticamente todo o mundo, e tais práticas milenares foram responsáveis por moldarem diferentes culturas. Assim, acredita-se que a fermentação participou intrinsecamente do desenvolvimento social, cultural e tecnológico da humanidade, influenciando diretamente nas interações fisiológicas que temos com microrganismos bem como no desenvolvimento e maturação de órgãos, tecidos, sentidos e mecanismos fisiológicos e bioquímicos em nossa constituição [30, 31].

Deveras, alimentos e bebidas fermentadas podem ser encontradas em quase todo o mundo e tais práticas estão relacionadas com os recursos locais. A Ásia, África e Europa são regiões onde se encontra a maior pluralidade destes produtos. O processo de conservação de alimentos através da fermentação se dá pela produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico ou acético [32, 33]. Bactérias lácticas são especialmente importantes para produção e preservação de diversos alimentos e bebidas fermentadas. Os metabólitos produzidos por tais microrganismos, como o ácido láctico e bacteriocinas, além de conferir propriedades sensoriais desejáveis, também reduzem o pH e atuam conferindo maior estabilidade microbiológica à matriz alimentar, podendo esta ser matriz láctea, grãos ou cárneos [32, 34]. Bactérias lácticas podem ser encontradas em alimentos a base de arroz como *Idli* (Índia) e *puto* (Filipinas), bem como alimentos a base de peixe e cereais como *sikhae* (Coreia) e *burong isda* (Filipinas), que são fermentados por *Leuconostoc* spp. [34]. Microrganismos produtores de ácido acético, como bactérias acéticas e algumas leveduras, também são de suma importância na produção de alimentos como vinagres, kombucha, cervejas lambic, kefir e conservas vegetais [35]. Entretanto, a produção de álcool na confecção de bebidas alcoólicas, restringe-se quase em sua totalidade às leveduras, e estas acompanham a humanidade de maneira tão intrínseca que se acredita que estas estão entre os primeiros organismos domesticados (figura 1) [36, 37].

Figura 1 – Processo de domesticação de leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) de acordo com a intensidade dos processos de *backslopping* e principais efeitos observados relacionados à sobrevivência, reprodução, consumo de açúcares e metabólitos formados.



Fonte: Oliveira & Freire, 2019.

Um fato que advém dos mecanismos de adaptação das leveduras é o processo de domesticação destas, principalmente quando relacionadas à alimentos e bebidas fermentadas. No decorrer das relações humanas com as leveduras fermentadoras, copiosas características puderam ser constatadas no desdobramento de populações domesticadas. Leveduras selvagens geralmente são diplóides, entretanto, cepas encontradas em alimentos e bebidas fermentadas e linhagens comerciais, usualmente apresentam poliploidia parcial ou aneuploidia, aproximando-se da tetraploidia, mas raramente observando-se a totalidade tetraploide ou diploide [37]. Este fenômeno se dá, pois, a poliploidização acelera os processos adaptativos por vias diretas e indiretas, aumentando a expressão de genes de resistência, não obstante, gerando instabilidade genômica, ou aumentando a propagação de genes valorizados em uma dada população [25]. A domesticação de leveduras é um fenômeno conhecido e refere-se aos processos de seleção artificial de linhagens selvagens visando a obtenção de produtos com caracteres almejados. O sistema de domesticação das leveduras em alimentos e bebidas fermentadas se dá basicamente por um processo denominado *backslopping*, que consiste na utilização de um produto fermentado como inóculo para uma fermentação seguinte [38]. Este método gera efeitos gargalo nas populações microbianas, favorecendo a seleção de linhagens resistentes ou melhores adaptadas ao processo de fabricação do produto em questão [38].

2.2 Kombucha

Alimentos e bebidas fermentadas tradicionais são um grupo importante de fermentados que fazem parte intrínseca de uma sociedade e remontam à cultura, dieta e estilo de vida de uma população [39]. A kombucha caracteriza-se como uma bebida fermentada tradicional, produzida através da fermentação de infusão de *Camellia sinensis* adoçada, com adição de um biofilme celulósico denominado SCOBY (Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras). O produto da fermentação consiste em uma bebida de *flavor* levemente acético podendo ou não ser carbonatada e saborizada com frutas, extratos, condimentos, entre outros [40]. A produção e consumo da bebida vem aumentando consideravelmente e muitas alegações terapêuticas são observadas, ainda que não comprovadas, como atividade antioxidante, antidiabetogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana e diversos efeitos imunomoduladores [41, 42]. Pouco se sabe sobre os factuais efeitos do consumo da kombucha, entretanto, estudos recentes demonstram que a matriz fermentativa desta bebida possa ser uma importante aliada no estudo de comunidades microbianas, uma vez que esta apresenta uma comunidade diversificada, porém, estável à longo prazo, com capacidade de regenerar sua biodiversidade original de forma semelhante ao encontrado em microbiotas humanas [43]. A literatura demonstra que kombuchas de diferentes origens apresentam uma grande variedade de microrganismos, contudo, dos gêneros de bactérias mais comumente encontrados, ressalta-se *Acetobacter*, *Bacterium*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter* entre as bactérias acéticas e *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterobacter*, *Collinsella* e *Weissella* como demais gêneros. Ademais, os gêneros de leveduras são ainda mais variados, apresentando indivíduos com perfis metabólicos bastante distintos e variados, como *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Kluyveromyces*, *Eremothecium*, *Starmera*, *Hanseniaspora*, *Merimbla*, *Sporopachydermia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Brettanomyces/Dekkera* [40, 41, 44–46].

A origem da kombucha ainda é questionável, mas acredita-se que seu consumo tenha iniciado na China por volta de 200 a.C., onde era denominado como “chá da imortalidade”, popularizando-se por outras partes do mundo através de rotas comerciais [47]. Apesar de se tratar de um consórcio multi-espécie, a kombucha foi classificada inicialmente pela nomenclatura botânica em 1913 como *Medusomyces gisevii* Lindau, dada a presença do biofilme celulósico (SCOBY) que se forma na interfase líquido/ar durante a fermentação, sobre o qual acreditava-se tratar de um organismo único [48]. A fermentação inicia-se pela adição do SCOBY no chá adoçado. Utiliza-se em média 50 g/L a 100 g/L de açúcar, em chá verde, preto ou ambos em diferentes proporções, ainda sendo aceito chá *oolong*, e no Brasil a instrução normativa N° 41, de 17 de setembro de 2019, permite o uso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) em sua composição [49]. O tempo e a temperatura de fermentação também é variável consoante as características sensoriais desejadas. Ademais, adiciona-se uma fração (5% a 20%) de uma fermentação concluída ao mosto virgem, visando acelerar a acidificação e aumentar a concentração de microrganismos presentes para assegurar sucessões ecológicas adequadas [50, 51]. Entende-se como sucessão

ecológica, o processo de maturação de um determinado ecossistema, no qual diferentes espécies passam a dominar e a transformar o meio até que um distúrbio altere a conformação das populações envolvidas [52]. Tratando-se de alimentos fermentados tradicionais, este processo possui suma importância em seu desenvolvimento, influenciando diretamente na qualidade sensorial do produto [53]. Variáveis, como tipo de chá, concentração de açúcar, pH, tempo e temperatura de fermentação e a origem do SCOBY, podem influenciar nas características do produto final [54]. A variação de temperatura pode influenciar diretamente na produção de ácidos orgânicos, dos quais o ácido acético torna-se o mais perceptível, contudo, ácido glucônico, glucurônico e lático também se fazem presentes [51]. As variações de temperatura ao longo do processo fermentativo são capazes de favorecer diferentes espécies no decorrer do processo de sucessão microbiana, fator que gera variação na produção de ácidos orgânicos secundários como ácido glucônico e glucurônico [55]. Ainda, discorre-se que kombuchas apresentam perfil de tamponamento durante a produção, o que é demonstrado ser um fator característico do processo de fermentação desta bebida [56]. Este evento pode ser relacionado à alguns fatores, como o acúmulo de ácido carbônico resultante do aumento de dióxido de carbono dissolvido no meio, ou perfil adaptativo dos microrganismos presentes no líquido e no biofilme celulósico [41,45]. Além disso, a formação da película de celulose na intersecção de contato ar-líquido pode gerar o aprisionamento de gases e compostos voláteis na fase líquida da kombucha, contudo, este fenômeno requer mais estudos.

A relação de simbiose entre as leveduras e as bactérias da kombucha é sutilmente orquestrada pela capacidade das leveduras em quebrar sacarose do meio e produzir álcool. Inicialmente, as leveduras secretam invertases, possibilitando a quebra de sacarose em glicose e frutose, as quais serão utilizadas por estas e por outros microrganismos presentes, como as bactérias acéticas. No que lhe concerne, estas participarão do processo de oxidação do etanol para produção de ácido acético, bem como transformarão parte da glicose e frutose consumida em celulose, para a formação de um novo SCOBY [43]. Destarte, o processo de fermentação da kombucha se dá em diferentes segmentos cronológicos, que remontam diferentes condições ecológicas. Inicialmente, observa-se a prevalência de microrganismos osmotolerantes, uma vez que o meio pode atingir mais que 10° Brix. Ao passo que os açúcares são consumidos, observa-se um leve aumento gradual da concentração de etanol, concomitante ao aumento de ácidos orgânicos. Os microrganismos presentes e seus metabólitos podem contribuir para a ativação de fatores genéticos ou não genéticos nos demais microrganismos presentes, sendo um destes, o mais relevante em alimentos e bebidas fermentadas, a produção de ácidos orgânicos [57]. Inicialmente, o meio de fermentação rico em sacarose, apresenta quantidade considerável de oxigênio que diminui conforme o tempo de fermentação [58]. A baixa de oxigênio no meio, assim como o aumento na concentração de ácido carbônico, pode balizar a atividade das bactérias acéticas, cingindo-as ao nicho da superfície de contato líquido-ar, ainda que algumas bactérias acéticas possam apresentar motilidade no meio líquido [58]. Conforme a continuidade do processo, em um último momento, observa-se redução da concentração alcoólica, uma vez que o etanol passa a ser oxidado para síntese de ácido acético. Nesta conformação, o microecossistema

é dominado por microrganismos tolerantes à acidez e ao baixo pH, que pode atingir valores menores que 3,0 [43, 51]. Dessarte, outros mecanismos de interação mais complexos podem ser observados, e resultam na produção de diversas moléculas como compostos fenólicos derivados de tearrubiginas, catequinas, vitaminas, compostos fenólicos derivados de isoflavonas, quercetina, verbascósidos, diversos peptídeos, bacteriocinas, entre outros [59, 60].

2.3 Interações entre microrganismos

Naturalmente, sob circunstâncias ambientais silvestres, microrganismos de diferentes espécies interagem e transformam o meio através de ações químicas e enzimáticas. A ação dos microrganismos é de suma importância para o desenvolvimento ecológico e para a biodiversidade de um determinado ambiente, realizando a transformação de nutrientes no processo de sucessão ecológica [61]. Um melhor entendimento sobre a rede de interações microbianas de um microbioma complexo é essencial para o estudo de probióticos, bem como para o entendimento das dinâmicas microbianas na produção de alimentos fermentados tradicionais, uma vez que as redes de interação são responsáveis pela manutenção da versatilidade e robustez das populações envolvidas, onde todos os microrganismos contribuem para a suplementação das janelas metabólicas de seus propínquos [62]. Contudo, quando se estuda tais redes de interações, metabólomas ou demais ciências ômicas em comunidades microbiológicas, acaba-se por cair no dilema de cobertura *versus* precisão de análise [1]. Dessarte, alimentos fermentados tradicionais podem ser um importante modelo de estudo em comunidades microbianas, singularmente a kombucha [43]. É sabido que, a interação entre diferentes espécies pode gerar condicionamentos benéficos para o desenvolvimento de ambas, e em sistemas microbianos complexos, como alimentos fermentados tradicionais, o consórcio microbiano coopera aumentando a versatilidade e robustez das populações envolvidas. Os microrganismos comunicam-se através de sinais bioquímicos diversos e cada indivíduo retorque de maneira adequada. Dessarte, um importante fator que pode ser determinante na qualidade final de um produto fermentado é a homogeneidade do inóculo, que no caso de um sistema em *backslopping*, consiste em uma fração de um produto com fermentação previamente concluída. Essa propriedade é de suma importância para assegurar os eventos de sucessão biológica adequados, uma vez que o fenômeno do efeito de prioridade pode ser observado [62, 63]. O efeito de prioridade refere-se às mudanças, orquestradas e ordenadas, causadas por organismos em um determinado ambiente, que influenciam negativamente ou positivamente a sobrevivência dos organismos que apresentam-se em subsequência no processo de sucessão biológica [62, 64].

Estudos sobre a interação entre bactérias e leveduras demonstram que estes microrganismos podem beneficiar-se em relações simbióticas ou mutualísticas, uma vez que estes apresentam perfis metabólicos consideravelmente distintos, sendo procariotos e eucariotos, respectivamente [14, 65]. Estas interações são comuns e encontradas em diversos alimentos além da kombucha, como kefir, chucrute, chocolate (fermentação do cacau) e vinho, sendo essenciais

para a manutenção do ecossistema microbiano e podem ser exploradas para beneficiar linhagens probióticas de interesse [32,66]. Dentre os trabalhos que demonstram a importância da utilização de leveduras sobre o potencial probiótico de bactérias bem como sua manutenção em condições hostis, resalta-se Vorob'eva e colaboradores, que explana sobre a resistência promovida por leveduras às bactérias contra ação de sais biliares [14]. Zoumpourtikoudi e colaboradores, que aferem o aprimoramento de linhagens probióticas promovido por leveduras [16]. Ainda Yeo e colaboradores demonstra que a levedura *Williopsis saturnus* subsp. *saturnus* NCYC22 possui a capacidade e aprimorar a manutenção da viabilidade de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium*, incluindo a HN019 [67]. Alguns fatores são importantes na determinação do potencial probiótico de determinada linhagem de microrganismo, como a autoagregação, hidrofobicidade, capacidade de formação de biofilme e segurança quanto a sua utilização [68]. Além disso, os microrganismos devem ser capazes de atingir seu local de ação no trato gastrointestinal, vivos e metabolicamente ativos, contudo, a grande variação de pH e liberação de substâncias com propriedades detergentes e enzimáticas são um grande desafio para estes microrganismos [14].

Dessarte, estudos que buscam elucidar as possíveis interações entre microrganismos são de suma importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e funcionamento de probióticos. Além disso, o estudo de interação entre probióticos e outros microrganismos abre espaço para o desenvolvimento de novos produtos com potencial terapêutico, uma vez que é possível explorar estas interações para fixar linhagens de interesse em produtos fermentados tradicionais, como a kombucha, ou utilizar este conhecimento para o desenvolvimento de modelos de estudo que reproduzem uma microbiota dinâmica, porém, estável.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Verificar a Influência de leveduras oriundas de kombucha sobre a manutenção da concentração, viabilidade celular e potencial biotecnológico na interação com a bactéria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019.

3.2 Objetivos específicos

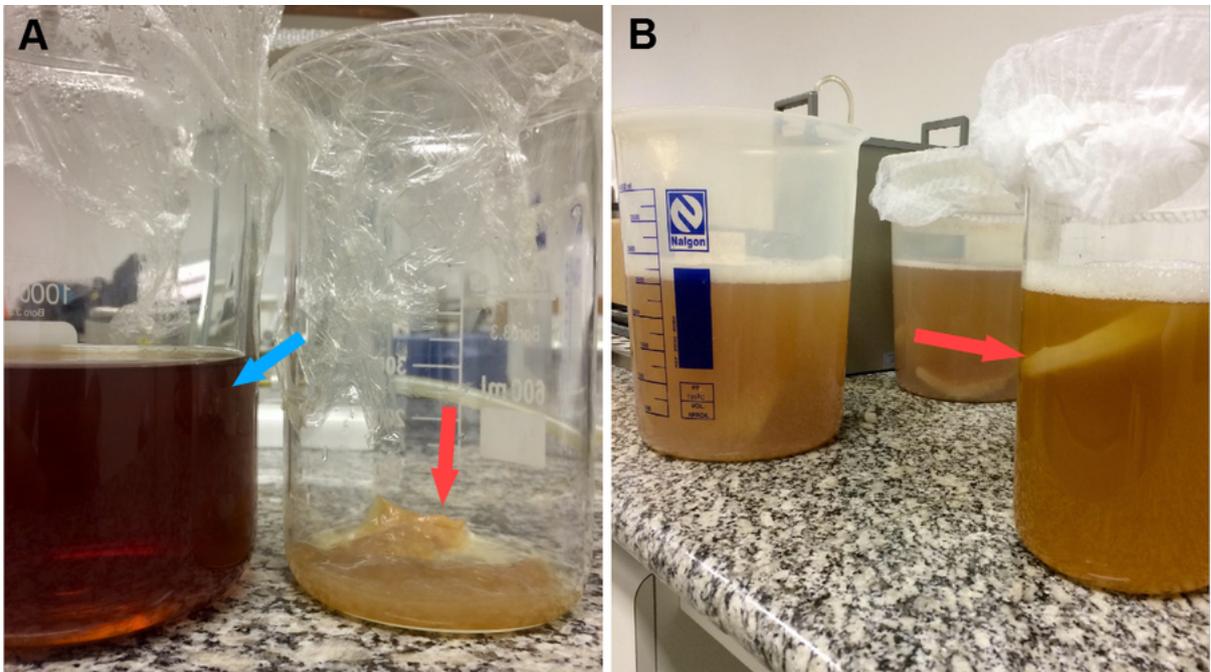
- Isolar leveduras de diferentes culturas de kombucha;
- Avaliar parâmetros de segurança de uso das leveduras isoladas;
- Avaliar parâmetros de potencial probiótico das leveduras isoladas;
- Avaliar a manutenção da concentração e viabilidade celular das bactérias *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em co-cultura com leveduras isoladas de kombucha;
- Definir quais leveduras isoladas podem beneficiar o crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019;
- Identificar possíveis compostos que sejam importantes para a interação bactéria x levedura.

4 Materiais e Métodos

4.1 Aquisição e manutenção da kombucha

SCOBYs de 4 diferentes kombuchas foram adquiridos por doação, sendo elas, 2 kombuchas de produção caseira (advindas do Canadá e da Paraíba, Brasil) e 2 de produção comercial (Marin Kombucha - Califórnia, Estados Unidos da América; Cia dos Fermentados - São Paulo, Brasil). A manutenção dos SCOBYs foi realizada pelo processo de fermentação comum da kombucha, como demonstrado em Silva e colaboradores [69] com modificações. Sucintamente, preparou-se uma infusão com um *blend* de chá verde e chá preto (*Camellia sinensis*) nas proporções de 5 g/L de chá verde e 10 g/L de chá preto, realizando infusão de 5 minutos à 87°C e 7 minutos à 93°C. Após esta etapa, adicionou-se açúcar na proporção de 50 g/L, agitando o líquido até total dissolução. Após atingir temperatura ambiente, o chá adoçado foi distribuído em diferentes recipientes e a estes foram adicionados 20 g/L de um dos SCOBYs, adicionado de 10% do volume total de kombucha previamente fermentada. Dessarte, cada SCOBY foi mantido em recipiente separado e sua fermentação ocorreu à temperatura de 23°C, durante 5 a 10 dias até a próxima substituição do substrato.

Figura 2 – Chá adoçado (seta azul) e um SCOBY (seta vermelha) (A); Kombuchas em fermentação com SCOBYs (seta vermelha) (B).



Fonte: do autor

4.2 Isolamento das leveduras e identificação

O isolamento das leveduras ocorreu ao longo do processo de fermentação, visando capturar leveduras mais adaptadas ao alto potencial osmótico do líquido no início do processo,

outras mais adaptadas ao baixo pH no fim da fermentação e seus interpostos. O protocolo se deu segundo Castillo-Castillo e colaboradores [70] com modificações. Amostras do kombucha foram retiradas e espalhadas em meio sólido MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), previamente autoclavado, em placas de Petri. Durante o processo de distribuição do meio nas placas de Petri, foi adicionado cloranfenicol para concentração final de 200 $\mu\text{g/mL}$ visando evitar o crescimento de colônias de bactérias susceptíveis. As amostras foram coletadas nos dias 0, 2, 4, 6, 14 e 20 de fermentação com auxílio de alça de platina e inoculadas nos meios sólidos distribuídos em placas de Petri, com movimentos em “z”. As placas foram vedadas e deixadas em incubação a 23°C por 2 a 5 dias, até que as colônias de leveduras pudessem ser diferenciadas morfolologicamente.

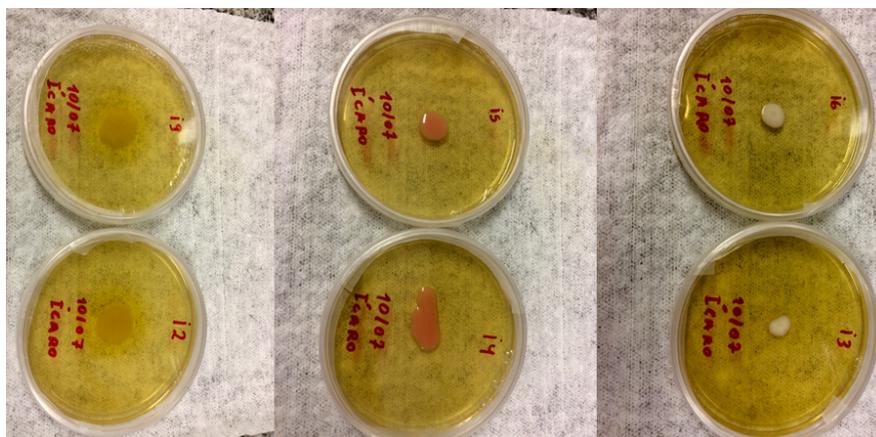
Figura 3 – Variedade de fungos em uma das placas onde as amostras de kombucha foram inoculadas. É possível observar colônias de diferentes cores e aspectos macroscópicos.



Fonte: do autor

Após o período de incubação, amostras de colônias foram isoladas e transferidas para outras placas de Petri com meio MRS sem cloranfenicol. Foram selecionadas colônias que apresentavam aspectos macroscópicos distintos quanto à cor, forma, tamanho, textura, uniformidade do bordo, brilho e uniformidade das superfícies adaxial e abaxial. As colônias isoladas foram rotuladas e incubadas a 23°C para crescimento, e subsequentemente, armazenadas a 4°C para posterior utilização.

Figura 4 – Alguns dos isolados de leveduras separados por semelhança morfológica das colônias. Microrganismos isolados em diferentes tempos de fermentação de uma das kombuchas comerciais. Observam-se colônias de diferentes cores.



