

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

JÚLIA ZOCCA NUNES DE BARROS
TAINÁ PEREZ PONTES

EFEITO DO EXTRATO DE ACEROLA NA VIABILIDADE DA *Saccharomyces boulardii*
SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO.

BAURU
2019

JÚLIA ZOCCA NUNES DE BARROS
TAINA PEREZ PONTES

EFEITO DO EXTRATO DE ACDEROLA NA VIABILIDADE DA *Saccharomyces
boulardii* SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências da Saúde, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina – Universidade do
Sagrado Coração.

Orientador: Prof.º Dr. º Richtier Gonçalves da
Cruz.

BAURU
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

B277e	<p>Barros, Júlia Zocca Nunes de</p> <p>Efeito do extrato de acerola na viabilidade da <i>Saccharomyces boulardii</i> submetidos a diferentes tipos de estresse oxidativo / Júlia Zocca Nunes de Barros; Tainá Perez Pontes. -- 2019. 45f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Richtier Gonçalves da Cruz</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Probiótico. 2. Antioxidante. 3. Extrato de acerola. 4. Estresse oxidativo. 5. Viabilidade. I. Pontes, Tainá Perez. II. Cruz, Richtier Gonçalves da. III. Título.</p>
-------	--

JÚLIA ZOCCA NUNES DE BARROS
TAINÁ PEREZ PONTES

EFEITO DO EXTRATO DE ACEROLA NA VIABILIDADE DA *Saccharomyces boulardii*
SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina – Universidade do Sagrado Coração.

Orientador: Prof.º Dr.º Richtier Gonçalves da Cruz.

Bauru, 06 de dezembro de ano.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Richtier Gonçalves da Cruz (Orientador)
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Alan Giovanini de Oliveira Sartori
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Ana Paula Cerino Coutinho
Universidade do Sagrado Coração

Dedico este trabalho com amor e carinho a
minha amiga e parceira de escrita deste.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao nosso professor e orientador Richtier Gonçalves da Cruz por aceitar conduzir essa pesquisa e por todo o apoio e paciência ao longo dessa elaboração, nos incentivando e depositando sua confiança em nós. Obrigada por nos manter motivadas durante todo o processo e apresentar – nos essa área tão ampla de conhecimento e possibilidades que é a Análise de Alimentos – Bromatologia.

Agradecemos à Universidade do Sagrado Coração pela elevada qualidade de ensino oferecido e todo o seu corpo docente, que tanto nos auxiliou durante o processo de graduação. Em especial as professoras Ana Paula Tramboni e Andrea, que ministraram as disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso, por toda a ajuda necessária na estruturação e desenvolvimento do trabalho. E também agradecemos à técnica e responsável do laboratório o qual foi realizada a nossa pesquisa, Fabiane, por toda a assistência, ajuda e atenção dada a nós.

Agradecemos aos nossos amigos do curso de graduação e futuros colegas de profissão, Bianca, Gustavo, Larissa, Liane, Taynara e Vitor, por todo o companheirismo, pela convivência, pelas trocas de ideias e ajuda mútua, e pelos inúmeros desafios que enfrentamos juntos. Agradecemos por ouvir nossos desabafos, por nos aconselharem e muitas vezes nos ajudarem a realização, nós desejamos a vocês todo o sucesso deste mundo e felicidade tamanha dentro da profissão, cada um nos marcou de uma forma e levaremos vocês para sempre em nossos corações.

Eu, Tainá, agradeço primeiramente aos meus pais, Alcenir e Wagner, e a minha irmã Tauane, por todo o apoio, carinho e incentivo durante toda a minha trajetória, sem eles nada disso seria possível. E agradeço aos meus amigos, Amanda, Ana Caroline, Ana Laura, Gabriela, Giovanni, Gustavo, Isabele, Marcos, Thaís, Tiemy, Lucilei e Winnie, pela paciência, apoio, conselhos, incentivos e por toda a amizade ao longo da minha graduação, me proporcionando momentos de muita alegria, risadas e descontração, essenciais para me fazer seguir em frente e não desistir nos momentos difíceis. E agradeço as minhas amigas Caroline e Júlia, que mesmo à quilômetros de distância, me mostraram todo companheirismo e carinho, fundamentais para minha trajetória.