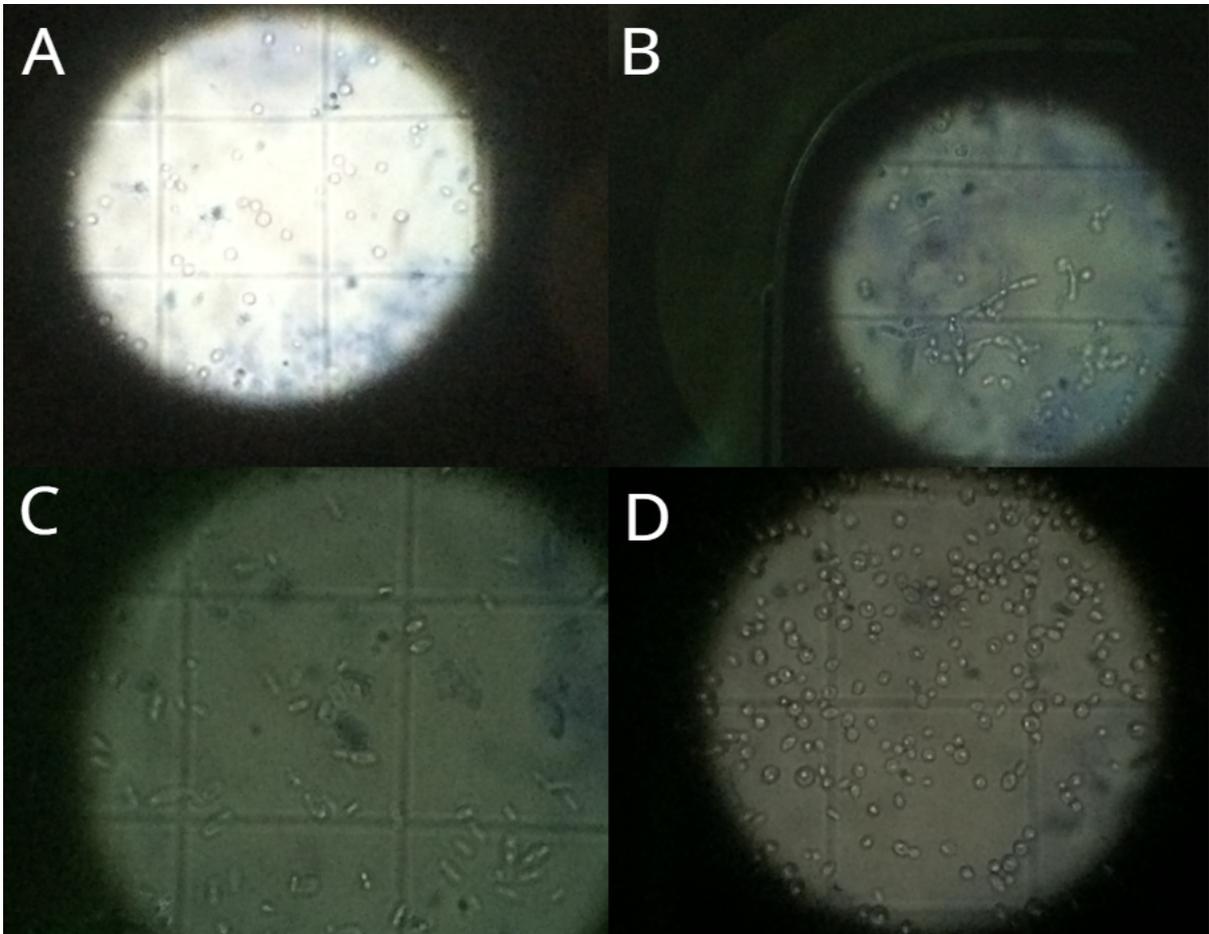
Fonte: do autor

Isolados de leveduras foram enviados ao Laboratório de Análises Fleury Medicina e Saúde, com o qual temos parceria por parte do professor Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio da Universidade de São Paulo, para identificação das espécies por técnica de MALDI-TOF.

4.3 Interação preliminar entre leveduras e *Bifidobacterium animalis subsplactis* HN019

Os testes preliminares de interação foram realizados considerando condições não ideais para o crescimento das bactérias e das leveduras, visando identificar a presença de benefício entre as duas espécies. Inicialmente, 10 isolados de leveduras foram inoculados separadamente em meio líquido RCM (Reinforced Clostridial Medium). As linhagens foram escolhidas baseando-se em aspectos morfológicos macroscópicos das colônias e microscópicos das células. Foram excluídas colônias com aspecto de fungo filamentososo e/ou que formassem colônias rígidas. Ademais, foram excluídos todos os isolados que não apresentassem aspecto microscópico de levedura, que apresentassem formação de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, vistas sob microscópio. As leveduras foram incubadas no meio RCM por 5 dias à 37°C em estufa BOD (Demanda Biológica de Oxigênio). Ao final do período de incubação as células foram contadas em microscópio utilizando azul de metileno como corante de viabilidade. Após verificação da concentração celular do inóculo, foram realizadas diluições e suas concentrações foram ajustadas para 1×10^6 células/mL em tubos de ensaio de 20 mL contendo 10 mL de meio RCM [71].

Figura 5 – Variedade de leveduras isoladas de kombucha vistas em microscópio (400x). Observam-se leveduras de diferentes morfologias, (A e D) arredondadas, (C) ovaladas e (B) células mais alongadas. Observam-se vacúolos no interior das células, identificadas como pontos mais claros e brilhantes no interior das células.



Fonte: do autor

A contagem de células ocorreu em Câmara de Neubauer com as células previamente coradas com azul de metileno. Foram consideradas mortas as células coradas em azul e vivas as células não coradas ou apenas levemente coradas, sendo contados 5 campos escolhidos aleatoriamente do setor central da câmara. A fórmula para determinar a concentração celular foi:

$$X = nCel \times 5 \times Fd \times 10^4$$

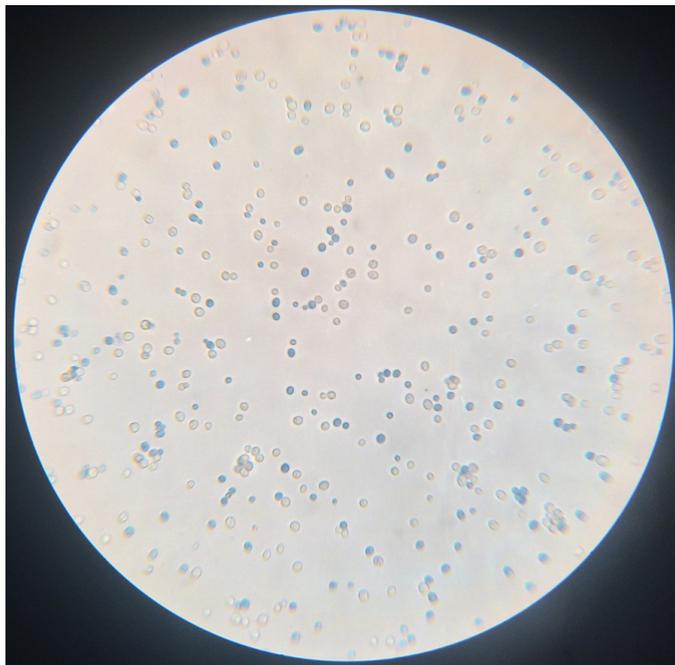
Onde, nCel é o número total de células contadas e Fd sendo o fator de diluição.

Para determinação da viabilidade celular, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$X = \frac{nCel - nMorte}{nCel} \times 100$$

Onde, nCel é o número total de células contadas e nMorte é o número de células mortas.

Figura 6 – Leveduras vistas em microscópio óptico (400x) e coradas com azul de metileno. As células observadas em coloração azul são consideradas mortas.



Fonte: do autor

Concomitante à etapa anterior, foi adicionado ao meio RCM, 1×10^9 UFC/mL da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. HN019. Por conseguinte, os tubos foram mantidos em incubação a 37°C durante 14 dias em BOD. Ao final do período de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia da bactéria, em meio RCA (Reinforced Clostridial Agar) adicionado de cicloheximida a 200 µg/mL para evitar o crescimento de leveduras [72]. A contagem foi realizada nas diluições de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Foi utilizado, como controle, um tubo com a bactéria cultivada isoladamente.

Ademais, após o experimento de interação, os tubos contendo as bactérias e leveduras foram centrifugados a 2.600 rpm e amostras de 6 mL do sobrenadante de cada tubo foi isolado e liofilizado para realização dos experimentos de metabolômica utilizando técnica de Q-TOF (Espectrometria de Massas Quadrupolo - Tempo de Voo), em parceria com o professor Dr. Eduardo Jorge Pilau da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

4.4 Análise metabólica (Q-TOF)

Em parceria com o professor Eduardo Jorge Pilau da Universidade Estadual de Maringá, foi possível identificar alguns compostos resultantes da interação entre a bactéria e as leveduras. Os ensaios foram realizados a partir do sobrenadante dos experimentos preliminares de interação e no tempo final de 14 dias de co-cultura. Foi utilizada a técnica de Q-TOF utilizando meio RCM como branco, os espectros resultantes foram analisados com software DataAnalysis 5.3 (Bruker Compass DataAnalysis). A rede de interação molecular foi criada utilizando workflow do

GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) através do software WinSCP 5.17.10, a data filtrada com *precursor ion mass* e *fragment ion mass* de 0,02 Da, limite mínimo de semelhança de 0,65 com pelo menos 4 correspondentes. A biblioteca foi ajustada de forma semelhante, com threshold de 0,65 e pelo menos 4 picos correspondentes. A montagem da rede de interação foi realizada em software CytoScape 3.8.2, com ajuste de borda redonda e diferenciação de cores entre os ensaios analisados. Os compostos identificados no branco foram então retirados, sobrando apenas os compostos identificados na monocultura de *B. lactis* HN019 e nas co-culturas com *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e com o isolado i3. Destarte, os grupamentos foram identificados através das cores laranja/G4 (monocultura de HN019), vermelho/G1 (co-cultura HN019 + *P. membranifaciens*), azul/G2 (co-cultura HN019 + *R. mucilaginosa*) e verde/G3 (co-cultura HN019 + isolado i3).

4.5 Manutenção das viabilidades e concentrações celulares ao longo das interações

Após observação dos dados de interação preliminares, elegeu-se as 3 leveduras que possibilitaram a maior manutenção da viabilidade das bactérias após co-cultura para continuidade dos experimentos. Tais isolados (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens* e isolado i3) foram utilizados para um novo teste de interação, utilizando a mesma metodologia do ensaio preliminar, com modificações.

Incubou-se as leveduras isoladamente em meio RCM por 3 dias a 37°C em etufa BOD. Após esse período, redistribuiu-se as leveduras em tubos, acomodando 1×10^6 células/mL em cada tubo, totalizando 7 tubos para cada isolado de levedura em triplicata. Cada tubo foi utilizado posteriormente para contagem de células no experimento de interação, em que as contagens foram realizadas nos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14. Em seguida, a cada tubo foi adicionado 1×10^9 UFC/mL da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. HN019 e o volume ajustado para 10mL de meio RCM. As co-culturas foram então incubadas em estufa BOD a 37°C por 14 dias, retirando-se amostras nos dias referidos para análise de concentração e viabilidade das bactérias e leveduras seguindo os mesmos protocolos dos testes preliminares. Como controle, foi utilizado um tubo contendo a bactéria cultivada em monocultura.

4.6 Teste de hidrofobicidade e autoagregação

Os experimentos de hidrofobicidade relativa de superfície e autoagregação celular foram realizados segundo Gut e colaboradores [73], com modificações.

4.6.1 Teste de hidrofobicidade relativa de superfície

Leveduras foram cultivadas em meio RCM por 24 horas a 37°C. Após este tempo, tubos com 3 mL da cultura foram centrifugados ($4.000 \times g$ por 15 minutos), ressuspendidas e lavadas em 3 mL de água peptonada 0,1% por dois ciclos. A densidade óptica das suspensões foram

verificadas a 560 nm para ajuste de concentração de 1×10^6 células/mL para ajuste final de 4 mL. Foi adicionado 1 mL de xileno em 3 mL de suspensão de leveduras e a densidade óptica da fase aquosa verificada. As células foram vigorosamente agitadas por 2 minutos com auxílio de vórtex e deixadas em incubação por 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, a densidade óptica da fase aquosa foi novamente verificada a 560 nm. O percentual de hidrofobicidade das leveduras foi calculado pela seguinte fórmula:

$$Hr = 1 - \left(\frac{Hf}{Hi}\right) \times 100$$

Onde Hr é o percentual de hidrofobicidade relativa das leveduras, Hf a densidade óptica final e Hi a densidade óptica inicial. Como controle, foi utilizada a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* CNCM I-745.

4.6.2 Teste de autoagregação

Leveduras foram cultivadas em meio RCM por 24 horas a 37°C. Após este tempo, tubos com 3 mL da cultura foram centrifugados a 4.000 x g por 15 minutos e lavadas em 3 mL de água peptonada 0,1% por 2 ciclos. Após esta fase, as células foram ressuspensas em 3 mL de água peptonada 0,1%, onde a densidade óptica da suspensão foi verificada com o auxílio de um espectrofotômetro a 560 nm e a concentração ajustada para 1×10^6 células/mL. As células passaram por 2 horas de incubação a 37°C e após esse tempo, uma nova leitura de densidade óptica foi tomada. O percentual de autoagregação das leveduras foi calculado pela seguinte fórmula:

$$Ag = 1 - \left(\frac{Af}{Ai}\right) \times 100$$

Onde Ag é o percentual de autoagregação das leveduras, Af o valor da densidade óptica final e Ai o valor da densidade óptica inicial. Como controle, foi utilizada a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* CNCM I-745.

4.7 Teste de atividade de proteases e fosfolipases

Os experimentos para verificação de atividade enzimática de proteases e fosfolipases foram realizados segundo Bhukya e colaboradores [74], com modificações. O parâmetro para avaliação da atividade enzimática de proteases (Prz) e atividade enzimática de fosfolipases (Pz) foi determinado segundo Lívia e colaboradores [75], sendo expresso na tabela 1, a seguir:

Tabela 1 – Valores de referência para análise do potencial Pz e Prz dos experimentos de atividade enzimática.

	1	Sem atividade enzimática
Valor Prz/Pz	0,999 ~ 0,700	Atividade enzimática baixa
	0,699 ~ 0,400	Atividade enzimática moderada
	0,399 ~ 0,100	Atividade enzimática alta

Por sua vez, o crescimento das colônias analisadas foi expresso como a tabela 2, a seguir, para análise comparativa entre as amostras:

Tabela 2 – Valores de referência para análise do crescimento das colônias durante os testes de atividade enzimática.

Crescimento	-	Não apresentou crescimento da colônia
	+	A colônia restringiu-se à área inicial do inóculo
	++	A colônia extrapolou a área inicial do inóculo

4.7.1 Teste de atividade enzimática de proteases

As leveduras foram cultivadas em meio RCM por 24h à 37°C e em seguida sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL. Cem microlitros da suspensão foram inoculados em meio *Potato Dextrose Agar* suplementado com 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 10 g/L de gelatina, pH final de 7,3. Por conseguinte, leveduras foram incubadas a 23°C e 37°C por até 7 dias e a atividade de proteases foi identificada pela capacidade de crescimento das colônias e pela formação de halos em torno destas. A atividade proteolítica é expressa pela razão entre o diâmetro das colônias e o diâmetro somado à zona do halo formado ao redor destas, expresso na forma de Prz (*Proteinase zone*).

$$Prz = \frac{Cd}{Cd+2Ch}$$

Onde Prz é o valor de atividade enzimática de protease, Cd é o diâmetro da colônia e Ch é comprimento do halo a partir da borda da colônia. O diâmetro foi verificado com auxílio de paquímetro. *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* CNCM I-745 foi utilizada como controle experimental.

4.7.2 Teste de atividade enzimática de fosfolipases

As leveduras foram cultivadas em meio RCM por 24h a 37°C e em seguida sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL. Cem microlitros da suspensão foram inoculados em meio MYP (*Mannitol Egg Yolk Polimixin Agar*) suplementado com 1M de cloreto de sódio, 0,005M

de cloreto de cálcio e 2% de gema de ovo. Por conseguinte, as leveduras foram incubadas a 23°C e 37°C por até 7 dias e a atividade de fosfolipases foi identificada pela capacidade de crescimento das colônias e pela formação de halos em torno destas. A atividade de fosfolipase é expressa pela razão entre o diâmetro das colônias e o diâmetro somado à zona do halo formado ao redor destas, expresso na forma de Pz (*Phospholipase zone*) (figuras 13 e 14).

$$Pz = \frac{Cd}{Cd+2Ch}$$

Onde Pz é o valor de atividade enzimática de fosfolipase, Cd é o diâmetro da colônia e Ch é comprimento do halo a partir da borda da colônia. O diâmetro foi verificado com auxílio de paquímetro. *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* CNCM I-745 foi utilizada como controle experimental.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio de software GraphPad Prism 6. A análise dos ensaios de autoagregação e hidrofobicidade foi realizada em teste 2-way Anova de análises agrupadas para os dados da variação de temperatura intraespécie e 1-way Anova para análises entre as espécies de leveduras. Os dados amostrais estão expressos como média com desvio padrão e os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

5 Resultados e Discussão

Para este trabalho, foram adquiridos por doação, 4 diferentes kombuchas. Destes, 2 kombuchas são de origem comercial (k1 e k2) e 2 de origem caseira (k3 e k4). Ainda, k3 é uma kombucha de origem canadense, enquanto k4 vem do nordeste brasileiro, do estado da Paraíba. O grupo k1 possui sua origem em São Paulo e o k2 vem da Califórnia, nos Estados Unidos, gerando grupos de origem bastante diversificada. Dessarte, as kombuchas utilizadas neste trabalho são tanto caseiras quanto comerciais com origens no Brasil e na América do Norte. Durante o processo de fermentação e manutenção das kombuchas, observou-se que os 4 grupos apresentam diferentes características no processo fermentativo. Tais fenômenos são evidenciados na literatura, uma vez que cada kombucha apresenta um grupo distinto de microrganismos [40].

5.1 Isolamento e identificação das leveduras

Previamente aos procedimentos de isolamento das leveduras, todos os parâmetros iniciais de fermentação foram padronizados, desde volume de chá, concentração de açúcar, peso dos SCOBYs, volume de líquido *starter* e formato do fermentador. Observou-se que, apesar da padronização do processo fermentativo, o pH inicial de cada kombucha variou. Este fato pode ser correlacionado com os diferentes perfis de ácidos orgânicos presentes em cada SCOBY e líquido *starter*. No que lhe concerne, observou-se que as amostras de origem comercial (k1 e k2), iniciaram sua fermentação já em pH mais baixo, quando comparadas com as amostras de origem caseira (k3 e k4). Este fenômeno pode ser gerado por maior número de ciclos de *backslipping* em processos de fabricação mais padronizados, o que sugere um direcionamento nas populações microbianas às conformações mais estáveis e adaptadas ao processo de produção comercial desta bebida [58].

Tabela 3 – Amostras de kombucha e seus respectivos valores de pH nos dia 0 e 10 de fermentação

Amostras	pH inicial	pH final
k1 (comercial)	3,80	3,67
k2 (comercial)	3,78	3,54
k3 (caseiro)	4,24	3,74
k4 (caseiro)	4,14	3,63

Fonte: própria

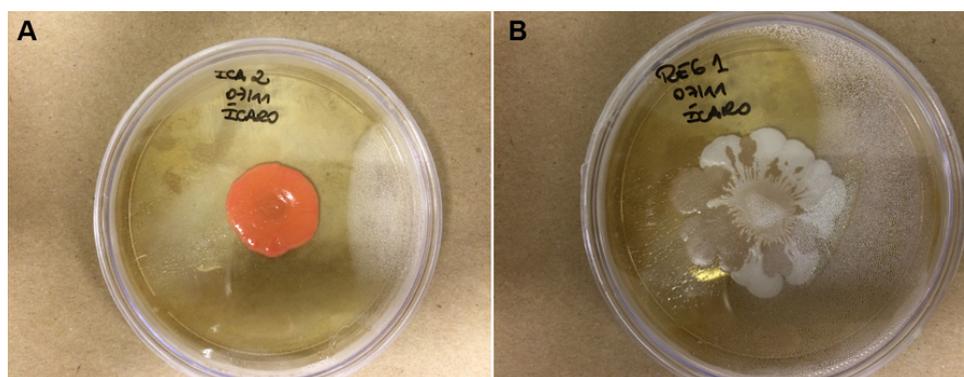
Apesar das diferenças nos processos fermentativos das kombuchas de diferentes origens, observou-se algumas semelhanças entre os grupos de microrganismos identificados. Predominantemente, no processo de isolamento, observou-se colônias esbranquiçadas, brilhosas, de bordo liso e arredondado com pouca entrada da colônia no substrato. Em todos os kombu-

chas, identificou-se colônias de coloração rosácea que foram identificadas posteriormente como *Rhodotorula mucilaginosa*, previamente encontrada na literatura em kombuchas [45]. Esta espécie foi encontrada também em todos os tempos de fermentação, contudo, números maiores de colônias foram observados nos primeiros dias, sugerindo que esta é uma levedura que se beneficia da alta concentração de carboidratos e maior pH. Além desta, outra espécie encontrada em todas as kombuchas foi *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*), que também já foi reportada em outros trabalhos da literatura [44]. Ademais, k3 foi a única a apresentar *Pichia membranifaciens*, sendo encontrada tardiamente no processo fermentativo. Esta levedura também já é reportada em kombuchas, inclusive em culturas de origem comercial [46]. No que lhe concerne, reportou-se a presença de *Candida albicans* em k1, o que possivelmente denota contaminação durante manuseio ou a inserção desta espécie no ecossistema do biofilme. *Candida albicans* já foi encontrada na literatura em kombuchas de origem doméstica, mas não em kombuchas de origem comercial até o momento [76]. Demais espécies estão em processo de identificação.

Tabela 4 – Espécies de leveduras isoladas e identificadas em cada kombucha.

Levedura	K1	K2	K3	K4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	x	x	x	x
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	x	x	x	x
<i>Pichia membranifaciens</i>			x	
<i>Candida albicans</i>	x			

Figura 7 – Isolados de leveduras: *Rhodotorula mucilaginosa* (A) e *Pichia membranifaciens* (B).



Fonte: do autor

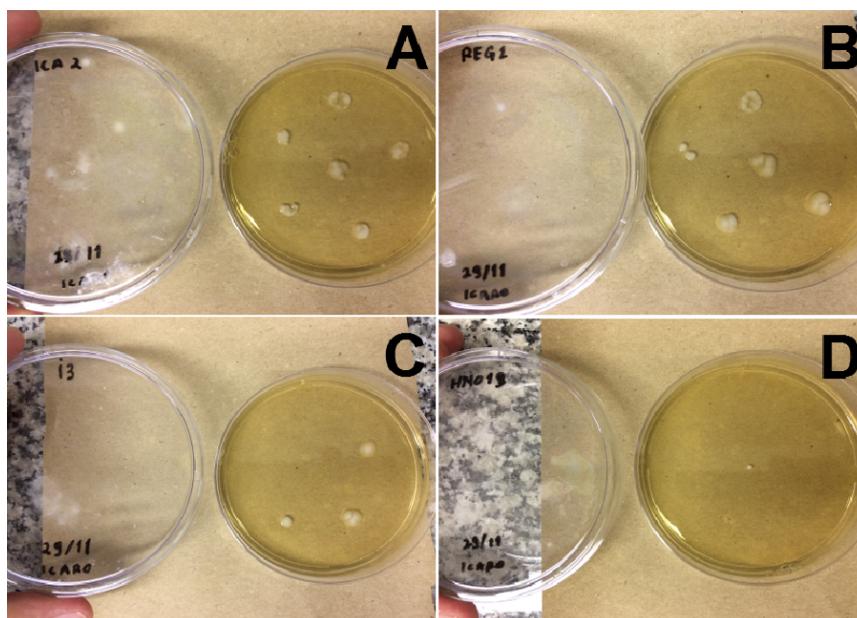
5.2 Teste de interação entre leveduras e bactérias

Foi realizado teste preliminar de co-cultura entre os isolados de leveduras das kombuchas e a bactéria *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, linhagem autorizada e reconhecida

no Brasil como probiótica, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apesar de ser uma linhagem que resiste pouco à presença de oxigênio, optou-se por realizar a co-cultura em aerobiose, uma vez que as leveduras podem favorecer que o micro ecossistema mantenha a viabilidade das bactérias, como demonstrado por Yeo e colaboradores [67], ressaltando que HN019 pode se beneficiar na presença da levedura *Williopsis saturnus* subsp. *saturnus* em leite fermentado, mantendo-se viável mesmo em aerobiose. Dessarte, evidenciar este fenômeno entre leveduras da kombucha e a bactéria de interesse é uma etapa importante para compreendermos o processo de introdução de uma cepa probiótica em um alimento fermentado tradicional como a kombucha. Evidenciar relações mutualísticas ou simbióticas que possam ser agregadas à kombucha apresenta suma importância, pois, produtos probióticos de nova geração tendem a apresentar novos tipos de microrganismos para além das bactérias lácticas e bifidobactérias, especialmente se apresentarem dinâmicas simbióticas de ocorrência natural [18, 77]. Contudo, a dificuldade de inserir novos microrganismos aos alimentos fermentados tradicionais está na baixa estabilidade microbiológica destes, em particular àqueles que são produzidos através de *backslopping*, uma vez que este evento resulta em maior adaptação/interdependência mútua entre os microrganismos envolvidos à proporção que se aumenta o número de ciclos de fermentação [58, 77]. Esta alta estabilidade microbiológica é importante para evitar a contaminação do alimento por microrganismos potencialmente patogênicos ou deteriorantes. Contudo, esta mesma característica dificulta a entrada de microrganismos benéficos à nossa saúde que não façam parte originalmente da rede, vindo a se tornar uma grande barreira tecnológica.

Dos 10 isolados selecionados para o teste preliminar, apenas 3 demonstraram serem capazes de manter a bactéria probiótica viável sob condições de aerobiose nas diluições estudadas. Os demais isolados não possibilitaram a manutenção das bactérias, não sendo possível a visualização de unidades formadoras de colônia nas diluições investigadas. Como observado na figura 8, a interação da bactéria probiótica com *Rhodotorula mucilaginosa* (A) e *Pichia membranifaciens* (B) possibilitou a observação de colônias de bactérias até nas diluições de 10^{-8} , o isolado i3 (C) ainda não foi identificado, porém, possibilitou a visualização de colônias até a diluição de 10^{-7} . Entretanto, o controle (D) onde a bactéria foi cultivada isoladamente, foi possível a observação de apenas 1 colônia na diluição de 10^{-6} . Diversos eventos podem ser citados para explicar estes fenômenos. Bactérias do gênero *Bifidobacterium* geralmente produzem H_2O_2 em aerobiose, como uma forma de regenerar NAD^+ para seu metabolismo energético, entretanto, a produção de peróxido de hidrogênio é tóxica para a célula e está diretamente relacionada ao estresse oxidativo celular, sendo inclusive observado em *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* [78]. Dessarte, algumas leveduras possuem a capacidade de sintetizar catalases, responsáveis pelo metabolismo de peróxido de hidrogênio e sua subsequente decomposição em água e oxigênio, este último podendo ser utilizado pelas leveduras, uma vez que são preferencialmente aeróbicas [79].

Figura 8 – Colônias de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 crescendo em meio RCA após interação com as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* (A), *Pichia membranifaciens* (B), levedura isolada i3 (C) e sem a interação com leveduras (D).

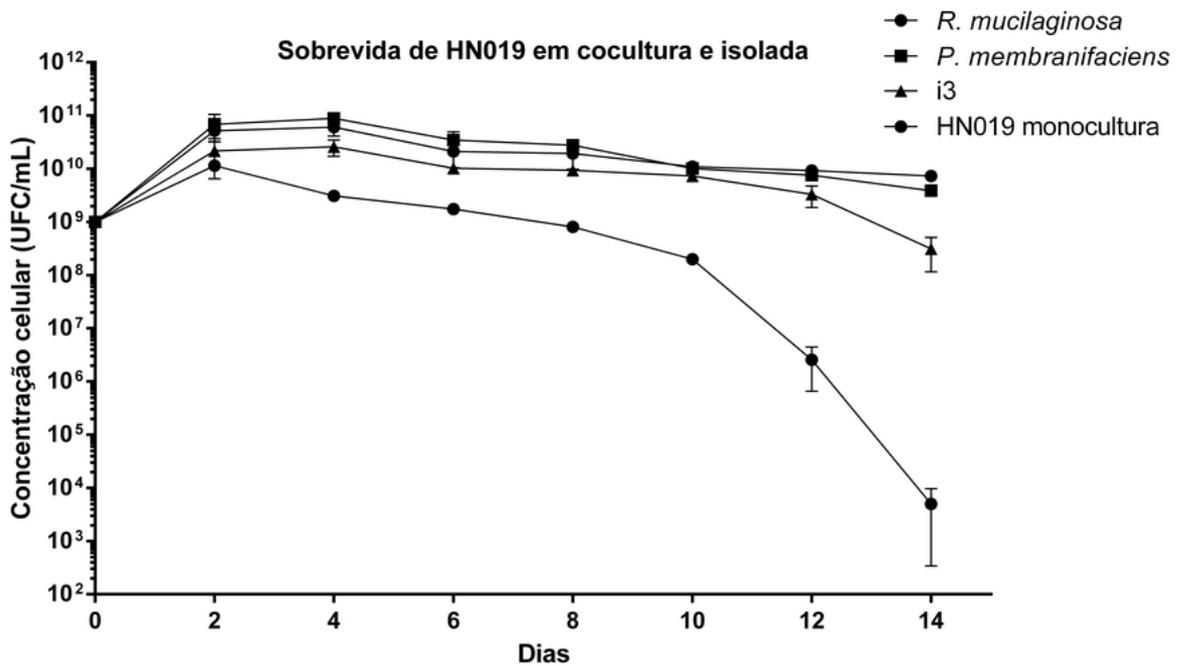


Fonte: do autor

5.2.1 Efeito das leveduras na sobrevivência da cepa probiótica.

Em seguimento, repetiu-se o experimento de interação de forma mais minuciosa, utilizando apenas os 3 isolados de leveduras selecionados na etapa preliminar. Desta forma visou-se analisar a variação na concentração e viabilidade das bactérias e das leveduras ao longo do tempo de co-cultura. Surpreendentemente, observou-se que tanto as bactérias quanto as leveduras mantiveram-se com a concentração bastante elevada durante todo o experimento em condição de co-cultura. Os valores corroboram com os experimentos preliminares. No 14º dia de co-cultura, as bifidobactérias apresentaram concentração de $7,31 \times 10^9$ UFC/mL e $3,88 \times 10^9$ UFC/mL em interação com *R. mucilaginosa* e *P. membranifaciens*, respectivamente. Conjuntamente, a interação com o isolado i3 favoreceu a manutenção da concentração em $3,13 \times 10^8$ UFC/mL. As bactérias crescendo em monocultura apresentaram decaimento acentuado na sua viabilidade, mantendo a concentração acima de 10^9 até o 6º dia ($1,74 \times 10^9$ UFC/mL). Todavia, a partir deste dia a concentração diminuiu drasticamente, reduzindo-se para $4,9 \times 10^3$ UFC/mL no último ponto avaliado. Associadamente, observa-se um aumento na variação da concentração entre as replicatas a medida que observa-se maior número de morte celular. Este fato é observado a partir do dia 12 de análise, como demonstrado na figura 9.

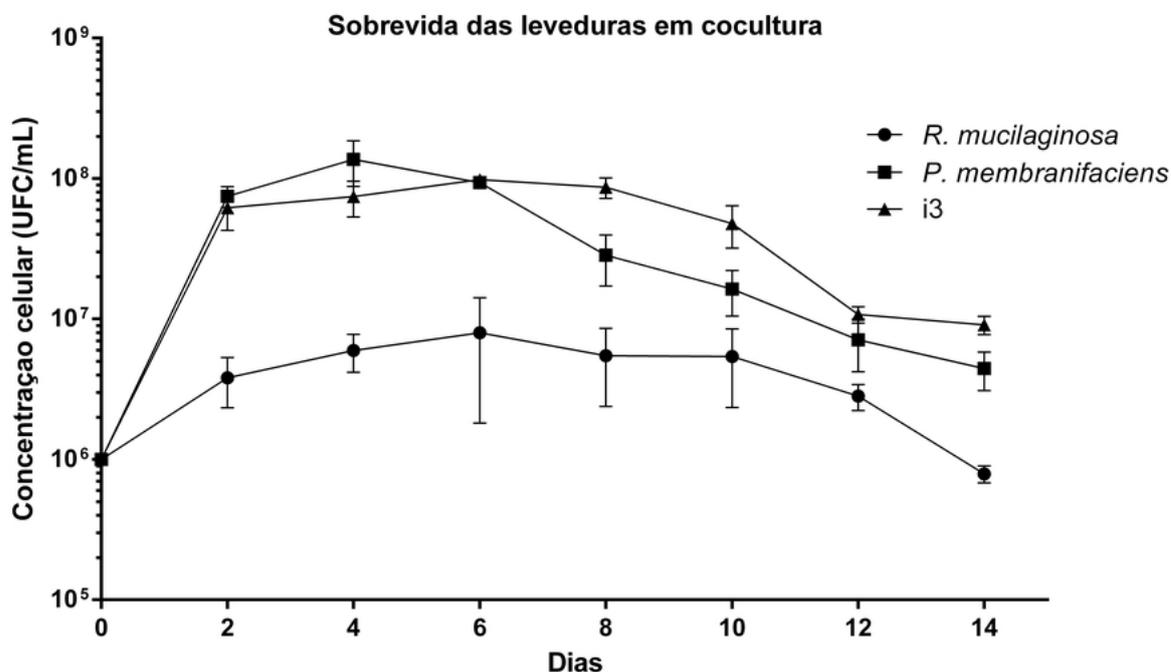
Figura 9 – Concentração celular de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 ao longo do experimento de interação com as leveduras. A bactéria em monocultura foi utilizada como controle experimental.



Fonte própria

Concomitantemente, a concentração celular das leveduras manteve-se elevada ao longo de todo o experimento. Entretanto, *R. mucilaginosa* apresentou a menor taxa de crescimento, variando menos que 1 log da concentração inicial (figura 10) e corrobora com o dado de que este isolado não apresentou crescimento em 37°C durante os testes de atividade enzimática de proteases e fosfolipases (tabelas 6 e 5). Não obstante, *P. membranifaciens* e o isolado i3, aumentaram sua concentração celular em 2 log e mantiveram-se com a concentração elevada ao longo de todo o experimento (figura 10). Este dado também corrobora com o experimento de atividade enzimática de fosfolipases, em que ambos isolados apresentaram crescimento considerável em 37°C (tabela 5).

Figura 10 – Concentração celular em células por mililitro das leveduras ao longo do experimento de interação com a cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* HN019.



Fonte própria

Os dados de interação aqui apresentados são bastante promissores. Até o momento da escrita deste trabalho, tenho conhecimento de apenas 2 artigos que verificam a influência da interação entre leveduras e bifidobactérias. Em ambos os trabalhos o leite foi utilizado como meio de cultura. Toh & Liu demonstraram que a interação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 com algumas espécies de leveduras, favoreceu um aumento na taxa de replicação celular da bactéria nas primeiras 20 horas de fermentação. Eles avaliaram a co-cultura com *Saccharomyces cerevisiae*, *Williopsis saturnus*, *Pichia kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* e *Geotrichum candidum*, onde o efeito de aumento da taxa de crescimento foi identificado apenas na co-cultura com *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* e *K. lactis*. Eles também avaliaram se a co-cultura era capaz de promover aumento na sobrevida das bactérias durante 8 semanas de armazenamento em temperatura de 10°C, o que não foi possível identificar uma vez que a bactéria em monocultura manteve-se em alta concentração e viabilidade, não apresentando diferença das amostras em co-cultura [79]. Assim como identificado nos testes preliminares, Tho & Liu também identificaram co-culturas não benéficas às bactérias, como *D. hansenii*, que promoveu uma redução de 4 log da concentração inicial das bactérias já após 24h de co-cultura, com inóculo inicial da bactéria de 1 x 10⁷ UFC/mL. Este fato reforça que o benefício da interação é espécie-específico, e pode variar fortemente de acordo com as espécies de leveduras e bactérias que se deseja utilizar [79]. Por sua vez, Yeo e colaboradores avaliaram a influência de *W. saturnus* subsp. *saturnus* NCYC 22 na sobrevida de 3 espécies de *B. lactis*.

Eles observaram que a co-cultura manteve a viabilidade bacteriana no leite em concentrações acima de 6 log mesmo após 6 semanas de co-cultura com HN019 e BB-12, e 5,7 log para B94, com inóculo inicial de 7 log UFC/mL [67]. Nos experimentos descritos por Yeo e colaboradores, as bactérias em monocultura apresentaram rápida redução na concentração celular, onde B94 apresentou morte total na 2ª semana de monocultura e BB-12 e HN019 nas 3ª e 4ª semana, respectivamente [67]. Estes dados corroboram com os aqui encontrados nos testes de interação, uma vez que as bifidobactérias mantiveram-se em concentrações elevadas em co-cultura durante as 2 semanas de experimento, e a mesma bifidobactéria em monocultura apresentou queda significativa na viabilidade celular entre o 12º e 14º dia. Vale ressaltar aqui, que nos experimentos de Yeo e colaboradores, as culturas foram realizadas em 30°C e inóculo inicial de 7 log UFC/mL, mas que na monocultura, a concentração de HN019 em específico, manteve-se entre 3 log e 4 log UFC/mL na segunda semana de experimento, corroborando com $4,9 \times 10^3$ UFC/mL como demonstrado na figura 9 [67].

Ademais, Yeo e colaboradores testaram se apenas o sobrenadante das leveduras ou a co-cultura com as leveduras inativadas termicamente ou quimicamente era suficiente para manter o efeito da manutenção da viabilidade das *B. lactis*, e constataram que não era possível observar este fenômeno. Dessa forma, eles constaram que o metabolismo ativo da levedura é necessário para promover a manutenção da alta viabilidade das bactérias [67]. Dessarte, isto reforça que o fator necessário para gerar o efeito não consiste de um metabólito primário liberado pela levedura, e muito provavelmente faz parte do metabolismo secundário da mesma, no qual exige contato célula-célula ou comunicação *quorum sensing*, e que o fenômeno da manutenção da viabilidade pode estar atrelado a um mecanismo de proteção ao estresse celular. Em contrapartida, Vorob'eva e colaboradores, identificaram que leveduras podem liberar fatores extracelulares que promovem a proteção de bactérias lácticas contra a ação dos sais biliares, e nesse caso, o efeito não aparentou ser espécie específico e não demonstrou a necessidade de contato das bactérias com as leveduras, uma vez que até mesmo o sobrenadante da cultura das leveduras foi suficiente para gerar o efeito protetor [14]. Dessarte, o efeito da manutenção da viabilidade de *B. animalis* HN019 por ação de *R. mucilaginosa*, *P. membranifaciens* e o isolado i3 demandam futuras análises sobre a necessidade de contato direto ou comunicação por *quorum sensing*, o que sugeriria modificação do metabolismo secundário da levedura, ou se o efeito é promovido pela liberação de fatores moleculares intrínsecos do metabolismo primário destas. Fungos de modo geral apresentam um intrínseco mecanismo de regulação gênica de seu metabolismo secundário, e este caracteriza-se por grupamentos de genes biosintéticos (BGC). Os BGCs são grupamentos de genes vizinhos que regulam e promovem a expressão gênica de metabólitos de importância para o fungo, sendo estes grupamentos geralmente responsáveis pela síntese de policetídeos como a lovastatina, derivados da via do mevalonato, terpenos como fumagilina, peptídeos ribossomais e não ribossomais como penicilina e ciclosporina, isocianídeos como xantocilinas e derivados de triptofano [80]. Por sua vez, diferente dos metabólitos primários, a expressão do metabolismo secundário dos fungos demanda que condições específicas sejam apresentadas, como a incidência de luz no estímulo da

síntese de carotenoides (β -caroteno, γ -caroteno, toruleno torularodina) por *Rhodotorula* spp., ou o contato/comunicação com outros microrganismos como estímulo para enaciloxina [81, 82].

5.3 Potencial probiótico e patogênico das leveduras

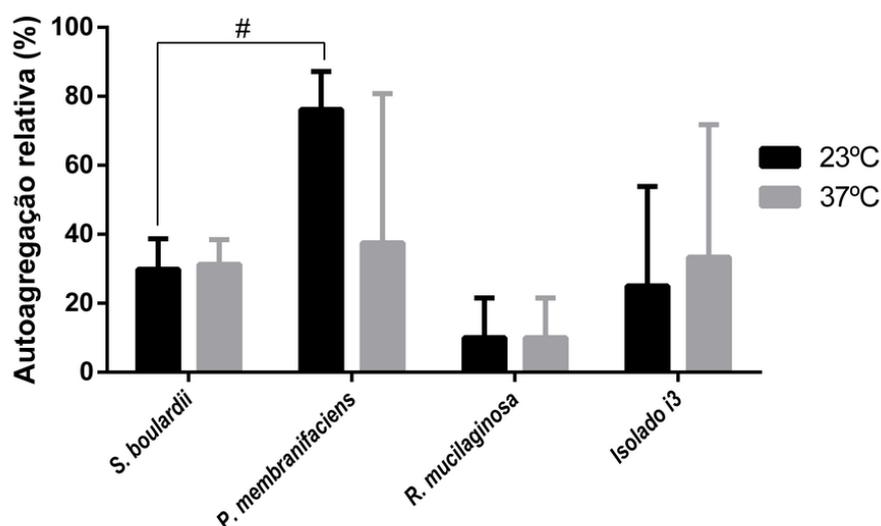
5.3.1 Autoagregação e Hidrofobicidade

Sem pormenorizar, as capacidades que um determinado microrganismo possui em aderir-se ao trato gastrointestinal, colonizar e conviver com outros microrganismos da microbiota estão relacionadas com complexas propriedades e características celulares atribuídas às ligações não específicas (interações iônicas, forças de Van de Waals, interações hidrofóbicas, entre outras) e ligações específicas (receptores de membrana e parede celular, adesinas, invasinas, entre outros) [83]. Autoagregação e hidrofobicidade são ditas como propriedades importantes para avaliar o potencial patogênico ou probiótico de um determinado microrganismo, uma vez que sugerem dados relevantes de como esses microrganismos comportam-se quanto à sua capacidade de adesão. Autoagregação refere-se à capacidade que um determinado microrganismo possui de formar aglomerados celulares da mesma espécie e hidrofobicidade refere-se à capacidade que tal microrganismo possui em aderir-se à hidrocarbonetos [83, 84]. Desta forma, observou-se as características de autoagregação e hidrofobicidade relativa de superfície das leveduras que apresentaram os melhores resultados de interação com a bactéria *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, visando a possibilidade de que essas leveduras possam ser utilizadas como facilitadoras para que estas bactérias sejam inseridas em diferentes kombuchas. Em ambas as análises observou-se que tais características variam em diferentes temperaturas para algumas leveduras, o que indica que as vias metabólicas envolvidas na autoagregação e hidrofobicidade resultam de mecanismos celulares de adaptação, e provavelmente, mecanismos adaptativos ao estresse. Para parâmetros comparativos, foi considerado que valores menores que 30% indicam baixa autoagregação e hidrofobicidade, valores entre 30% e 60% foram indicativos de atividade intermediária e valores acima de 60% como sendo alta autoagregação e hidrofobicidade, como sugerido por Menezes e colaboradores [85].

Analisando a autoagregação celular entre as leveduras, observou-se que apenas *P. membranifacies* demonstrou uma autoagregação considerada elevada em temperatura de 23°C. Contudo, apesar da redução aparente da autoagregação em temperatura de 37°C, não observou-se diferença estatística em relação à temperatura ambiente, dado o amplo desvio padrão apresentado nesta análise (figura 11). Isto sugere que os mecanismos adaptativos atrelados à característica de autoagregação desta espécie podem apresentar impacto de diversas vias metabólicas divergentes, o que causa uma variação ampla na resposta, ou ainda, que a variação na autoagregação é um resultado secundário e/ou indireto de vias adaptativas mais importantes. Em contrapartida, o isolado i3 e *S. boulardii* apresentaram autoagregação no intermédio da escala baixo/médio, sem diferenças estatísticas intraespécie. Observou-se ainda que, apesar de não apresentar diferença

estatística, em ambos os casos houve um leve aumento na média da autoagregação em 37°C em relação à temperatura ambiente, de 25% para 33,3% e 29,8% para 31,25, para isolado i3 e *S. boulardii* respectivamente. *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou baixa autoagregação em ambas as temperaturas analisadas, indicando que os mecanismos adaptativos celulares não resultam em variação na capacidade agregadora desta linhagem. Por fim, a autoagregação de *P. membranifaciens* em 23°C foi a única que apresentou diferença estatística com o controle *S. boulardii*, o que indica que a autoagregação destas leveduras em 37°C não apresenta variação significativa com a levedura probiótica controle (Figura 11).

Figura 11 – Autoagregação relativa das leveduras estudadas em 23°C e 37°C. *S. boulardii* foi utilizada como controle para este experimento. (*) Diferença estatística significativa entre as temperaturas; (#) diferença estatística significativa entre as espécies.



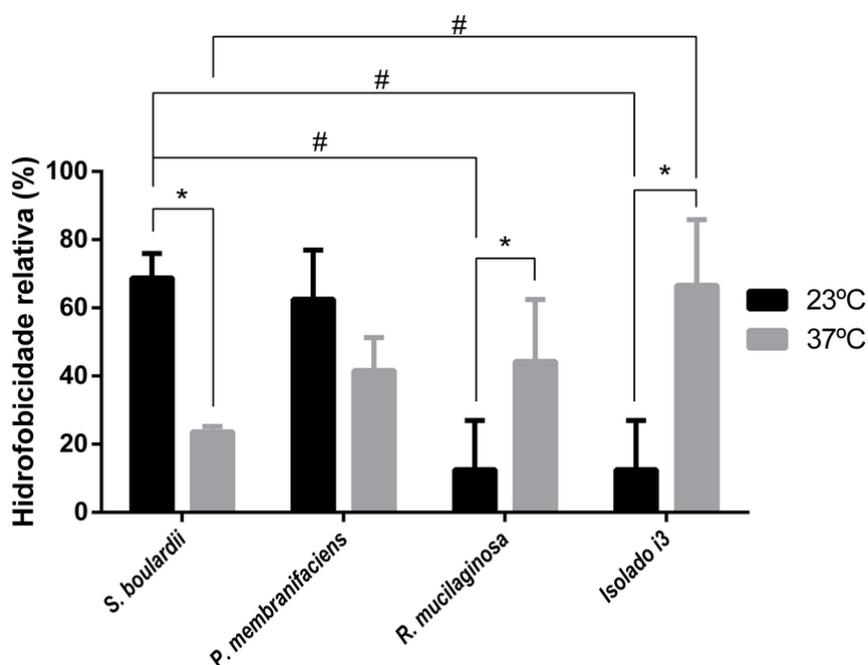
A hidrofobicidade relativa de superfície celular, por sua vez, é avaliada através da capacidade que os microrganismos possuem em aderir-se à hidrocarbonetos (MATH), que informa o potencial hidrofóbico ou hidrofílico das células analisadas e seu potencial em ligar-se às células do hospedeiro e à estrutura da camada mucosa do intestino [83]. Tal capacidade de aderir-se aos tecidos do hospedeiro conferem uma importante vantagem competitiva contra potenciais patógenos (no caso de cepas probióticas ou comensais), mas é indesejado no caso de microrganismos patogênicos [86]. Para análise de hidrofobicidade, pode-se utilizar diferentes tipos de hidrocarbonetos, como xileno, clorofórmio e acetato de etila [87]. Para este experimento, optou-se por utilizar o xileno.

Em contrapartida aos resultados de autoagregação, os dados de hidrofobicidade revelam maior variação com diferenças estatísticas significativas entre as espécies e entre as temperaturas analisadas. Observa-se que *S. boulardii*, *R. mucilaginosa* e o isolado i3 apresentaram diferença estatística significativa intraespécie nas suas hidrofobicidades quando analisadas em 23°C e 37°C. *Saccharomyces boulardii* que apresentou hidrofobicidade elevada em temperatura ambiente, passou a apresentar baixa hidrofobicidade em temperatura de 37°C. Em contrapar-

tida, *R. mucilaginosa* e o isolado i3 apresentaram um aumento significativo na hidrofobicidade quando cultivadas em 37°C. A baixa autoagregação e hidrofobicidade de *S. boulardii* em 37°C corrobora com o rápido clearance desta espécie após interrupção do consumo, com meia vida de aproximadamente 6 horas e clearance total em aproximadamente 3 a 4 dias [88]. Todavia, o aumento na hidrofobicidade de *R. mucilaginosa*, para valores intermediários na escala de referência, também corrobora com o perfil comensal desta levedura [89]. Um fator curioso à se observar nestas análises, tanto de autoagregação quanto de hidrofobicidade é que as análises de *S. boulardii* apresentaram os menores intervalos de desvio, o que pode ser explicado pelo maior processo de domesticação pelo qual estas leveduras passaram, em relação às leveduras selvagens ou semi-domesticadas encontradas em kombucha.

Ainda, observou-se diferença significativa entre a hidrofobicidade de *S. boulardii* em relação à *R. mucilaginosa* e o isolado i3 em temperatura de 23°C, bem como diferença significativa entre *S. boulardii* e o isolado i3 em temperatura de 37°C, como observado na figura 12. A origem deste aumento pode estar atrelada à mecanismos metabólicos de adaptação, corroborando com um dado que será melhor explorado nos tópicos subsequentes, uma vez que observou-se um aumento na taxa de crescimento do isolado i3 em 37°C nos testes de atividade enzimática de fosfolipase (Tabela 5). Por sua vez, *P. membranifaciens* não apresentou diferença significativa do controle *S. boulardii* e não apresentou diferença significativa entre as temperaturas de 23°C e 37°C, contudo, assim como o controle, apresentou leve redução na média do percentual de hidrofobicidade, acompanhando o comportamento da linhagem controle (Figura 12).

Figura 12 – Hidrofobicidade relativa de superfície das leveduras estudadas em 23°C e 37°C. *S. boulardii* foi utilizada como controle para este experimento. (*) Diferença estatística significativa entre as temperaturas; (#) diferença estatística significativa entre as espécies.



A variação da hidrofobicidade e autoagregação das leveduras está relacionada a muitos fatores. Hossain e colaboradores (2020) analisaram o potencial probiótico de uma nova linhagem de *S. boulardii* isolada de pasta de soja e identificaram que apresenta maior hidrofobicidade com clorofórmio (40,31%) quando comparado com n-hexadecano (23,11%) [90], este último apresentando valores muito semelhantes à hidrofobicidade com hexano identificado nos experimentos aqui relatados.

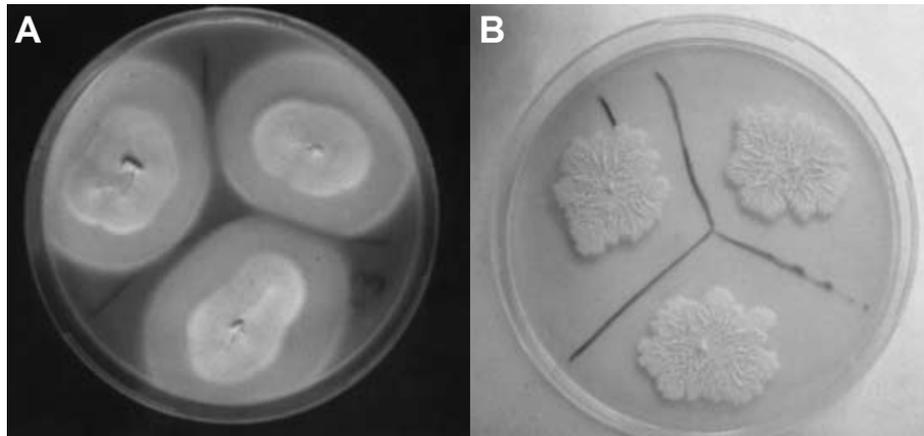
5.3.2 Atividade de proteases e fosfolipases

Um dos fatores mais relevantes sobre o potencial de patogenicidade de leveduras, são a produção de proteases e fosfolipases extracelulares. O papel destas enzimas é amplamente discutido no desenvolvimento de infecções provocadas pela levedura oportunista *Candida albicans* [75, 91, 92]. Proteases e fosfolipases no contexto de infecção fúngica possuem um papel significativo na capacidade que estes microrganismos possuem para invadir os tecidos do hospedeiro, uma vez que proteínas e fosfolipídeos são constituintes principais das membranas celulares, servindo como fonte de nutrientes para os fungos além de facilitar sua capacidade infectiva [75]. As proteases são capazes de quebrar as barreiras epiteliais e de mucosa do hospedeiro, como queratina e colágeno, ou até mesmo degradar anticorpos, componentes do sistema complemento e citocinas, possibilitando a fuga do sistema imune por parte destes microrganismos [93]. Em *C. albicans*, a produção de proteases aspárticas (Saps) é um dos fatores de virulência mais importantes a se considerar no contexto de patogenicidade [75]. Por sua vez, as fosfolipases secretadas pela forma infectante da *C. albicans* favorece a ruptura da membrana plasmática da célula do hospedeiro e permite que as hifas do fungo penetrem o citoplasma [94]. Dessarte, uma das formas como podemos avaliar a capacidade que as leveduras possuem em liberar proteases e fosfolipases extracelulares é avaliar seu crescimento em meios específicos, e posteriormente, observar a capacidade de invasão das colônias no meio, que pode ser observada pela formação de um halo abaixo da superfície do mesmo (Figuras 13 e 14).

Optou-se por analisar a nível comparativo a capacidade de atividade enzimática nas temperaturas de 23°C e 37°C, uma vez que a modificação na expressão destas enzimas, assim como a hidrofobicidade relativa de superfície e a autoagregação, podem estar relacionadas ou sofrer interferência de mecanismos adaptativos de tolerância ao estresse. Como controle, optou-se por usar a *S. boulardii* CNMC I-745, comercialmente veiculada como Floratil, uma vez que esta levedura apresenta ampla utilização como probiótico, segura e eficiente no tratamento de algumas disbioses causadas por uso de antibióticos [10]. Destarte, observou-se que a levedura controle não apresentou atividade de fosfolipase ou protease ($Pz/Prz = 1$) em nenhuma das temperaturas analisadas (figura 15). Ainda, apresentou crescimento da colônia apenas na temperatura de 23°C no meio para análise de protease, o que indica que esta levedura apresenta alguma atividade proteolítica em temperatura de 23°C, ainda que muito baixa, mas que se torna inviável em temperaturas de 37°C (figura 15). Fernández-Pacheco e colaboradores (2021) demonstraram que

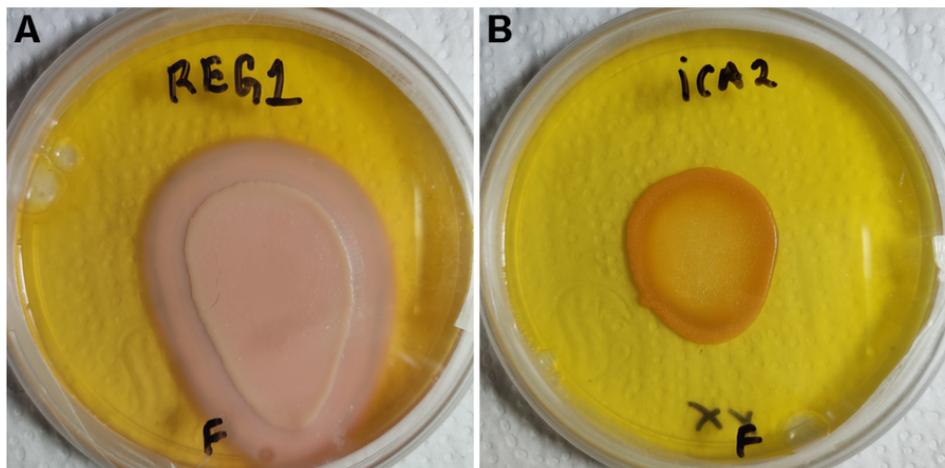
algumas linhagens de *S. boulardii* selvagens encontradas em alimentos apresentam atividade enzimática de protease em meio com soro bovino fetal em temperatura de 30°C, e até atividade de fosfolipases em menor frequência [95]. A ausência de atividade proteolítica e de fosfolipase, assim como a baixa hidrofobicidade relativa de superfície e autoagregação em 37°C diz muito sobre a capacidade de colonização desta linhagem, e corrobora com o curto tempo de meia-vida e wash-out desta levedura no trato gastrointestinal [10, 88].

Figura 13 – Fotografias da atividade enzimática de fosfolipases de *Candida* spp.. Observe em A, atividade de fosfolipase evidente, com a formação de halo de invasão no substrato (Pz = 0,470) e em B a colônia sem a presença de halo, não evidenciando a atividade enzimática de fosfolipase por este isolado (Pz = 1).



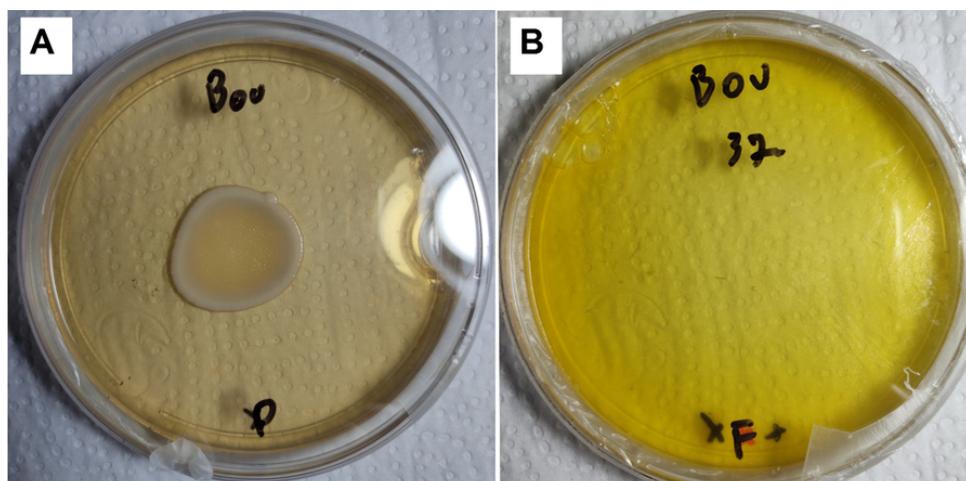
Kantarcioglu & Yücel, 2002 (modificada)

Figura 14 – Fotografias das *P. membranifaciens* (A) e *R. mucilaginosa* (B) durante experimento atividade enzimática de fosfolipases em 23°C. Observa-se o halo de precipitação formado por *P. membranifaciens* demonstrando uma atividade moderada (Pz = 0,640), enquanto *R. mucilaginosa* não apresenta o halo de precipitação (Pz = 1).



Fonte: do autor

Figura 15 – Fotografias das placas de cultura dos testes de atividade enzimática de protease (A) e atividade enzimática de fosfolipase (B) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *bouardii*. CNCM I-745 utilizada como controle.



do autor

Pichia membranifaciens apresentou as maiores atividades enzimáticas dentre os isolados estudados, apresentando Pz de 0,640 e Prz de 0,714 em 23°C, e alta capacidade de crescimento nos meios. Todavia, em 37°C observou-se que esta levedura não cresce no meio para teste de protease, e apesar de permanecer com alta capacidade de crescimento no meio de teste de fosfolipase, apresentou uma redução na atividade enzimática de fosfolipases (Pz = 0,873) (tabelas 5 e 6). Este último fenômeno pode indicar que os mecanismos de adaptação ao estresse influenciam na capacidade desta levedura em coletar nutrientes, um fenômeno que é observado em *S. cerevisiae*. Contudo, esta última apresenta um aumento na liberação de proteases com o aumento da temperatura, assim como diminuição na produção de ácidos e captação de oxigênio [96]. Por sua vez, a diminuição na capacidade de produzir proteases e fosfolipases de *P. membranifaciens* pode estar relacionada com a temperatura ótima de crescimento desta levedura, que deixa de apresentar crescimento após temperaturas de 40°C [97]. Ainda, pode-se supor que, o meio utilizado para o teste de atividade de fosfolipase, apresente fatores nutricionais que favoreçam a resistência de *P. membranifaciens* ao estresse térmico, sendo este fenômeno justificado pela manutenção do crescimento ótimo em extrapolar a zona inicial do inóculo (++) em ambas as temperaturas, apesar da diminuição considerável na atividade enzimática de fosfolipases na temperatura de 37°C (tabela 5).

Por sua vez, o isolado i3 não apresentou formação visível de colônias que possibilitassem a determinação de sua atividade enzimática de protease. Por ainda não ser identificada, apresenta-se uma dificuldade em compreender o comportamento desta levedura sob as condições estudadas. Dessarte, conclui-se que esta não apresentou atividade enzimática de proteases consistentes com o modelo do experimento. Contudo, no que tange a atividade de fosfolipase, observa-se que esta levedura apresenta atividade de fosfolipases em ambas temperaturas avaliadas, apresentando uma leve redução no valor Pz na temperatura de 37°C, que consiste de um aumento da atividade

enzimática e consistentemente corrobora com o aumento na sua taxa de crescimento no meio, onde passou a extrapolar a zona inicial do inóculo. Em consoante com seu aumento significativo na hidrofobicidade relativa de superfície, deve-se levar em consideração que esta levedura possa apresentar um caráter patogênico importante, e deve ser investigada com afincos em análises futuras. Entretanto, a presença de microrganismos potencialmente patogênicos em alimentos fermentados tradicionais não significa necessariamente que estes alimentos apresentem riscos à saúde, e este fenômeno é explicitado pela presença de um microbioma vasto e complexo, que possibilita uma diversificada rede de interações [98]. Dessarte, diversos estudos apontam a importância do *quorum sensing* e outros tipos de interação em microbiomas complexos e diversificados. *Candida albicans* é um perfeito exemplo sobre esta questão, sendo uma levedura dimórfica que pode apresentar-se na forma de broto ou na forma de fungo filamentosos, sendo este último a sua forma patogênica [21]. Os mecanismos envolvidos na modificação morfológica de *C. albicans* resultam de complexos fatores contextuais nos quais estas células estão inseridas, bem como os microrganismos presentes no meio e nos biofilmes dos quais esta levedura faz parte [99]. A presença de farnesol e triptofol produzidas por microrganismos, possuem a capacidade de inibir a mudança de morfotipo celular de *C. albicans* de broto para fungo filamentosos. Este fenômeno ocorre no trato gastrointestinal em harmonia com fatores imunes e modificações bioquímicas que favorecem que esta levedura seja um microrganismo comensal comum à muitas espécies [100–102].

Tabela 5 – Atividade enzimática de fosfolipases das leveduras estudadas.

Atividade de Fosfolipase						
Levedura	Pz	23°C		37°C		
		Atividade	Crescimento	Pz	Atividade	Crescimento
<i>S. boulardii</i>	1	-	-	1	-	-
<i>P. membranifaciens</i>	0,640	Moderada	++	0,873	baixa	++
<i>R. mucilaginososa</i>	1	-	+	1	-	-
i3	0,888	baixa	+	0,761	baixa	++

Tabela 6 – Atividade enzimática de proteases das leveduras estudadas.

Atividade de Protease						
Levedura	Prz	23°C		Pz	37°C	
		Atividade	Crescimento		Atividade	Crescimento
<i>S. boulardii</i>	1	-	+	1	-	-
<i>P. membranifacies</i>	0,714	baixa	++	1	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	1	-	+	1	-	-
i3	1	-	-	1	-	-

Dentre as leveduras analisadas, *R. mucilaginosa* apresentou as atividades enzimáticas mais próximas do controle *S. boulardii*, não apresentando atividade enzimática de protease ou fosfolipase em 23°C ou 37°C, assim como o controle. A diferença entre esta levedura e *S. boulardii* manifestou-se no crescimento, uma vez que *R. mucilaginosa* apresentou formação de colônia na temperatura de 23°C, mantendo-se na zona inicial do inóculo em ambos os desafios enzimáticos, o que pode ser observado na figura 14. Em contrapartida esta levedura não apresentou formação de colônia na temperatura de 37°C, indicando que por menor que fosse sua atividade de protease e fosfolipase em 23°C, estas capacidades reduziram-se a ponto de não permitir o crescimento celular na temperatura mais elevadas. Este fenômeno corrobora com o perfil comensal de *R. mucilaginosa*, que apresenta, de modo geral, baixa a nenhuma patogenicidade entre suas linhagens. Destarte, registros de fungemia causada por *R. mucilaginosa* manifestam-se como um patógeno oportunista, quando o indivíduo apresenta alguma fragilidade. Herbert Hof [103] indica que infecções por *Rhodotorula* spp. podem ocorrer em situações de comprometimento da parede intestinal, tal qual cirurgia abdominal, pacientes em estado grave de câncer após passar por terapia citostática e pacientes em caso crônico de AIDS, cirrose hepática ou doenças inflamatórias intestinais. Ainda, esta espécie pode causar patologias associadas ao uso de catéteres, uma vez que possuem excelente capacidade de formação de biofilme, inclusive em materiais hospitalares e implantes [103].

5.4 Análise metabólica das interações

Metabolômica é um campo que tem se tornado de suma importância para a área de ciência dos alimentos e nutrição. A identificação de moléculas produzidas por microrganismos oriundos ou presentes em alimentos é uma ferramenta potente que abre novas possibilidades de investigação. A análise de metabólitos presentes em condição de co-cultura pode indicar que tipos de interações beneficiaram a bactéria para manutenção de sua viabilidade por longos períodos. Especialmente quando sabe-se muito pouco sobre os metabólitos envolvidos

em interações microbianas [104]. Verificando o mapa da rede molecular, observam-se 132 nodos identificados entre os 4 grupos analisados, totalizando 92 conjuntos (figura 16). Algumas moléculas identificadas foram encontradas apenas em co-cultura, como fructosil-lisina, ácido 1,2,3,4-tetrahydroharmane-3-carboxílico, L-carnosina e tirosina-prolina. Entretanto, 91 dos nodos também foram identificados nas amostras onde a *B. lactis* foi cultivada em monocultura, como N-fructosil isoleucina, ácido láctico e L-triptofano. Este último ponto pode indicar que estas moléculas não necessariamente favorecem as interações, mas podem sugerir indícios de interações indiretas em que há beneficiamento por parte dos microrganismos presentes.

Figura 16 – Rede de interação molecular dos microrganismos estudados. As esferas indicam possíveis compostos encontrados por Q-TOF. As cores indicam em que grupos foram identificados tais compostos, sendo vermelho (HN019 + *P. membranifaciens*), verde (HN019 + *R. mucilaginosa*), azul (HN019 + i3) e laranja (HN019). Os números referem-se ao peso molecular de cada aduto.

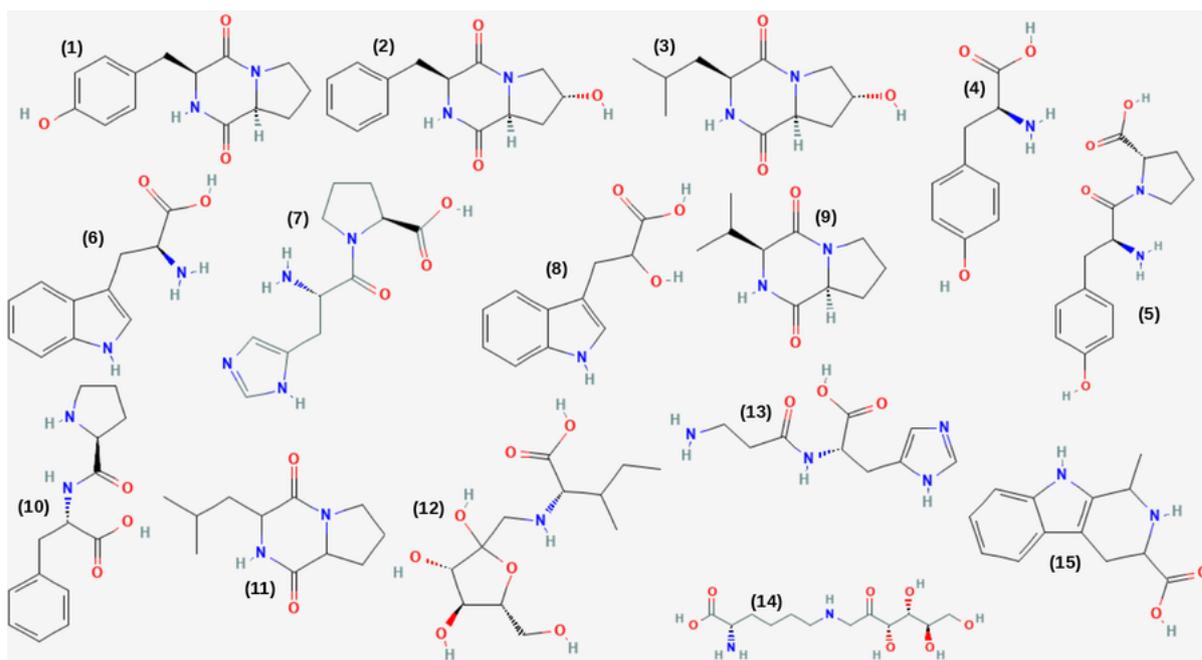


Fonte: do autor

Os compostos encontrados após os testes de interação estão listados na tabela 7. A tabela informa a massa do aduto encontrada por Q-TOF e a massa molecular sem o aduto, além da fórmula química e quais as amostras que tais compostos foram encontrados. As estruturas moleculares dos compostos estão presentes na figura 17. As amostras foram classificadas nos grupos G1 (HN019 + *P. membranifaciens*), G2 (HN019 + *R. mucilaginosa*), G3 (HN019 + i3) e

G4 (HN019). Os compostos encontrados no grupo G4 são aqueles produzidos pelas *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 em monocultura, e observando tais compostos, podemos observar alguns tipos de correlação. A maculosina, por exemplo, é uma toxina versátil produzida por fungos e bactérias que possui ação fitotóxica e bactericida e seus derivados também podem ter ação antifúngica [105–107]. Foi observado que este composto foi produzido pela HN019 e não foi alterado por ação de *P. membranifaciens* ou *R. mucilaginosa*, porém, a ausência deste composto no grupo G3 indica que possivelmente o isolado i3 inibe sua produção ou possui a capacidade de hidrolisar esta molécula. Ela é naturalmente utilizada por fungos fitopatogênicos e alguns fungos marinhos como mecanismo de defesa biológica, inibindo a ação da planta hospedeira ou de fitobactérias concorrentes [105, 107]. Contudo, algumas bactérias como *Lysobacter capsici* possuem a capacidade de produzir maculosina também como forma de proteção biológica [106]. Ainda, tirosina foi um composto encontrado em G4 que não foi encontrado em G1 e G2, indicando que estas leveduras podem ter consumido a tirosina secretada. É sabido que alguns fungos utilizados em alimentos fermentados, como *Aspergillus oryzae* e *Yarrowia lipolytica* possuem a capacidade de produzir L-dopamina a partir de tirosina [108]. A suplementação de tirosina em *Rhotorula* spp. apresenta influência na síntese de carotenoides, como o β -caroteno [109]. Ainda, Qian e colaboradores demonstraram que a tirosina participa de vias metabólicas importantes na atividade antioxidante de *R. mucilaginosa*, como álcool desidrogenases. Esse grupo de enzimas participa da interconversão de álcoois em aldeídos e cetonas, estando diretamente relacionado com respostas de defesa contra estresse oxidativo e contra ação de micotoxinas como patulina [110].

Figura 17 – Estrutura molecular de compostos encontrados por análise da rede de interação molecular. Compostos listados na Tabela 7.



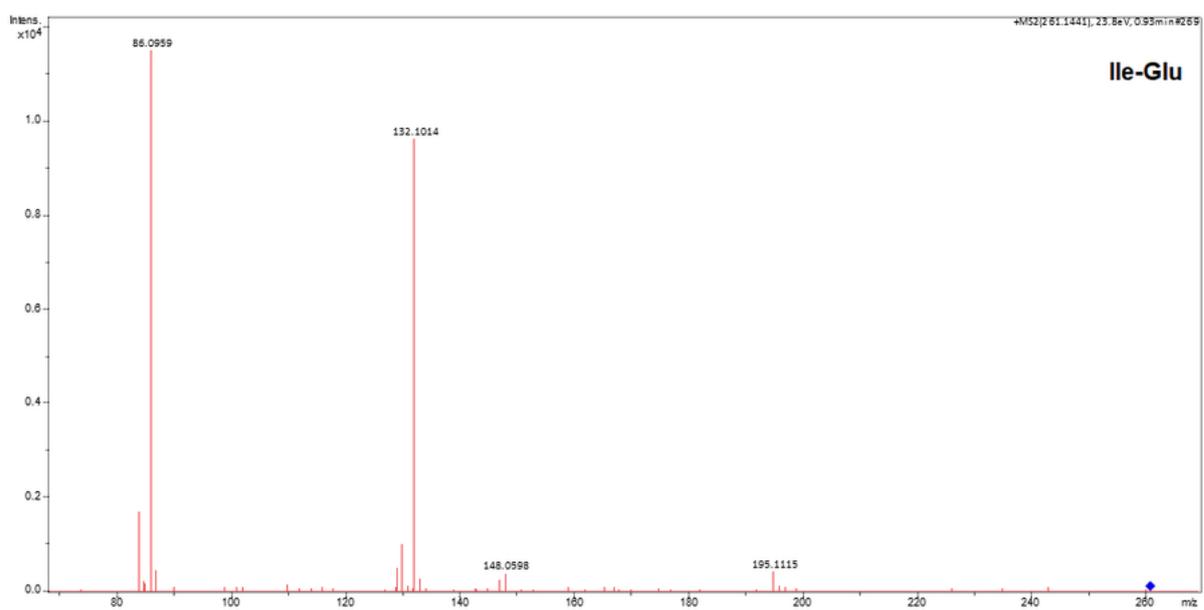
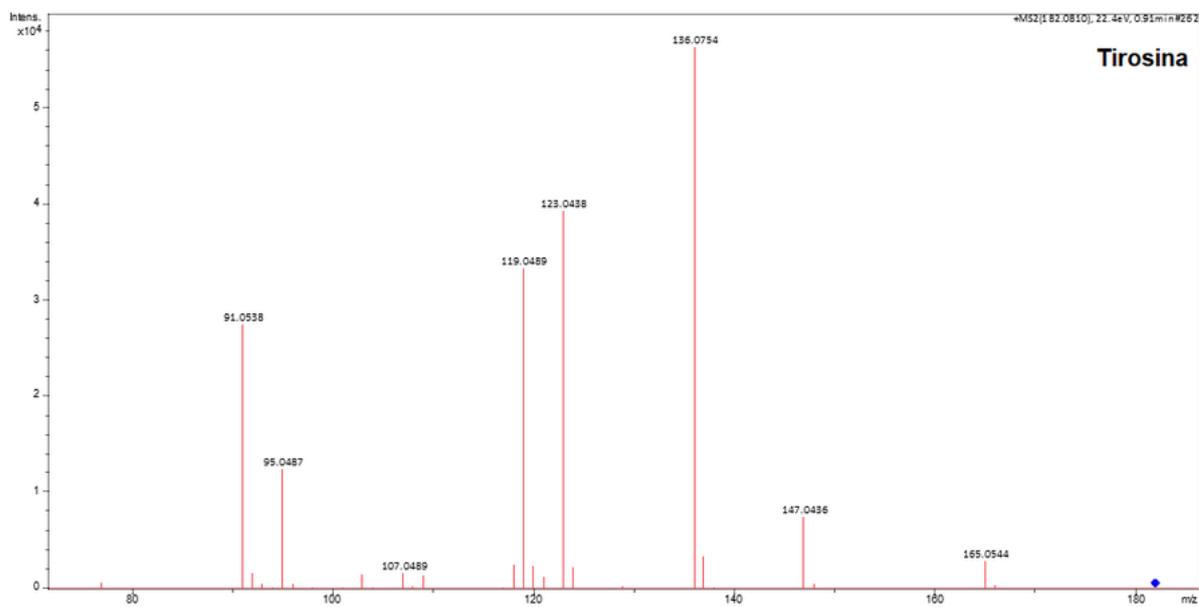
Fonte: do autor

Tabela 7 – Compostos encontrados através de QTOF, após dinâmica de interação entre a bactéria e as leveduras. G1 (HN019 + *P. membranifaciens*), G2 (HN019 + *R. mucilaginosa*), G3 (HN019 + i3) e G4 (HN019).

Número	Composto	Massa aduto	Massa molecular	Fórmula química	Grupos
1	Maculosina	261,109 (+H)	260,29	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	G1, G2, G4
2	Ciclo (L-Fenilalanina-4-hidroxi-Prolina)	261,109 (+H)	260,288	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	G1,G2,G3,G4
3	Ciclo (L-Leucina-4-hidroxi-Prolina)	227,126(+H)	226,27	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	G1, G2, G3, G4
4	Tirosina	182,071(+H)	181,19	C ₉ H ₁₁ NO ₃	G3, G4
5	Tirosina-Prolina	279,119 (+H)	278,30	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	G2
6	L-Triptofano	205,086 (+H)	204,23	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	G1, G2, G3, G4
7	Histidil-Prolina	235,106 (+H-H ₂ O)	252,270	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₃	G1,G2,G4
8	Ácido 3-indol-lático	188,06 (+H-H ₂ O)	205,21	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	G1,G2,G3,G4
9	Ciclo (Prolina-Valina)	197,117 (+H)	196,25	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	G1,G2,G3,G4
10	H-Prolina-Fenilalanina-OH	245,115 (+H-H ₂ O)	262,30	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₃	G1,G2,G3,G4
11	Ciclo (L-Leucina-L-Prolina)	211,133 (+H)	210,273	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	G1,G2,G3,G4
12	N-Fructosil-Isoleucina	294,138 (+H)	293,316	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	G1,G2,G3,G4
13	L-Carnosina	227,101 (+H)	226,23	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	G1,G3
14	Fructosil-lisina	309,148 (+H)	308,331	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₇	G2
15	Ácido 1,2,3,4-Tetrahydroharmane-3-Carboxílico	231,101 (+H)	230,26	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	G2

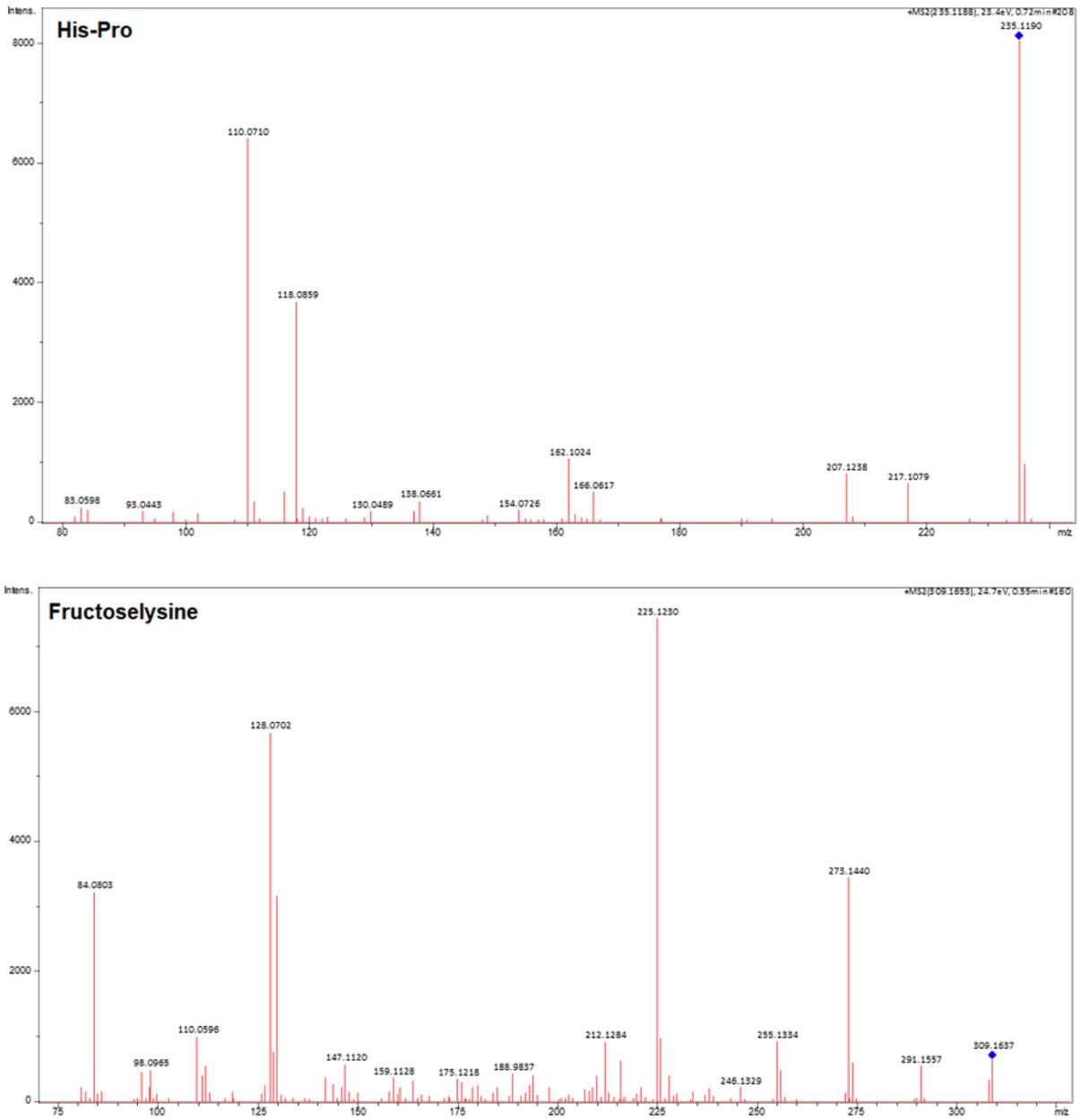
Dipeptídeos cíclicos são comumente produzidos e secretados por fungos e bactérias como mecanismo de defesa e como parte do *quorum sensing*. Este último mecanismo é essencialmente importante em alimentos fermentados e comunidades microbianas complexas pois estão atrelados a mecanismos de redução de fatores de virulência [111]. Estes mecanismos atrelados aos dipeptídeos cíclicos são especialmente relatados em dipeptídeos contendo prolina como um de seus monômeros, o que inclui ciclo (L-tirosina-L-prolina), encontrada no grupo G2, ciclo (L-prolina-L-valina), ciclo (L-fenilalanina-4-hidroxi-prolina), ciclo (L-leucina-4-hidroxi-prolina) e ciclo (L-leucina-L-prolina) encontrados em todos os grupos, que possuem ação anti-bacteriana [111]. Estes dipeptídeos com prolina são encontrados em kimchi, no qual também são reportados como ferramentas microbianas importantes para defesa e *quorum sensing* de algumas bactérias como *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp [112]. Por sua vez, a presença de ácido 1,2,3,4-tetrahidroharmane-3-carboxílico no grupo G2 pode ter beneficiado a HN019, sendo um alcaloide de alto poder antioxidante, principalmente contra ação de H₂O₂, como demonstrado por Lamchouri e colaboradores (2022) [113]. Esta ação pode ser de extrema importância para *Bifidobacterium* spp., pois na presença de oxigênio, estas produzem grande quantidade de H₂O₂ [78].

Figura 18 – Espectros de fragmentação de tirosina e isoleucina-glutamato.



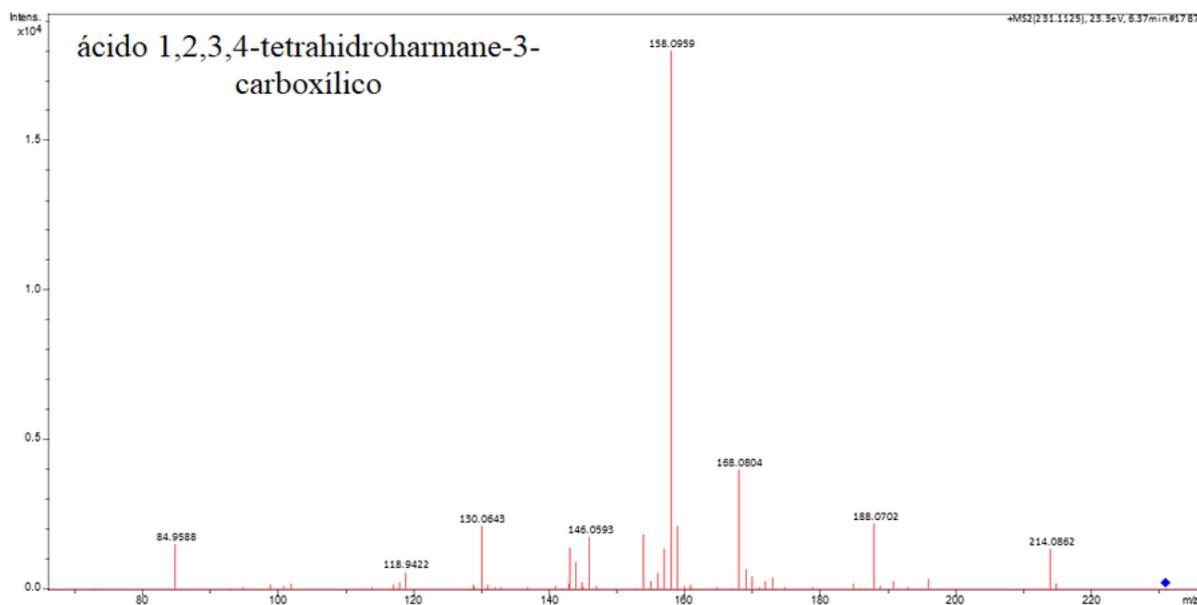
Fonte: do autor

Figura 19 – Espectros de fragmentação de histidina-prolina e fructosil-lisina.



Fonte: do autor

Figura 20 – Espectro de fragmentação de ácido 1,2,3,4-tetrahydroharmane-3-carboxílico.



Fonte: do autor

5.5 Potencial biotecnológico

Os mecanismos de interação microbiana têm ganhado cada vez mais evidência acadêmica e atualmente compreendemos o porquê. Com o aumento do interesse global por estudos sobre microbiota e microbioma, observou-se que a interrelação entre microrganismos é um fator chave para a compreensão de diversos mecanismos regulatórios em sistemas biológicos complexos [16, 114]. Os mecanismos de interação entre leveduras e bactérias podem ocorrer por competição, mutualismo, amensalismo, comensalismo, parasitismo e simbiose, contudo, estendem-se entre fenômenos como antibiose, cross-feeding, endosimbiose facultativa, microfagia, transferência horizontal de genes, comunicação semioquímica, entre outros [114]. Consequências dessas interações são o aumento da versatilidade, por maior complexidade e variedade genética do microbioma, e aumento na robustez microbiana com o aprimoramento de mecanismos de tolerância ao estresse [62]. Espécies de *Rhodotorulla* são reportadas em diversos tipos de ecossistemas, são leveduras mesofílicas, mas podem também ser encontradas em regiões antárticas e toleram bem uma gama de condições ambientais [115]. Também é uma levedura amplamente reportada em néctar de flores, demonstrando ser uma levedura com importante capacidade osmotolerante, o que explica sua maior frequência nos primeiros momentos da fermentação [114]. Espécies deste gênero não realizam fermentação, e a presença desta em todas as amostras de kombucha analisadas neste trabalho, bem como outras amostras reportadas na literatura, sugerem que esta levedura possui um papel importante na manutenção do microbioma da bebida, mas, também abre possibilidade de que este microrganismo seja oportunista em algumas condições [45, 89]. Na kombucha, o fenômeno mais provável, é que esta levedura colabore com a dinâmica microbiana ao longo do processo de fermentação, destarte que o sistema simbiótico da kombucha é capaz

de inibir ou combater o crescimento de microrganismos que não colaboram para o equilíbrio do mesmo [43]. Ademais, o beneficiamento da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 pode ser um indicativo de que esta levedura é capaz de apresentar interações vantajosas com diversos tipos de microrganismos e isso pode ser um fator importante considerando que *Rhodotorula* spp. são frequentemente encontradas em água, solo, plantas e animais e não é comumente associada com fungemias humanas, apesar de haverem ocorrências clínicas [89]. No ramo de alimentos, *Rhodotorula* é considerada um microrganismo deteriorante, associada principalmente com alimentos lácteos, cárneos, sucos e alguns vegetais. Ela é capaz de crescer em ambientes ácidos com pH próximo de 2,2, permitindo assim seu crescimento na kombucha. Nada obstante, espécies de *Rhodotorula* ainda podem ser utilizadas como ferramenta biotecnológica de controle biológico de outros fungos deteriorantes de alimentos e bebidas, como *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*, sendo este um fenômeno observado também em *R. mucilaginosa*, nesses casos considerado um fungicida não sintético [89], e seu papel no processo fermentativo da kombucha pode estar associado à inibição de outros microrganismos deteriorantes. Ainda, *R. mucilaginosa* pode apresentar potencialmente diversos efeitos benéficos à saúde, uma vez que produzem lipídeos, carotenoides, folato, proteínas e enzimas importantes [103].

De fato, leveduras comensais como *R. mucilaginosa* e *C. albicans* também colaboram para a dinâmica microbiana intestinal, e as interações que estes microrganismos realizam são de suma importância para a manutenção da homeostase. Linhagens de *Staphylococcus aureus* possuem a capacidade de aderir-se à forma de hifa da *C. albicans*, mas não à sua forma de levedura. Esta interação de coagregação inter-reino está relacionada com a expressão da adesina/invasina Als3, expressa pelo fungo apenas em sua forma filamentosa. Destarte, a bactéria aproveita-se deste mecanismo secretando fatores de crescimento que estimulam a conversão morfológica do fungo, promovendo a formação de biofilmes, estimulando uma maior resistência de ambos microrganismos [116]. Als3 é uma adesina/invasina de amplo espectro que atua na interação fúngica com células epiteliais orais, película salivar, fibronectina, fibrinogênio, colágeno do tipo IV, células endoteliais e laminina [117]. Canabarro e colaboradores [118] reportaram associação de *Rhodotorula* spp. com *C. albicans* em pacientes com periodontite subgingival crônica grave, bem como outras espécies de leveduras, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. A capacidade de associação entre tais leveduras na formação de biofilme sugere uma participação direta de Als3. Todavia, na maior parte dos casos, é evolutivamente mais vantajoso para as leveduras manterem sua posição como microrganismo comensal. Tendo isso em visto, *C. albicans* pode prevenir sua mudança morfológica de broto para filamento através da secreção de farnesol, um componente importante no *quorum sensing* fúngico, que conseqüentemente atua como agente antibacteriano, inibindo a fixação de *S. aureus* [116]. Dessarte, ambas as formas de broto e filamento de *C. albicans* podem ser identificadas no trato gastrointestinal, e não apenas as interações entre os microrganismos são responsáveis por este fenômeno. O sistema imune do hospedeiro também é responsável pela manutenção da condição de comensalismo das leveduras, uma vez que imunoglobulinas IgA anti-*C. albicans* apresentam maior afinidade e

força de ligação à forma filamentosa do fungo, apresentando Als3 como principal alvo [101, 102]. Por sua vez, um fenômeno semelhante deve ocorrer na manutenção de *R. mucilaginosa* como microrganismo comensal na microbiota humana. A não expressão de proteases e fosfolipases de maneira significativa em temperatura de 37°C, pode ser um fator importante para não engatilhar uma resposta imune do hospedeiro. Sabe-se ainda que *Rhodotorula* spp. não apresentam 1-3-β-glucanas em sua parede celular, resultando na não ativação do receptor de dectina-1 (CL7C7A) por macrófagos [103]. Este receptor ocorre principalmente em células do sistema imune inato e atua no reconhecimento de padrões moleculares (PRR), como receptores do tipo Toll, sendo responsáveis principalmente pelas respostas imunes antifúngicas. Ainda, é sabido que a ausência ou ineficácia deste receptor resulta no aumento da susceptibilidade às infecções fúngicas bem como uma piora no prognóstico de fungemias [119]. Por fim, de fato *R. mucilaginosa*, como microrganismo comensal, apresenta um papel fundamental na homeostase do organismo. É reportado que a depleção de *R. mucilaginosa*, assim como outros fungos comensais, estão relacionados com o aumento da gravidade de casos de COVID-19. Curiosamente, observou-se uma correlação inversa significativa entre a quantidade de *R. mucilaginosa* no trato gastrointestinal e a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA) no sangue, o principal alvo da proteína SPIKE do vírus SARS-COV-2 para entrada nas células hospedeiras [101].

A kombucha apresenta uma variedade considerável de microrganismos, especialmente no que se diz respeito à biodiversidade de leveduras, dentre as leveduras mais comumente encontradas, reportam-se os gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* [40, 41, 44–46]. Entretanto, tais gêneros assim como *Pichia*, são importantes deteriorantes de vinhos, não sendo diferente do caso de *Pichia membranifaciens* [120]. Esta espécie foi detectada na kombucha k3, e apresentou uma excelente manutenção da viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 após co-cultura. *Pichia membranifaciens* é uma levedura capaz de formar películas na superfície de contato líquido-ar durante a produção do vinho e outras bebidas, assim como espécies de *Brettanomyces/Dekkera* [120, 121]. Na kombucha, é esperado que estas participem, em parte, do processo de formação do SCOBY. Esta característica pode ser importante para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios ou pouco tolerantes a aerobiose como a HN019, uma vez que pode ocorrer redução das trocas gasosas na superfície ar-líquido, contudo, tal proposição deve ser investigada. Ademais, outros alimentos fermentados tradicionais como kefir, kimchi e chucrute podem ser utilizados como fonte de microrganismos para novos usos biotecnológicos, entretanto, seu potencial patogênico ainda deve ser ponderado, pois mesmo que estes microrganismos possam ser seguros se consumidos na matriz alimentar fermentada, estes podem apresentar riscos se mal utilizados. Gut e colaboradores (2019) encontraram leveduras *Saccharomyces* spp. e *Kluyveromyces* spp. em kefir, das quais, apresentaram atividade proteolítica moderada e baixa respectivamente. Ainda, o mesmo trabalho ressaltou que a hidrofobicidade relativa de superfície explicitou grande variação entre as leveduras isoladas, de 15,58% a 88,75%. De modo contrário, a autoagregação apresentou uma variação mais sutil, de 30,59% a 42,86% [73]. Os dados de hidrofobicidade e autoagregação apresentam uma certa

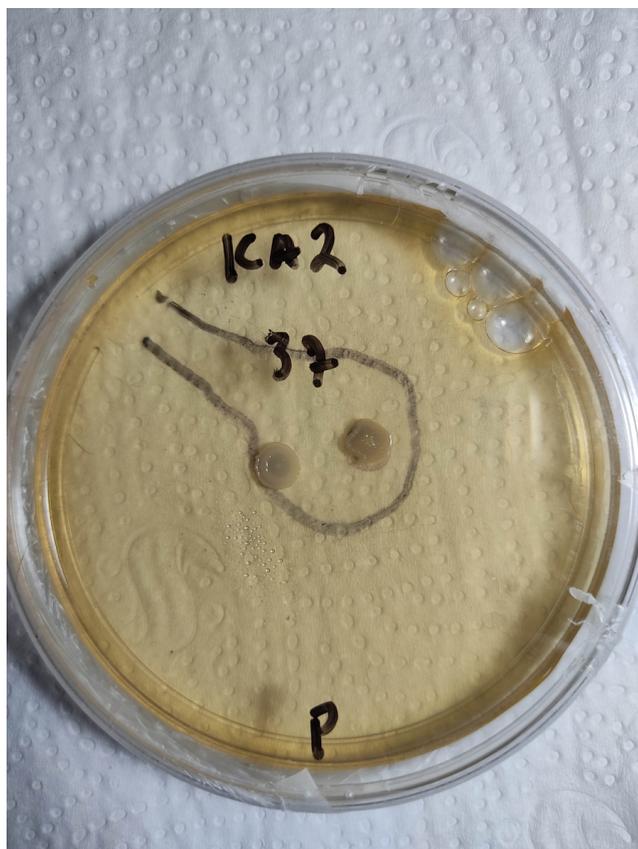
semelhança com os dados encontrados nas leveduras de kombucha, onde a variação na hidrofobicidade foi significativamente maior entre espécies e até mesmo intraespécie quando analisadas em diferentes temperaturas, por sua vez, não foi observada grande variação na autoagregação das leveduras, com exceção de *P. membranifaciens*. Esta ocorrência pode indicar também que a hidrofobicidade apresenta um papel importante na sobrevivência de leveduras oriundas de alimentos. Quando comparamos com *Candida* spp., observa-se uma variação menor na hidrofobicidade, apesar deste grupo ser parafilético. Dabiri e colaboradores (2018) observaram que a hidrofobicidade entre as espécies de *Candida* analisadas variou de 10,24% \pm 3,46% para *Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), espécie encontrada geralmente em alimentos e em ambiente natural, e 42,97% \pm 16,10% para *Candida parapsilosis*, espécie usualmente patogênica. Corroborando, o mesmo estudo identificou a não atividade enzimática de proteases e fosfolipases para *C. guilliermondii* e atividade enzimática baixa para *C. parapsilosis* para ambas as enzimas. Contudo, vale ressaltar que todas as linhagens analisadas no trabalho de Dabiri e colaboradores foram isoladas em contexto clínico de suspeitas de candidíases [92].

Uma forma inusitada e pouco estudada de interação entre leveduras e bactérias, que também pode explicar a sobrevivência da *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 em aerobiose, é a evidência de endossimbiose facultativa. Evidências científicas demonstram que bactérias evoluíram concomitantemente às células eucariotas para que se fosse possível o estabelecimento de relações endossimbióticas temporárias e facultativas, ou seja, bactérias podem ser acomodadas no interior de leveduras, mais precisamente em seus vacúolos, como demonstrado por Heydari e colaboradores (2020) [122]. Esta categoria de interação entre procariotos e eucariotos é conhecida, sendo seu exemplo mais famoso e discutido, a origem de organelas como mitocôndrias e plastídeos. Ademais, a maneira como essa relação é estabelecida, pode resultar em interações de mutualismo, amensalismo ou parasitismo [122, 123]. O vacúolo das leveduras é uma organela especializada que pode ocupar a maior parte do compartimento citoplasmático celular, podendo ser facilmente observada por microscopia óptica. Este apresenta diversas funções como armazenamento de nutrientes e outros compostos, bem como faz parte do aparelho celular de digestão e autofagia para recuperação de componentes intracelulares [124]. Leveduras podem sequestrar bactérias em situações de estresse, aumentando a sobrevivência das bactérias e suprindo-as com nutrientes até que as condições extracelulares sejam favoráveis para o crescimento de ambas [125]. Este fenômeno ainda possibilita que as leveduras filhas também propaguem bactérias em seus vacúolos mesmo após brotamento da célula mãe e sugere também que este mecanismo seja um importante sistema de entrega de bactérias, advindas de alimentos fermentados e probióticos, no intestino [122, 125]. A endossimbiose facultativa pode ser induzida pelo fungo, o qual pode armazenar a bactéria até que haja necessidade de sua liberação no meio, para que a bactéria possa suprir uma desvantagem metabólica de seu hospedeiro, sendo esse sistema denominado de “*bacterial farming*” [126]. Por outro lado, a endossimbiose facultativa pode ser induzida pela bactéria, dependendo de síntese de glucanases que possibilitem sua entrada através da parede celular da levedura [122].

Dada a complexidade ecológica em alimentos fermentados tradicionais, é esperado que

o fenômeno de endossimbiose facultativa ocorra. Algumas colônias de leveduras isoladas de kombucha no decorrer deste trabalho, passaram a apresentar pequenas colônias de características morfológicas distintas dentro da região da colônia original após muito tempo de cultura em 23°C, colônias estas geralmente esquecidas para descarte. Estas colônias menores usualmente surgiam em regiões onde as colônias iniciais eram mais velhas. Além disso, esse fenômeno foi observado em uma das placas dos testes preliminares de atividade enzimática de protease, para a levedura *R. mucilaginosa*, que não apresentou crescimento em 37°C, mas que a partir do 4º dia de cultura, apresentou 2 colônias sem coloração rosa ou laranja (característica de *Rhodotorula* spp.) (figura 21), e que não apresentavam aspecto de levedura sob microscópio. Dessarte, supõe-se que estas colônias sejam bactérias que estavam armazenadas em algumas células de levedura e conseguiram crescer no meio, uma vez que as leveduras passaram por situação de estresse celular. Entretanto, não foi possível identificar qual o microrganismo. Dessarte, estes fenômenos à princípio foram considerados como contaminação das culturas até que foi encontrada na literatura científica a possibilidade da endossimbiose facultativa estar ocorrendo, e que alguns grupos de pesquisa depararam-se com fenômenos semelhantes. Assim, diversas técnicas foram utilizadas até que as leveduras pudessem ser cultivadas de maneira axênica, quando não mais foi possível identificar o surgimento das culturas morfolologicamente distintas nas placas de cultura das leveduras. Algumas *Bifidobacterium* spp., como *B. longum*, *B. infantis* e *B. adolescentis* apresentam exoglucanases, sendo um indicativo da capacidade destas bactérias em induzir endossimbiose com leveduras, apesar deste fenômeno ainda não ter sido reportado na literatura até o momento da escrita desta dissertação [127, 128]. Ainda, ampla gama de registros científicos demonstram que β -glucanas possuem efeito prebiótico em diferentes espécies de *Bifidobacterium* spp., aumentando sua resistência à estresse celular, também sendo aprovadas pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) como um componente alimentar [127–130]. Fator este que também pode contribuir para a manutenção destas bactérias em co-cultura com a leveduras. Ademais, outros fatores podem ser responsáveis pela manutenção da sobrevivência das bactérias, como a liberação de fatores de sobrevivência, liberação de aminoácidos e outros compostos nitrogenados no meio e quebra de substâncias tóxicas para as células [15, 16, 65].

Figura 21 – Fotografia de colônias de microrganismos que surgiram no local do inóculo de *R. mucilaginosa* após esta não crescer no teste de atividade enzimática de protease. A área marcada refere-se à zona do inóculo de *R. mucilaginosa* no meio.



Fonte: do autor

6 Conclusões

Observa-se que as kombuchas, apesar de diversificadas em origem, possuem alguns microrganismos em comum, contudo, a variação de microrganismos dificulta a padronização do processo fermentativo. Ademais, a predominância de diferentes microrganismos ao longo do tempo de fermentação resulta em diferenças cruciais no processo. A presença de *Rhodotorula mucilaginosa* em todos os kombuchas estudados e sua excelente interação com a bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 nas condições de ensaio, demonstra que essa levedura possui um potencial importante para possibilitar e consolidar a permanência desta bactéria em uma kombucha, potencialmente resultando em uma bebida fermentada probiótica. Ainda, outras leveduras como *Pichia membranifaciens* podem ser alvo de estudos sobre sua potencial utilização na construção e manutenção de um kombucha probiótico ou sobre seu uso como adjuvante em formulações probióticas com a linhagem HN019. A levedura *R. mucilaginosa* demonstrou características de autoagregação, hidrofobicidade relativa de superfície, atividade enzimática de proteases e fosfolipases sempre próximas do controle *S. boulardii*. Ainda, sua baixa patogenicidade registrada na literatura científica demonstra que esta levedura apresenta um importante potencial biotecnológico para dispor de microrganismos probióticos, dado sua característica cosmopolita, seu comportamento comensal e sua vasta capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais que estes microrganismos são encontrados. Ainda, através de análise metabólica, observou-se um papel importante de dipeptídeos, principalmente compostos de prolina. Tal achado sugere que as interações entre *Bifidobacterium* e leveduras estão associadas à principalmente controle biológico e *quorum sensing*.

Assim, dois pontos se fazem de suma importância na continuidade deste trabalho. Primeiramente, deve-se focar na viabilização da inserção de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, seja durante ou pós-fermentação, em uma kombucha e monitorar a viabilidade desta espécie ao longo do tempo de fermentação e armazenamento. A presença de *Rhodotorula mucilaginosa* se faz importante nesse momento. Segundamente, deve-se monitorar as relações microbianas entre HN019 e outros microrganismos presentes na rede. O enfoque em dipeptídeos pode ser uma estratégia importante, uma vez que estes compostos foram encontrados na monocultura de HN019 e pode dar indícios de que a regulação da manutenção da viabilidade da bactéria probiótica possa também se regulada por ela mesma, influenciando o metabolismo secundário das leveduras.

7 Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Referências

- 1 PONOMAROVA, O.; PATIL, K. R. Metabolic interactions on microbial communities: untangling the Gordian knot. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 37 – 44, 2015.
- 2 ROWLAND, I.; GIBSON, G.; HEINKEN, A.; SCOTT, K.; SWANN, J.; THIELE, I.; TUOHY, K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 1 – 24, Abril 2018.
- 3 CHENG, D.; SONG, J.; XIE, M.; SONG, D. The bidirectional relationship between host physiology and microbiota and health benefits of probiotics: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 426 – 435, 2019.
- 4 MARCHESI, J. R.; ADAMS, D. H.; FAVA, F.; HERMES, G. D. A.; HIRSCHFIELD, G. M.; HOLD, G.; QURASHI, M. N.; KINROSS, J.; SMIDT, H.; TUOHY, K. M.; THOMAS, L. V.; ZOETENDAL, E. G.; HART, A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330 – 339, Fevereiro 2016.
- 5 KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927 – 939, Fevereiro 2018.
- 6 HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506 – 514, Agosto 2014.
- 7 SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1 – 16, janeiro 2006.
- 8 EJTAHED, H.; ANGOORANI, P.; SOROUSH, A.; ATLASI, R.; HASANI-RANJBAR, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; LARIJANI, B. Probiotics supplementation for the obesity management; A systematic review of animal studies and clinical trials. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 228 – 242, Janeiro 2019.
- 9 TONUCCI, L. B.; SANTOS, K. M. O. dos; OLIVEIRA, L. L. de; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. Clinical Application of Probiotics in Diabetes Mellitus: Therapeutics and New Perspectives. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 85 – 92, Fevereiro 2017.
- 10 KELESIDIS, T.; POTHOUKAKIS, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 5, n. 2, p. 111 – 125, março 2012.
- 11 SUEZ, J.; ZMORA, N.; SEGAL, E.; ELINAV, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, v. 25, p. 716 – 729, Maio 2019.
- 12 HAGE, R. E.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; WIELE, T. V. de. Emerging Trends in “Smart Probiotics”: Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1 – 11, Setembro 2017.
- 13 GILBERT, J. A.; LYNCH, S. V. Community ecology as a framework for human microbiome research. **Nature Medicine**, v. 25, p. 884 – 889, Maio 2019.

- 14 VOROB'EVA, L. I.; KHODZHAEV, E. Y.; ROGOZHIN, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Characterization of Extracellular Yeast Peptide Factors and Their Stress-Protective Effect on Probiotic Lactic Acid Bacteria. **Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 411 – 419, 2016. ISSN 0026-2617.
- 15 PONOMAROVA, O.; GABRIELLI, N.; SÉVIN, D. C.; MÜLLEDER, M.; ZIRNGIBL, K.; BULYHA, K.; ANDREJEV, S.; KAFKIA, E.; TYPAS, A.; SAUER, U.; RALSER, M.; PATIL, K. R. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. **Cell Systems**, v. 5, p. 345 – 357, outubro 2017.
- 16 ZOUMPOURTIKOUDI, V.; PYRGELIS, N.; CHATZIGRIGORIOU, M.; TASAKIS, R. N.; TOURAKI, M. Interactions among yeast and probiotic bacteria enhance probiotic properties and metabolism offering augmented protection to *Artemia franciscana* against *Vibrio anguillarum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 497 – 506, dezembro 2018.
- 17 METCHNIKOFF, E. **Essais Optimistes**. Paris: A. Maloine, 1907. 438 p.
- 18 CHANG, C. J.; LIN, T. L.; TSAI, Y. L.; WU, T. R.; LAI, W. F.; LU, C. C.; LAI, H. C. Next generation probiotics in disease amelioration. **Journal of Food and Drug Analysis**, Fevereiro 2019.
- 19 SPEERS, A.; FORBES, J. Yeast: an overview. In: SPEERS, A.; FORBES, J. (ed.). **Brewing Microbiology**. [S.l.]: Elsevier, 2015. cap. 1. ISBN 978-1-78242-331-7.
- 20 PILAR PÉREZ; CORTÉS, J. C. G.; CANSADO, J.; RIBAS, J. C. Fission yeast cell wall biosynthesis and cell integrity signalling. **The Cell Surface**, v. 4, p. 1 – 9, Dezembro 2018.
- 21 WITCHLEY, J. N.; PENUMETCHA, P.; ABON, N. V.; WOOLFORD, C. A.; MITCHELL, A. P.; NOBLE, S. M. *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 3, p. 432 – 443, Março 2019.
- 22 DYKE, M. C. C. V.; TEIXEIRA, M. M.; BARKER, B. M. Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 55 – 63, Dezembro 2019.
- 23 BROWN, A. J. P.; LARCOMBE, D. E.; PRADHAN, A. Thoughts on the evolution of Core Environmental Responses in yeasts. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 475 – 481, Maio 2020.
- 24 STAMENOVA, R.; DIMITROV, M.; STOYCHEVA, T.; PESHEVA, M.; VENKOV, P.; TSVETKOV, T. Transposition of *Saccharomyces cerevisiae* Ty1 retrotransposon is activated by improper cryopreservation. **Cryobiology**, v. 56, p. 241 – 247, 2008.
- 25 SELMECKI, A. M.; MARUVKA, Y. E.; RICHMOND, P. A.; GUILLET, M.; SHORESH, N.; SORENSON, A. L.; DE, S.; KISHONY, R.; MICHOR, F.; DOWELL, R.; PELLMAN, D. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. **Nature**, v. 519, p. 349 – 352, março 2015.
- 26 VOORDECKERS, K.; KOMINEK, J.; DAS, A.; ESPINOSA-CANTÚ, A.; MAEYER, D. D.; ARSLAN, A.; PEE, M. V.; ZANDE, E. van der; MEERT, W.; YANG, Y.; ZHU, B.; MARCHAL, K.; DELUNA, A.; NOORT, V. V.; JELIER, R.; VERSTREPEN, K. J. Adaptation to high ethanol reveals complex evolutionary pathways. **PLOS Genetics**, p. 1 – 31, novembro 2015.

- 27 BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; YURKOV, A. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? **Yeast**, v. 35, n. 8, p. 487 – 497, Março 2018.
- 28 DOMINY, N. J. Ferment in the family tree. **PNAS**, v. 112, n. 2, p. 308 – 309, Janeiro 2015.
- 29 LIU, L.; WANG, J.; ROSENBERG, D.; ZHAO, H.; LENGYEL, G.; NADEL, D. Fermented beverage and food storage in 13,000y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 21, p. 783 – 793, Outubro 2018.
- 30 CARRIGAN, M. A.; URYASEV, O.; FRYE, C. B.; ECKMAN, B. L.; MYERS, C. R.; HURLEY, T. D.; BENNER, S. A. Hominids adapted to metabolize ethanol long before human-directed fermentation. **PNAS**, v. 112, n. 2, p. 458 – 463, Janeiro 2015.
- 31 BRYANT, K.; HANSEN, C.; HECHT, E. Fermentation Technology as a Driver of Human Brain Expansion. **Preprints**, doi: 10.20944/preprints202010.0135.v1, Outubro 2020.
- 32 DERTLI, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 151 – 157, 2017.
- 33 ANAL, A. K.; PERPETUINI, G.; PETCHKONGKAEW, A.; TAN, R.; AVALLONE, S.; TOFALO, R.; NGUYEN, H. V.; CHU-KY, S.; HO, P. H.; PHAN, T. T.; WACHÉ, Y. Food safety risks in traditional fermented food from South-East Asia. **Food Control**, v. 109, Março 2020.
- 34 RHEE, S. J.; LEE, J.; LEE, C. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1 – 13, Agosto 2011.
- 35 ROOS, J. D.; VUYST, L. D. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 115 – 119, Fevereiro 2018.
- 36 DUAN, S.; HAN, P.; WANG, Q.; LIU, W.; SHI, J.; LI, K.; ZHANG, X.; BAI, F. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. **Nature Communications**, v. 9, p. 1 – 13, Julho 2018.
- 37 GALLONE, B.; MERTENS, S.; GORDON, J. L.; MAERE, S.; VERSTREPEN, K. J.; STEENSEIS, J. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeast. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 49, p. 148 – 155, 2018.
- 38 GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T.; BAELE, G.; MAERE, S.; VERSTREPEN, K. J.; SORIAGA, L.; SAELS, V.; HERRERA-MALAYER, B.; MERLEVEDE, A.; RONCORONI, M.; VOORDECKERS, K.; MIRAGLIA, L.; TEILING, C.; STEFFY, B.; TAYLOR, M.; SCHWARTZ, A.; RICHARDSON, T.; WHITE, C. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. **Cell**, v. 166, p. 1397 – 1410, setembro 2006.
- 39 KABAB, B.; DOBSON, A. D. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 248 – 260, Março 2011.
- 40 CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; RATANGACHHUI. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63 – 72, Março 2016.

- 41 MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal composition of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171 – 178, Abril 2014.
- 42 SOUZA, C. de A.; OLIVEIRA, Í. A. C. L. de; ROLIM, V. A. de O.; BOGSAN, C. S. B. Traditional Fermented Foods as an Adjuvant Treatment to Diabetes. **Current Geriatrics Reports**, v. 9, p. 242 – 250, 2020.
- 43 MAY, A.; NARAYANAN, S.; ALCOCK, J.; VARSANI, A.; MALEY, C.; AKTIPIS, A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 7, p. 1 – 22, Setembro 2019.
- 44 RAMADANI, A. S.; ABULREESH, H. H. Isolation and Identification of Yeast Flora in Local Kombucha Sample: AL NABTAH. **Umm Al-Qura University Journal of Applied Science**, v. 2, n. 1, p. 42 – 51, 2010.
- 45 TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119 – 126, Setembro 2004.
- 46 COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUMME-LABARTHE, L.; FALL, A.; DAUBE, G.; COTON, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1 – 16, Maio 2017.
- 47 K, C. S.; LOBO, R. O.; DIAS, F. O. Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life? In: GRUMEZESCU, A. M. (ed.). **Nutrients in Beverages**. [S.l.]: Academic Press, 2019. v. 12, cap. 16, p. 591 – 616. ISBN 978-0-12-816842-4.
- 48 KOZYROVSKA, N. O.; REVA, O. M.; GOGINYAN, V. B.; VERA, J. P. de. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, v. 28, n. 2, p. 103 – 113, 2012.
- 49 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, v. 181, n. 1, p. 13 –, Setembro 2019.
- 50 VILLARREAL-SOTO, S. A.; BOUJILA, J.; PACE, M.; LEECH, J.; COTTER, P. D.; SOUCHARD, J.; TAILLANDIER, P.; BEAUFORT, S. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, Novembro 2020.
- 51 VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P. Understanding kombucha tea fermentation: a review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580 – 588, Março 2018.
- 52 PRACH, K.; WALKER, L. R. Four opportunities for studies of ecological succession. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, n. 3, p. 119 – 123, Março 2011.
- 53 TAN, Y.; ZHONG, H.; ZHAO, D.; DU, H.; XU, Y. Succession rate of microbial community causes flavor difference in strong-aroma Baijiu making process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 311, p. 1 – 95, Dezembro 2019.

- 54 OLIVEIRA, Í. A. C. L. de; ROLIM, V. A. de O.; GASPAR, R. P. L.; ROSSINI, D. Q.; SOUZA, R. de; BOGSAN, C. S. B. The Technological Perspectives of Kombucha and Its Implications for Production. **Fermentation**, v. 8, n. 185, p. 1 – 12, 2022.
- 55 FILIPPIS, F. D.; TROISE, A. D.; VITAGLIONE, P.; ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11 – 16, Agosto 2018.
- 56 WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1 – 11, Dezembro 2015.
- 57 WATANABE, D.; KUMANO, M.; SUGIMOTO, Y.; ITO, M.; OHASHI, M.; SUNADA, K.; TAKAHASHI, T.; YAMADA, T.; TAKAGI, H. Metabolic switching of sake yeast by kimoto lactic acid bacteria through the [GAR+] non-genetic element. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, n. 5, p. 634 – 629, Novembro 2018.
- 58 LAUREYS, D.; BRITTON, S. J.; CLIPPELEER, J. D. Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 3, p. 165 – 174, Março 2020.
- 59 MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. **Trends in Food Science & Technology**, v. 105, p. 323 – 333, Novembro 2020.
- 60 PEI, J.; JIN, W.; EL-ATY, A. M. A.; BARANENKO, D. A.; GOU, X.; ZHANG, H.; GENG, J.; JIANG, L.; CHEN, D.; YUE, T. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. **Food Control**, v. 110, p. 1 – 8, Abril 2020.
- 61 ZHANG, Q.; LIU, K.; SHAO, X.; LI, H.; HE, Y.; SIRIMUJI; WANG, B. Microbes require a relatively long time to recover in natural succession restoration of degraded grassland ecosystems. **Ecological Indicators**, v. 129, p. 1 – 7, Outubro 2021.
- 62 SMID, E. J.; LACROIX, C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 148 – 154, 2013.
- 63 VRANCKEN, G.; RIMAUX, T.; WECKX, S.; LEROY, F.; VUYST, L. D. Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation . **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 77, n. 8, p. 2716 – 2726, 4 2011. ISSN 0099-2240. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126363/>.
- 64 JIAN, C.; CARPÉN, N.; HELVE, O.; VOS, W. M. de; KORPELA, K.; SALONEN, A. Early-life gut microbiota and its connection to metabolic health in children: Perspective on ecological drivers and need for quantitative approach. **EBioMedicine**, v. 69, p. 1 – 9, Julho 2021.
- 65 LIU, S.; TSAO, M. Enhancement of survival of probiotic and non-probiotic lactic acid bacteria by yeasts in fermented milk under non-refrigerated conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 34 – 38, 2009.
- 66 HITTINGER, C. T.; STEELE, J. L.; RYDER, D. S. Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 199 – 206, 2018.

- 67 YEO, A. Y. Y.; TOH, M. Z.; LIU, S. Q. Enhancement of bifidobacteria survival by *Williopsis saturnus* var. *saturnus* in milk. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 1, p. 135 – 144, 2016.
- 68 DEL-RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 438 – 422, 2000.
- 69 SILVIA, A. V.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.; RENARD, T.; ROLLAN, S.; TAILLANDIER, P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 44 – 54, Agosto 2019.
- 70 CASTILLO-CASTILLO, Y.; BARRERA, O. R.; BARRAZA, M. E. B.; RODRIGUEZ, Y. M.; CHAVIRA, J. S.; MONTOYA, C. A.; LUNA, A. C.; ALVAREZ, C. A.; ORTIZ, M. I.; CAMARILLO, J. Isolation and characterization of yeasts from fermented apple bagasse as additives for ruminant feeding. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 889 – 895, Outubro 2016.
- 71 PAINTING, K.; KIRSOP, B. A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 346 – 347, 1990.
- 72 NEBRA, Y.; BLANCH, A. R. A New Selective Medium for *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 5173 – 5176, 1999.
- 73 GUT, A. M.; VASILJEVIC, T.; YEAGER, T.; DONKOR, O. N. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 56 – 66, Abril 2019.
- 74 BHUKYA, B.; BANOTH, S.; ANTHAPPAGUDEM, A. *Saccharomyces cerevisiae* as Potential Probiotic: Strategies for Isolation and Selection. In: SHUKLA, P. (ed.). **Applied Microbiology and Bioengineering An Interdisciplinary Approach**. [S.l.]: Academic Press, 2019. cap. 5, p. 71 – 85. ISBN 978-0-12-815407-6.
- 75 RAMOS, L. de S.; BARBEDO, L. S.; BRAGA-SILVA, L. A.; SANTOS, A. L. S. dos; PINTO, M. R.; SGARBI, D. B. da Grac₃ a. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 2, p. 122 – 125, 2015.
- 76 MAYSER, P.; FROMME, S.; LEITZMANN, G.; GRÜNDER, K. The yeast spectrum of the 'tea fungus Kornbucha. **Mycoses**, v. 38, p. 289 – 295, Julho 1995.
- 77 KOZYROVSKA, N.; REVA, O.; GOGINYAN, V. B.; VERA, J. P. de. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, v. 28, n. 2, p. 103 – 113, Dezembro 2011.
- 78 TANAKA, K.; SATOH, T.; KITAHARA, J.; UNO, S.; NOMURA, I.; KANO, Y.; SUZUKI, T.; NIIMURA, Y.; KAWASAKI, S. O₂-inducible H₂O₂-forming NADPH oxidase is responsible for the hyper O₂ sensitivity of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1 – 10, Julho 2018.

- 79 TOH, M.; LIU, S. Q. Impact of co-culturing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 with yeasts on microbial viability and metabolite formation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 956 – 968, 2017.
- 80 KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews**, v. 17, p. 167 – 180, 2019.
- 81 NETZKER, T.; FISCHER, J.; WEBER, J.; MATTERN, D. J.; KÖNIG, C. C.; VALIANTE, V.; SCHROECKH, V.; BRAKHAGE, A. A. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1 – 13, 2015.
- 82 TANG, W.; WANG, Y.; ZHANG, J.; CAI, Y.; HE, Z. Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. **Journal of Microbial Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 507 – 517, 2019.
- 83 KRAUSOVA, G.; HYRSLOVA, I.; HYNSTOVA, I. In Vitro Evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. **Fermentation**, v. 5, n. 100, p. 1 – 11, Dezembro 2019.
- 84 LI, M.; WANG, Y.; CUI, H.; LI, Y.; SUN, Y.; QIU, H. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Gastrointestinal Tract of a Wild Boar as Potential Probiotics. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 1 – 10, Fevereiro 2020.
- 85 MENEZES, A. G. T.; RAMOS, C. L.; CENZI, G.; MELO, D. S.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 280 – 288, 2020.
- 86 TUO, Y.; YU, H.; AI, L.; WU, Z.; GUO, B.; CHEN, W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4252 – 4257, 2013.
- 87 KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 981 – 987, 2003.
- 88 MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2202 – 2222, 2010.
- 89 ALBERTYN, J.; POHL, C. H.; VILJOEN, B. C. *Rhodotorula*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 291–295. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00289-5, p. 291 – 295, 2014.
- 90 HOSSAIN, M. N.; AFRIN, S.; HUMAYUN, S.; AHMED, M. M.; SAHA, B. K. Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 1 – 10, 2020.
- 91 FERNÁNDEZ-PACHECO, P.; MONGE, I. M. R.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; COLADO, J. M. P.; ARÉVALO-VILLENA, M. Safety Evaluation of Yeasts With Probiotic Potential. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 1 – 11, 2021.

- 92 DABIRI, S.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, p. 437 – 442, 2018.
- 93 ZIENIUK, B.; FABISZEWSKA, A. *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 1 – 8, 2019.
- 94 KANTARCIOGLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **mycoses**, v. 45, p. 160 – 165, 2002.
- 95 FERNÁNDEZ-PACHECO, P.; MONGE, I. M. R.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; COLADO, J. M. P.; ARÉVALO-VILLENA, M. Safety Evaluation of Yeasts With Probiotic Potential. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 1 – 11, 2021.
- 96 GIBSON, B. R.; LAWRENCE, S. J.; LECLAIRE, J. P. R.; POWELL, C. D.; SMART, K. A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 5, p. 535 – 569, 2007.
- 97 ALEXANDRAVEIGA; AMADEIRA-LOPES. Effects of weak acid preservatives on the growth and thermal death of the yeast *Pichia membranifaciens* in a commercial apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 145 – 151, Junho 2000.
- 98 DIMIDI, E.; COX, S. R.; ROSSI, M.; WHELAN, K. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1 – 26, 2019.
- 99 WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; BONIFACIO, B. V.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1 – 6, December 2019.
- 100 JOHANSEN, P.; JESPERSEN, L. Impact of quorum sensing on the quality of fermented foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 16 – 25, 2017.
- 101 DORON, I.; MESKO, M.; LI, X. V.; KUSAKABE, T.; LEONARDI, I.; SHAW, D. G.; FIERIS, W. D.; LIN, W.; BIALT-DECELIE, M.; ROMÁN, E.; LONGMAN, R. S.; PLA, J.; WILSON, P. C.; ILIEV, I. D. Mycobiota-induced IgA antibodies regulate fungal commensalism in the gut and are dysregulated in Crohn's disease. **Nature Microbiology**, v. 6, p. 1493 – 1504, Novembro 2021.
- 102 OST, K. S.; O'MEARA, T. R.; STEPHENS, W. Z.; CHIARO, T.; ZHOU, H.; PENMAN, J.; BELL, R.; CATANZARO, J. R.; SONG, D.; SINGH, S.; CALL, D. H.; HWANG-WONG, E.; HANSON, K. E.; VALENTINE, J. F.; CHRISTENSEN, K. A.; O'CONNELL, R. M.; CORMACK, B.; IBRAHIM, A. S.; PALM, N. W.; NOBLE, S. M.; ROUND, J. L. Adaptive immunity induces mutualism between commensal eukaryotes. **Nature**, v. 596, p. 114 – 118, Julho 2021.
- 103 HOF, H. *Rhodotorula* spp. in the gut – foe or friend? **GMS Infectious Diseases**, v. 7, p. 1 – 6, 2019.

- 104 TRAN, T.; ROMANET, R.; ROULLIER-GALL, C.; VERDIER, F.; MARTIN, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; TOURDOT-MARÉCHAL, R. Non-Targeted Metabolomic Analysis of the Kombucha Production Process. **Metabolites**, v. 12, n. 2, p. 160 – 174, 2022.
- 105 LI, X.; GAO, J.; CHEN, H.; ZHANG, A.; TANG, M. Toxins from a symbiotic fungus, *Leptographium qinlingensis* associated with *Dendroctonus armandi* and their in vitro toxicities to *Pinus armandi* seedlings. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 239 – 247, 2012.
- 106 CIMMINO, A.; PUOPOL, G.; PERAZZOLLI, M.; ANDOLFI, A.; MELCK, D.; PERTOT, I.; EVIDENTE1, A. CYCLO(L-PRO-L-TYR), THE FUNGICIDE ISOLATED FROM *LYSOBACTER CAPSICI* AZ78: A STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, n. 2, p. 290 – 295, 2014.
- 107 WATTANA-AMORN, P.; CHAROENWONGSA, W.; WILLIAMS, C.; CRUMP, M. P.; APICHAISATAIENCHOTE, B. Antibacterial activity of cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(D-Pro-L-Tyr) from *Streptomyces* sp. strain 22-4 against phytopathogenic bacteria. **Natural Product Research**, v. 30, n. 17, p. 1980 – 1983, 2016.
- 108 ALI, S.; SHULTZ, J. L.; IKRAM-UL-HAQ. High performance microbiological transformation of L-tyrosine to L-dopa by *Yarrowia lipolytica* NRRL-143. **BMC Biotechnology**, v. 7, n. 50, p. 1 – 7, 2007.
- 109 BHOSALE, P.; GADRE, R. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 423 – 427, 2001.
- 110 XINQIAN; YANG, Q.; SOLAIRAJ, D.; LEGRAND, N. N. G.; SERWAH, B. N. A.; ZHANG, H. Population dynamics of *Rhodotorula mucilaginosa* on apples, apple defense response, and transcriptomic response of the yeast to patulin. **Biological Control**, v. 146, p. 1 – 8, 2020.
- 111 MIN-KYUKWAK; RUILIU; SA-OUKKANG. Antimicrobial activity of cyclic dipeptides produced by *Lactobacillus plantarum* LBP-K10 against multidrug-resistant bacteria, pathogenic fungi, and influenza A virus. **Food Control**, v. 85, p. 223 – 234, 2018.
- 112 LIU, R.; KIM, A. H.; KWAK, M.; KANG, S. Proline-Based Cyclic Dipeptides from Korean Fermented Vegetable Kimchi and from *Leuconostoc mesenteroides* LBP-K06 Have Activities against Multidrug-Resistant Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1 – 15, 2017.
- 113 SENHAJI, S.; LAMCHOURI, F.; AKABLI, T.; TOUFIK, H. In vitro antioxidant activities of five β -carboline alkaloids, molecular docking, and dynamic simulations. **Structural Chemistry**, p. 1 – 13, 2022.
- 114 ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; LIEVENS, B.; FUKAMI, T. Yeast–Bacterium Interactions: The Next Frontier in Nectar Research. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 5, p. 393 – 401, Maio 2019.
- 115 GARCÍA, V. D.; BRIZZIO, S.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; BROOCK, M. V. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 2, p. 331 – 341, Fevereiro 2007.

- 116 BERNARD, C.; GIRARDOT, M.; IMBERT, C. Candida albicans interaction with Gram-positive bacteria within interkingdom biofilms. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, p. 1 – 8, 2020.
- 117 LIU, Y.; FILLER, S. G. Candida albicans Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 168 – 173, Fevereiro 2011.
- 118 CANABARRO, A.; VALLE, C.; FARIAS, M. R.; SANTOS, F. B.; LAZERA, M.; WANKE, B. Association of subgingival colonization of Candida albicans and other yeasts with severity of chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 48, n. 4, p. 428 – 432, 2013.
- 119 ILIEV, I. D.; FUNARI, V. A.; TAYLOR, K. D.; NGUYEN, Q.; REYES, C. N.; STROM, S. P.; BROWN, J.; BECKER, C. A.; FLESHNER, P. R.; DUBINSKY, M.; ROTTER, J. I.; WANG, H. L.; MCGOVERN, D. P. B.; BROWN, G. D.; UNDERHILL, D. M. Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1314 – 1317, 2012.
- 120 WANG, Y.; ZHAO, Y.; FAN, L.; XIA, X.; LI, Y.; ZHOU, J. Identification and characterization of Pichia membranifaciens Hmp-1 isolated from spoilage blackberry wine. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 9, p. 2126 – 2136, Setembro 2018.
- 121 ÁVILA, L. D. de; AYUB, M. A. Z. Occurrence of Brettanomyces/Dekkera in Brazilian red wines and its correlation with ethylphenols. **Brazilian Journal of Microbiology**, scielo, v. 44, p. 81 – 88, 00 2013. ISSN 1517-8382. Disponível em: <http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php?lang=en&pid=S1517-83822013000100011>.
- 122 HEYDARI, S.; SIAVOSHI, F.; EBRAHIMI, H.; SARRAFNEJAD, A.; SHARIFI, A. H. Excision of endosymbiotic bacteria from yeast under aging and starvation stresses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 78, p. 1 – 8, Março 2020.
- 123 DYALL, S. D.; JOHNSON, P. J. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 404 – 411, Agosto 2000.
- 124 KUROKAWA, Y.; KONISHI, R.; YOSHIDA, A.; TOMIOKU, K.; TANABE, K.; FUJITA, A. Microautophagy in the yeast vacuole depends on the activities of phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes Volume 1862, Issue 11, 1 November 2020, 183416**, v. 1862, n. 11, p. 1 – 8, Novembro 2020.
- 125 SIAVOSHI, F.; HEYDARI, S.; SHAFIEE, M.; AHMADI, S.; SANIEE, P.; SARRAFNEJAD, A.; KOLAHDOOZAN, S. Sequestration inside the yeast vacuole may enhance Helicobacter pylori survival against stressful condition. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 69, p. 127 – 133, Abril 2019.
- 126 PION, M.; SPANGENBERG, J. E.; SIMON, A.; BINDSCHEDLER, S.; FLURY, C.; CHATELAIN, A.; BSHARY, R.; JOB, D.; JUNIER, P. Bacterial farming by the fungus Morchella crassipes. **Proceedings of the Royal Society**, v. 280, p. 1 – 8, Dezembro 2013.
- 127 ZHAO, J.; CHEUNG, P. C. K. Fermentation of β -Glucans Derived from Different Sources by Bifidobacteria: Evaluation of Their Bifidogenic Effect. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5986 – 5992, 2011.

- 128 ZHAO, J.; CHEUNG, P. C. K. Comparative Proteome Analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Grown on β -Glucans from Different Sources and a Model for Their Utilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 4360 – 4370, 2013.
- 129 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA. Scientific opinion on safety of “yeast beta-glucans” as a novel food ingredient. **EFSA Journal**, v. 9, n. 5, p. 2137 – 2159, 2011.
- 130 KEUNG, H. Y.; LI, T. K.; SHAM, L. T.; CHEUNG, M. K.; CHEUNG, P. C. K.; KWAN, H. S. Mechanistic Study of Utilization of Water-Insoluble *Saccharomyces cerevisiae* Glucans by *Bifidobacterium breve* Strain JCM1192. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 7, p. 1 – 15, Abril 2017.

Anexos

ANEXO A – Atividades Complementares

Figura 22 – Trabalho apresentado no “13º Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos” - “Homemade and Commercial Kombucha Fermentation: Differences and Similarities”.



Figura 23 – Palestra do Núcleo de Estudos em Fermentações da Universidade Federal de Lavras - “Kombucha: da cozinha para Indústria”.



Figura 24 – Palestra do Núcleo de Estudos em Fermentações da Universidade Federal de Lavras - “Kombucha: definição legal e registro de estabelecimento”.



Figura 25 – Palestra do Núcleo de Estudos em Fermentações da Universidade Federal de Lavras - “Desenvolvimento de novas bebidas probióticas”.



Figura 26 – Artigo publicado na revista *Fermentation* (IF: 3,975)

Review

The Technological Perspectives of Kombucha and Its Implications for Production

Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira, Victória Ananias de Oliveira Rolim, Roberta Paulino Lopes Gaspar, Daniel Quarentei Rossini, Rayane de Souza and Cristina Stewart Bittencourt Bogsan *

Pharmaceutical-Biochemistry Department, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Sao Paulo 05508-080, Brazil; icaro.biotech@usp.br (Í.A.C.L.d.O.); nutritiv.rolim@gmail.com (V.A.d.O.R.); roberta_lopes@usp.br (R.P.L.G.); danielqr@usp.br (D.Q.R.); rayanesouza@usp.br (R.d.S.)

* Correspondence: cris.bogsan@usp.br

Abstract: Fermentation is one of the oldest biotechnological tools employed by mankind. Fermenting food gives them better sensory and nutritional qualities, the latter including vitamins, phenolic compounds, antioxidants, and antimicrobials. Kombucha is the result of the fermentation of a sweetened *Camellia sinensis* infusion by the action of a symbiotic community of yeasts and bacteria organized in a cellulosic biofilm called SCOBY and has gained great prominence among fermented foods and beverages, with a considerable increase in its popularity in the last decade, both among consumers and within the scientific community. This is explained by the particular functional and microbial characteristics of this beverage, such as its antioxidant and antimicrobial potential, long-term stable microbial communities, its suitability for fermentation under different conditions of time and temperature, and amenability to other carbon sources besides sucrose. Thus, this review aims to present and discuss the functional, microbial, and physicochemical aspects of kombucha fermentation, covering the many challenges that arise in its production, in domestic, commercial, and legislation contexts, and the next steps that need to be taken in order to understand this drink and its complex fermentation process.

Keywords: traditional fermented food; health; food technology; microbiome



Citation: Oliveira, Í.A.C.L.d.; Rolim, V.A.d.O.; Gaspar, R.P.L.; Rossini, D.Q.; de Souza, R.; Bogsan, C.S.B. The Technological Perspectives of Kombucha and Its Implications for Production. *Fermentation* **2022**, *8*, 185. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040185>

Academic Editor: Kurt A. Rosentrater

Received: 10 February 2022

Accepted: 23 March 2022

Published: 13 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

One of the oldest methods of preserving food is through the fermentation process. The metabolites produced during fermentation generate desired characteristic flavors and decrease food matrix pH, inhibiting the growth of pathogenic bacteria increasing shelf life [1]. Fermented foods and beverages have been part of the cuisine of diverse populations for thousands of years, all over the world, as explored in Sandor Katz' book, *The Art of Fermentation*, an important reference for artisanal producers [2]. Fermented foods were probably the earliest processed foods, and the ancient fermentation techniques were known by philosophers and alchemists [3]. Fermented foods, such as kefir, kombucha, sourdough bread, kimchi, sauerkraut, tempeh, natto, and miso, and others, including, as some of the most popular products, vinegar, beers, wines, and cheeses, are used in our daily lives and represent the oldest known uses of biotechnology [4,5]. Concerning public health and food culture, fermented foods confer microbiological safety and correspond to about a third of the world's diet [5]. It is known that there is a risk that foods of animal and vegetable origin may be contaminated with viruses, fungi, and bacteria, which make disease outbreaks transmitted by common foodstuffs a considerable public health problem worldwide [6]. Thus, this review aims to present and discuss the functional, microbial, physicochemical, and safety aspects of kombucha fermentation under the lens of the differences identified in the literature regarding the home and industrial production of this traditional fermented beverage.

Figura 27 – Artigo publicado na revista *Current Geriatrics Reports* (IF: 1,17)

Current Geriatrics Reports
<https://doi.org/10.1007/s13670-020-00337-3>

NUTRITION, OBESITY, AND DIABETES (SML RIBEIRO, SECTION EDITOR)



Traditional Fermented Foods as an Adjuvant Treatment to Diabetes

Caroliny de Almeida Souza¹ · Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira¹ · Victoria Ananias de Oliveira Rolim¹ · Cristina Stewart Bittencourt Bogsan¹

Accepted: 26 October 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose of Review The use of traditional fermented foods as an alternative therapy for diabetes treatment has been widespread used without scientific proof, sometimes aggravating the clinical condition. This work explores the application of fermented foods with anti-glycemic activity for adjuvant therapy which fight against diabetes and differentiates them from those popular fermented foods generally used based on empirical knowledge.

Recent Findings The role of physiologically active components of foods has changed our understanding of diet effects on human health, placing it in a prominent position, becoming a strategic and alternative treatment for metabolic diseases such as diabetes. However, identifying the use efficacy is somewhat complicated since the diet promotes interference from multiple factors.

Summary It can be concluded that traditional fermented foods can be considered great helpers in the complementary and alternative treatment of diabetes, improving mechanisms such as glycemic control, recovery or maintenance of body weight, and antioxidant capacity.

Keywords Kombucha · Kefir · Traditional fermented foods · Diabetes · Glucose control · Antioxidant

Introduction

Fermentation is one of the oldest food preservation methods, ensuring durability and microbiological safety, and adding desired flavors [1]. Fermented foods and beverages have been part of the cuisine for thousands of years by diverse societies worldwide [2, 3]. The production and consumption of fermented products is an old habit and represents one of the earliest known uses of biotechnology. Examples of fermented products are kefir, kombucha, sauerkraut, tempeh, natto, miso, kimchi, sourdough bread, and even the most popular products used in our daily lives such as vinegar, beers, wines, and cheeses [4]. The role that fermented foods play is not only related to the development of civilizations and cultural relations between countries but also a source of nutritional

importance [3, 5], microbiota modulation, and adjuvant therapy for pathologies such as diabetes [6].

The microbiota function in maintaining the intestinal barrier integrity leads to metabolic homeostasis, protecting against infections and improving the host immune system. Microbiota modification may be a new treatment strategy for metabolic diseases, such as diabetes mellitus (DM) [7]. This modification can occur through the use of beneficial microbes, such as probiotics in functional food, that is, “live microorganisms that when consumed in adequate quantities have beneficial effects on health and well-being of the host” [8••, 9].

Beneficial effects of probiotics utilization in the prevention and treatment of DM are shown in experimental studies, perhaps through modulation of the intestinal microbiota, immune response, and other mechanisms [10, 11, 12]. However, to verify the efficacy of probiotics usage in the glycemic control of diabetic subjects is complex, due to the variables like feeding habits, drug use, and body composition that affect the intestinal microbiota, carbohydrate metabolism, insulin secretion, energy balance, and other intestinal hormones [7].

New therapeutic strategies that benefit the diabetic patient to promote the glycemic and weight control are highlighted in the research field. Essential mechanisms for preventing chronic complications and controlling the lipid profile, oxidative

This article is part of the Topical Collection on *Nutrition, Obesity, and Diabetes*

✉ Cristina Stewart Bittencourt Bogsan
cris.bogsan@usp.br

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, São Paulo, Brazil

Published online: 11 November 2020

Springer

Figura 28 – Participação como Revisor Técnico do livro “Fermentação à Brasileira”. Editora: Melhoramentos, 2020.



Figura 29 – Participação do Webinar “*Fermented Foods and Health: Does Today’s Science Support Yesterday’s Tradition?*”.

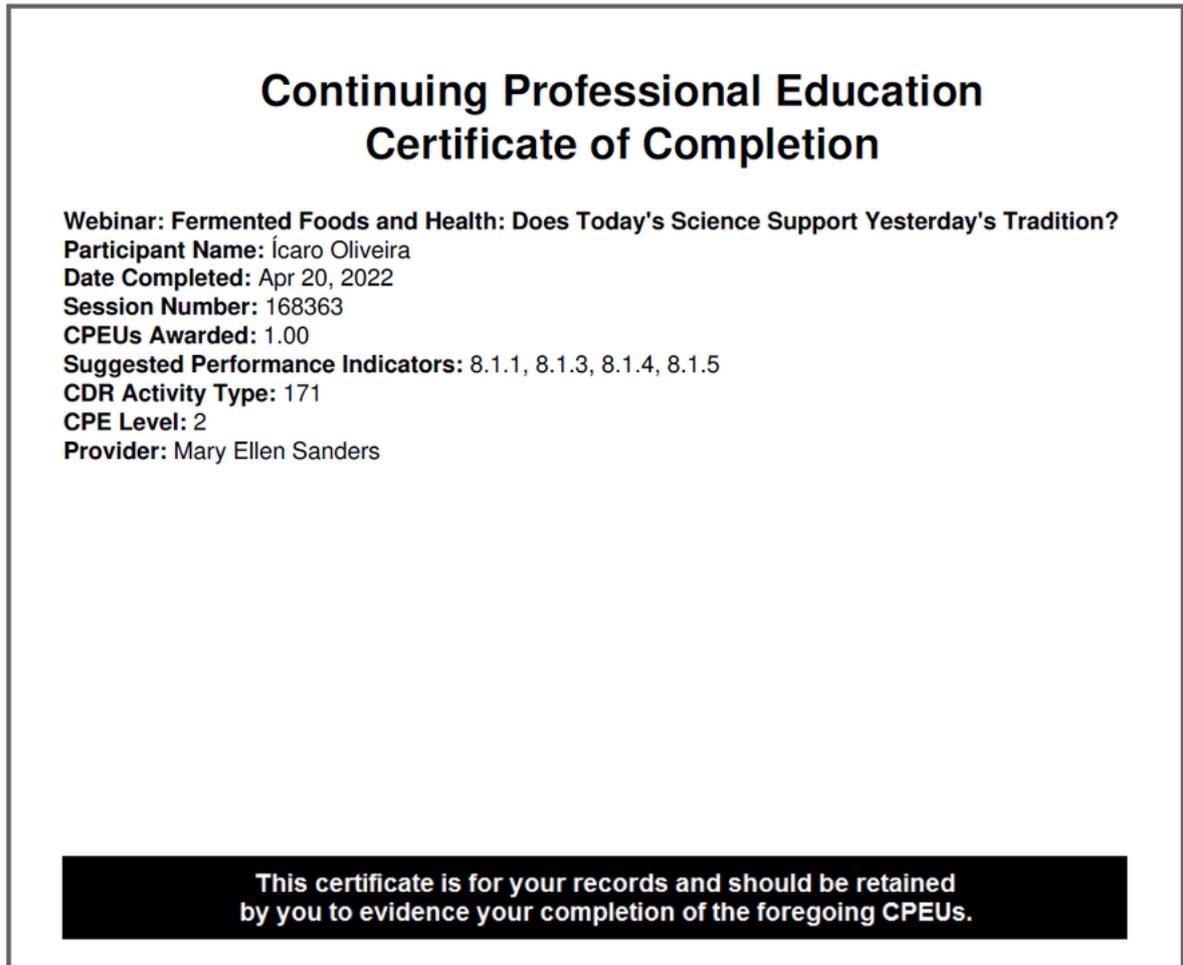


Figura 30 – Participação do “International Workshop on Advances of Probiotics and Prebiotics”.



Figura 31 – Apresentação de trabalho na “XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia”.



XXIV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

LV Semana Universitária Paulista de Farmácia-Bioquímica



SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO PAULISTA DE PESQUISA EM FARMACOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que **Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira** apresentou o trabalho *Exploiting kombucha's yeast metabolism on bacteria stress resistance* na XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 27 de setembro a 1 de outubro de 2021, em formato de **VÍDEO CIENTÍFICO** na categoria de **MESTRADO**.

São Paulo, 19 de outubro de 2021.

Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira
Presidente da Comissão de Avaliação de Resumos e Vídeos e Comissão de Avaliação de Apresentações Oraís

Prof. Dr. João Paulo Fabi
Presidente da Comissão Organizadora

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
Diretor da FCF-USP

Figura 32 – Participação no “International Symposium - Fungi: From The Environment To The Host”.

ANEXO B – Histórico Escolar

Figura 33 – Histórico escolar do mestrado - parte 1 de 2.

21/03/2022 10:39

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9133 - 11430780/1 - Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira

Email: icaro.biotech@usp.br
Data de Nascimento: 22/12/1991
Cédula de Identidade: RG - 3.560.877 - PB
Local de Nascimento: Estado da Paraíba
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biotecnologia - Universidade Federal da Paraíba - Paraíba - Brasil - 2018

Curso: Mestrado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Alimentos
Data de Matrícula: 20/05/2019
Início da Contagem de Prazo: 20/05/2019
Data Limite para o Depósito: 19/05/2022
Orientador: Prof(a). Dr(a). Cristina Stewart Bittencourt Bogsan - 20/05/2019 até o presente. Email: cris.bogsan@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 20/05/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/12/2020
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 20/05/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/03/2022

Impresso em: 21/03/2022 10:37:55

Figura 34 – Histórico escolar do mestrado - parte 2 de 2.

21/03/2022 10:39

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9133 - 11430780/1 - Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5773-8/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	12/08/2019	20/10/2019	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5788-1/4	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	09/09/2019	29/09/2019	60	4	100	A	N	Concluída
BTC5819-2/1	Utilização de Saccharomyces cerevisiae como Organismo Modelo em Biologia Molecular (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	27/09/2019	28/11/2019	90	6	78	A	N	Concluída
FBA5752-2/1	Probióticos em Alimentos e suas Implicações na Saúde Humana	15/10/2019	25/11/2019	60	4	91	A	N	Concluída
FBT5700-4/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	03/02/2020	05/04/2020	90	6	90	A	N	Concluída
FBA5728-4/9	Aprimoramento Pedagógico	17/03/2020	13/04/2020	60	0	-	-	N	Turma cancelada
PBA5025-1/4	Introdução à Docência para o Ensino Superior (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo)	15/10/2020	23/12/2020	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
TNM5784-6/2	Preparação Pedagógica para Aperfeiçoamento do Ensino de Ciências (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	16/03/2021	26/04/2021	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5712-3/1	Biotecnologia de Produtos Naturais	22/03/2021	07/05/2021	30	2	100	A	N	Concluída
EAH5001-1/4	Preparação Pedagógica (Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Universidade de São Paulo)	23/03/2021	15/06/2021	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/03/2022

Impresso em: 21/03/2022 10:37:55

ANEXO C – Currículo Lattes

Figura 35 – Currículo Lattes - parte 1 de 6.



Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9008454158049520>

ID Lattes: **9008454158049520**

Última atualização do currículo em 28/03/2022

Entusiasta por biotecnologia, atualmente é mestrando do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - FCF/USP, pela Universidade de São Paulo. Trabalhou durante a graduação com imunologia e epidemiologia de doenças infecciosas, como as leishmanioses humanas e HPV, e gestão de qualidade em laboratório de citopatologia clínica. Ainda na graduação, realizou pesquisa sobre o desenvolvimento de protótipos para implementação em tecnologia cervejeira. Possui muito interesse nas áreas de fermentação de bebidas alcoólicas, fermentados tradicionais, probióticos, interações em comunidades microbianas, relação probiótico-hospedeiro, suas implicações na saúde humana, bem como em empreendedorismo e novas tecnologias. (Texto informado pelo autor)

Identificação

<p>Nome Nome em citações bibliográficas Lattes ID</p>	<p>Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira  OLIVEIRA, Í. A. C. L.; DE OLIVEIRA, ÍCARO ALVES CAVALCANTE LEITE  http://lattes.cnpq.br/9008454158049520</p>
--	--

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2019	<p>Mestrado em andamento em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Avaliação da Interação entre leveduras isoladas de kombucha e bactérias probióticas, Orientador:  Cristina Stewart Bittencourt Bogsan. Palavras-chave: Fermentados tradicionais; Microbioma; HN019; Bifidobacterium. Grande área: Ciências Agrárias</p>
2014 - 2018	<p>Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil. Título: Desenvolvimento de protótipos visando a captura, criopreservação, manutenção e propagação de leveduras para fins cervejeiros. Orientador: Kristerson Reinaldo de Luna Freire.</p>
2010 interrompida	<p>Graduação interrompida em 2012 em Ciências Biológicas - Licenciatura e Bacharelado. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil. Ano de interrupção: 2012</p>

Formação Complementar

2014 - 2014	<p>Caracterização da função enzimática de novos genes de reparo de DNA e de. (Carga horária: 2h). Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil.</p>
2011 - 2011	<p>Introdução a Etnozoologia. (Carga horária: 6h). Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil.</p>
2006 - 2008	<p>Curso de Especialização para Adultos. (Carga horária: 120h). Wizard Brasil, WIZARD, Brasil.</p>

Atuação Profissional

Figura 36 – Currículo Lattes - parte 2 de 6.

Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil.

Vínculo institucional 2016 - 2017	Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.
Outras informações Vínculo institucional 2015 - 2016	Voluntário CNPq - Programa Institucional de Voluntários de Iniciação Científica (PIVIC)
Outras informações Atividades 2017 - 2018	Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva. Voluntário CNPq - Programa Institucional de Voluntários de Iniciação Científica (PIVIC)
2016 - 2017	Pesquisa e desenvolvimento, Centro de Biotecnologia. Linhas de pesquisa Tecnologia cervejeira
2014 - 2016	Pesquisa e desenvolvimento, Centro de Biotecnologia - Campus I. Linhas de pesquisa Gestão de Qualidade em laboratório de citopatologia clínica Pesquisa e desenvolvimento, Centro de Biotecnologia - Campus I. Linhas de pesquisa Biotecnologia Aplicada à Saúde: Estudo imunológico em doenças infecciosas

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional 2019 - Atual	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestrado, Carga horária: 48, Regime: Dedicção exclusiva.
Atividades 2019 - Atual	Pesquisa e desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Linhas de pesquisa Ciência e Tecnologia de Alimentos Microbiologia de Alimentos Tecnologia das Fermentações

Linhas de pesquisa

1.	Biotecnologia Aplicada à Saúde: Estudo imunológico em doenças infecciosas
2.	Gestão de Qualidade em laboratório de citopatologia clínica
3.	Tecnologia cervejeira
4.	Ciência e Tecnologia de Alimentos
5.	Microbiologia de Alimentos
6.	Tecnologia das Fermentações

Projetos de pesquisa

2017 - 2018	Desenvolvimento de protótipos visando a captura, criopreservação, manutenção e propagação de leveduras para fins cervejeiros Descrição: Busca-se a elaboração de um protótipo padronizado, organizado na forma de um "kit", que confere ao usuário a capacidade de capturar e isolar microrganismos silvestres com alto potencial e direcionamento para a cervejaria, possibilitando sua manutenção e uso de maneira segura e viável. Do mesmo modo, tem-se por meta o desenvolvimento de um segundo protótipo, igualmente apresentado na forma de "kit", que concede ao usuário a propensão para estocar leveduras em temperatura de -20°C por tempo considerável, mantendo a viabilidade e alta concentração celular, bem como uma boa taxa de recuperação da vitalidade de fermentação. Para tal fim, pode-se desenvolver protótipos que necessariamente devem consistir de técnicas simples, de baixo custo, seguras e que possibilitem a manipulação e estocagem de microrganismos, como as leveduras cervejeiras, em ambiente doméstico.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) . Integrantes: Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira - Coordenador / Kristerson Reinaldo de Luna Freire - Integrante.
2016 - 2017	Papiloma Virus Humano: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico para carcinoma de colo uterino. Descrição: O projeto busca realizar o levantamento epidemiológico das neoplasias intraepiteliais cervicais benignas e malignas do estado da Paraíba e avaliar o perfil imunológico e a resposta imune sistêmica do HPV através da Caracterização quantitativa da subpopulação linfocitária do sangue

Figura 37 – Currículo Lattes - parte 3 de 6.

2014 - 2016	<p>periférico em mulheres infectadas com o HPV de baixo ou alto risco oncogênico e portadoras de lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Integrantes: Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira - Integrante / Tatjana Keesen de Souza Lima - Integrante / Ronara Adriane Gonçalves - Integrante / Daniele Idalino Janebro - Coordenador. Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática Descrição: O projeto faz parte do EDITAL 01/13-PPSUS financiado pelas entidades MS/CNPq /FAPESQ/SES e visa identificar e validar marcadores moleculares e genéticos frente à infecção por Leishmania infantum e elaborar um mapa de risco para a grande João Pessoa incluindo informações epidemiológicas da população humana, canina e da presença de mamíferos silvestres infectados.. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Integrantes: Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira - Integrante / Tatjana Keesen de Souza Lima - Coordenador / Nilton Guedes - Integrante / Francisco de Assis Paiva - Integrante / Pedro Estrela Cordeiro de Andrade Pinto - Integrante / Rafael de Almeida Travassos - Integrante / Cayro de Macedo Mendes - Integrante / Fabíola da Cruz Nunes - Integrante.</p>
--------------------	--

Idiomas

Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Francês	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Pouco, Escreve Pouco.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2018	Láurea Acadêmica Destaque da Graduação, Universidade Federal da Paraíba.
2017	Honra ao Mérito por melhor trabalho apresentado, Congresso Nacional de Saúde e Meio Ambiente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. DE ALMEIDA SOUZA, CAROLINY ; **DE OLIVEIRA, ÍCARO ALVES CAVALCANTE LEITE** ; DE OLIVEIRA ROLIM, VICTORIA ANANIAS ; BOGSAN, CRISTINA STEWART BITTENCOURT . Traditional Fermented Foods as an Adjuvant Treatment to Diabetes. Current Geriatrics Reports **JCR**, v. 9, p. 242-250, 2020.
Citações: **WEB OF SCIENCE™** 1

Capítulos de livros publicados

1. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.**; Freire, K. R. L. . Leveduras Cervejeiras: o estado da arte. In: Giselle Medeiros da Costa One. (Org.). Saúde Interativa. 1ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada - IMEA, 2019, v. 2, p. 1018-1039.
2. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.**; GONÇALVES, R. A. ; CRUZ, E. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Saúde da Mulher: Gestão de Qualidade em laboratório de citopatologia clínica. In: Giselle Medeiros da Costa One; Maria Luisa Souto Porto. (Org.). Saúde: Os Desafios do Mundo Contemporâneo. 1ed.João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada ? IMEA, 2018, v. 1, p. 281-297.

Resumos publicados em anais de congressos

Figura 38 – Currículo Lattes - parte 4 de 6.

1. GOMES, I. C. G. ; GONÇALVES, R. A. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; DIAS, C. N. S. ; MACEDO, B. G. ; LIMA, V. S. ; CRUZ, E. A. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Cytotoxic Profile Analyses of CD8 T Lymphocytes in Women Infected with Human Papillomavirus. In: XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology 2017, 2017, Salvador. XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology 2017 - X Extra Section of Clinical Immunology, 2017.
2. CRUZ, E. A. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GONÇALVES, R. A. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Epidemiologia da infecção pelo HPV - Análise das lesões cervicais de baixo e alto grau na Paraíba. In: 17º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica - 2ª Jornada Brasileira de Diagnóstico Laboratorial, 2017, Goiânia. 17º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica - 2ª Jornada Brasileira de Diagnóstico Laboratorial, 2017.
3. CRUZ, E. A. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GONÇALVES, R. A. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Levantamento epidemiológico das atipias celulares cervicais da Paraíba. In: 17º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica - 2ª Jornada Brasileira de Diagnóstico Laboratorial, 2017, Goiânia. 17º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica - 2ª Jornada Brasileira de Diagnóstico Laboratorial, 2017.
4. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; JANEIRO, D. I. . Perfil Epidemiológico de Mulheres Portadoras de Lesões Intraepiteliais ou Carcinoma Cervical em João Pessoa-PB. In: XXV Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 2017, João Pessoa. XXV Encontro de Iniciação Científica da UFPB. João Pessoa: Editora UFPB, 2017. v. 1.
5. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GONÇALVES, R. A. ; CRUZ, E. A. ; MACHADO, R. S. N. ; MEIRA, J. S. M. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Gestão de qualidade: Levantamento dos índices de qualidade em laboratório de citopatologia clínica. In: 44º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2017, João Pessoa. Revista Brasileira de Análises Clínicas. Rio de Janeiro: Trasso Comunicação, 2017. v. 49. p. 44-45.
6. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; LIMA, T. K. S. . Avaliação Sorológica de Indivíduos Assintomáticos Infectados por *Leishmania infantum* em João Pessoa. In: XXIV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB, 2016, João Pessoa. XXIV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB 2016 ?Formação Cidadã: Diversidade e Diálogo de Saberes?. João Pessoa: Editora UFPB, 2016. v. 1. p. 250-250.
7. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GONÇALVES, R. A. ; GOMES, I. C. G. ; LIMA, T. K. S. . Activation Profile in CD4, CD8 and Double Negative T cells from human Visceral Leishmaniasis patients. In: XL Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2015, Guarujá. Innate Immunity 2015 - XL Congress of the Brazilian Society of Immunology/VIII ESCI - Extra Section of Clinical Immunology, 2015.
8. ROCHA, J. C. ; RODRIGUES, K. A. F. ; LIMA, V. S. ; NEVES, P. G. R. ; PEIXOTO, R. F. ; SILVA, L. V. ; MACEDO, B. G. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GOMES, I. C. G. ; LIMA, T. K. S. . Quercetin Anti-*Leishmania amazonensis* activity induces decreased monocytes infection rate. In: XL Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2015, Guarujá. Innate Immunity 2015 - XL Congress of the Brazilian Society of Immunology/VIII ESCI - Extra Section of Clinical Immunology, 2015.

Artigos aceitos para publicação

1.  **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; ROLIM, V. A. O. ; GASPAS, R. P. L. ; ROSSINI, D. Q. ; SOUZA, R. ; BOGSAN, C. S. B. . The technological perspectives of kombucha and its implications for production. *Fermentation-Basel* **JCR**, 2022.

Apresentações de Trabalho

1. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; BOGSAN, C. S. B. . Exploiting kombucha's yeast metabolism on bacteria stress resistance. 2021. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
2. CRUZ, E. A. ; MACHADO, R. S. N. ; SANTOS, W. ; LIMA, T. N. ; SILVA, J. C. ; JANEIRO, D. I. ; LIMA, T. K. S. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** . Comparação da Avaliação dos Indicadores do Monitoramento Interno da Qualidade dos Exames Citopatológicos do Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer na Paraíba nos anos de 2016-2017. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GASPAS, R. P. L. ; FONSECA, R. M. M. ; BAPTISTA, D. P. V. ; BOGSAN, C. S. B. . Homemade and Commercial Kombucha Fermentation: Differences and Similarities. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; Freire, K. R. L. . Leveduras Cervejeiras: o estado da arte. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; JANEIRO, D. I. ; GONÇALVES, R. A. ; CRUZ, E. A. ; LIMA, T. K. S. . Saúde da Mulher: Gestão de qualidade em laboratório de citopatologia clínica. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; JANEIRO, D. I. . Perfil Epidemiológico de Mulheres Portadoras de Lesões Intraepiteliais ou Carcinoma Cervical em João Pessoa-PB. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
7. SILVA, L. V. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; CAVALCANTE, P. E. S. ; LIMA, T. K. S. . Avaliação sorológica de indivíduos assintomáticos infectados por *Leishmania infantum* em João Pessoa utilizando método ELISA. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. CRUZ, E. A. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GONÇALVES, R. A. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Epidemiologia da infecção pelo HPV - Análise das lesões cervicais de baixo e alto grau na Paraíba. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. CRUZ, E. A. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GONÇALVES, R. A. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Levantamento epidemiológico das atipias celulares cervicais na Paraíba. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. GOMES, I. C. G. ; GONÇALVES, R. A. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; DIAS, C. N. S. ; MACEDO, B. G. ; LIMA, V. S. ; CRUZ, E. A. ; LIMA, T. K. S. ; JANEIRO, D. I. . Cytotoxic Profile Analyses of CD8 T Lymphocytes in Women Infected with Human Papillomavirus. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; LIMA, T. K. S. . Avaliação Sorológica de Indivíduos Assintomáticos Infectados por *Leishmania infantum* em João Pessoa. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
12.  **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; GONÇALVES, R. A. ; GOMES, I. C. G. ; LIMA, T. K. S. . Activation Profile in CD4, CD8 and Double Negative T cells from human Visceral Leishmaniasis patients. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Produção técnica

Assessoria e consultoria

1. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; COSTA JUNIOR, P. S. P. ; BORGES, P. Q. . Fermentação à Brasileira. 2020.

Figura 39 – Currículo Lattes - parte 5 de 6.

Trabalhos técnicos

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. CONTRERAS, E. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; BOGSAN, C. S. B. . KOMBUCHA: O QUE DIZEM OS NOVOS ESTUDOS. 2021. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 

Redes sociais, websites e blogs

1. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.**. Levedos Levados. 2020; Tema: Divulgação científica na área de alimentos fermentados, saúde e desenvolvimento tecnológico.. (Rede social).

Demais tipos de produção técnica

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 55ª edição da Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB). 2021. (Outra).
2. Congresso Nacional de Saúde e Meio Ambiente. Saúde da Mulher: Gestão de qualidade em laboratório de citopatologia clínica. 2017. (Congresso).
3. XL Congress of Brazilian Society of Immunology 2015. Activation Profile in CD4, CD8 and Double Negative T cells from human Visceral Leishmaniasis patients. 2015. (Congresso).
4. II Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste. 2014. (Simpósio).
5. XX Encontro de Genética do Nordeste. 2014. (Encontro).
6. II Encontro Paraíba de Etnobiologia e Etnoecologia. 2011. (Encontro).
7. VI Encontro Nordestino de Etnobiologia e Etnoecologia. 2011. (Encontro).
8. I ENCONTRO DE BIOLOGIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS. 2010. (Encontro).

Inovação

Projetos de pesquisa

2017 - 2018

Desenvolvimento de protótipos visando a captura, criopreservação, manutenção e propagação de leveduras para fins cervejeiros

Descrição: Busca-se a elaboração de um protótipo padronizado, organizado na forma de um "kit", que confere ao usuário a capacidade de capturar e isolar microrganismos silvestres com alto potencial e direcionamento para a cervejaria, possibilitando sua manutenção e uso de maneira segura e viável. Do mesmo modo, tem-se por meta o desenvolvimento de um segundo protótipo, igualmente apresentado na forma de "kit", que concede ao usuário a propensão para estocar leveduras em temperatura de -20°C por tempo considerável, mantendo a viabilidade e alta concentração celular, bem como uma boa taxa de recuperação da vitalidade de fermentação. Para tal fim, pode-se desenvolver protótipos que necessariamente devem consistir de técnicas simples, de baixo custo, seguras e que possibilitem a manipulação e estocagem de microrganismos, como as leveduras cervejeiras, em ambiente doméstico..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Ícaro Alves Cavalcante Leite de Oliveira - Coordenador / Kristerson Reinaldo de Luna Freire - Integrante.

Educação e Popularização de C & T

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

Figura 40 – Currículo Lattes - parte 6 de 6.

1. CONTRERAS, E. ; **OLIVEIRA, Í. A. C. L.** ; BOGSAN, C. S. B. . KOMBUCHA: O QUE DIZEM OS NOVOS ESTUDOS. 2021. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 

Redes sociais, websites e blogs

1. **OLIVEIRA, Í. A. C. L.**. Levedos Levados. 2020; Tema: Divulgação científica na área de alimentos fermentados, saúde e desenvolvimento tecnológico.. (Rede social).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 23/04/2022 às 17:14:53

[Imprimir currículo](#)