E gostaria de agradecer a minha amiga, companheira, confidente, minha primeira amizade da graduação, e dupla deste trabalho, Júlia. Obrigada por sempre me incentivar, por não ter perdido a paciência comigo durante esse processo, ter sido sempre muito

compreensiva, e por tudo que vivemos juntas ao longo desses anos. E como nós mesmas já dissemos: “Começamos juntas e terminaremos juntas”.

Da minha parte, Júlia, agradeço meus pais Marily e Júlio por todo o apoio oferecido durante esses anos de graduação, o esforço de vocês está sendo recompensado, todas as horas de trabalho da qual se submeteram para que eu obtivesse minha formação será retornada a vocês, eterna gratidão, meus heróis, meu mais verdadeiro amor é todo de vocês. Agradeço as minhas irmãs Bruna e Vitória por toda a compressão e apoio despositados em mim, sem a força de vocês nada disso seria possível.

Agradeço em especial minha amiga de infância Ana Laura, por me ouvir e aconselhar, por muitas vezes ficar a noite toda acordada me esperando terminar o trabalho, por me acompanhar durante as prática, sempre me auxiliar e consolar quando necessário, não me deixando desistir, estarei sempre com você. Agradeço a todos que, neste período de tempo sempre, de alguma forma, me incentivaram e acreditaram no meu potencial em realizar coisas extraordinárias, parte de todo o esforço foi por vocês. Agradeço as perguntas, quase que frequentes, do Leonardo sobre meu TCC, me fazendo chorar mas ao mesmo tempo incentivando para que eu desse continuidade ao trabalho.

Agradeço a toda VI turma de biomedicina, pelas pessoas maravilhosas que conheci e levarei para vida toda, pelas historias e por todo o apoio durante esses anos. Vocês são apaixonantes.

Não poderia deixar de agradecer a minha dupla de realização deste trabalho, Tainá, por aceitar a minha amizade desde o inicio da graduação e concordar fazer parte desse fim de fase. Você sempre me motivou e mostrou que eu era capaz de realizar coisas que eu acreditava não ser possível, eu amo você.

Deixo aqui, nesses agradecimentos um alerta a atual sociedade, que vive de consumismo e desperdicio. Os alimentos são de grande importância para todos, é muitas vezes uma moeda de troca entre os favorecidos e os menos favorecidos, cabe a nós profissionais da saúde, buscar formas de preservar esses alimentos para que haja menos desperdício e busque nos mesmos, benefícios aos seres humanos, podendo ser utilizados e reutilizados em diversas matrizes, trazendo as gerações futuras, hábitos mais saudáveis. Análises de alimentos também é saúde publica, também é função de biomédicos.

“Eu aprendi que nunca somos pequenos demais para fazer a diferença.”

(THUNBER, Greta, 2018)

RESUMO

A levedura *Saccharomyces boulardii* utilizada nesse trabalho é conhecida como um probiótico devido às suas ações benéficas realizadas no trato gastrointestinal, auxiliando no tratamento e prevenção de distúrbios. Entretanto, para que ela mantenha todos os seus mecanismos de ação e promovam os efeitos desejados, elas necessitam se manter viáveis, uma característica que pode ser prejudicada pelo estresse oxidativo, causado por alguns processos industriais. O objetivo desse estudo foi verificar o efeito do antioxidante do extrato de acerola na viabilidade celular da *S. boulardii* perante estresse oxidativo. O extrato de acerola possui compostos fenólicos e ácido ascórbico que exibem capacidade de eliminar radicais livres junto com uma ação redutora, podendo reduzir os efeitos prejudiciais causados pelo estresse oxidativo. As células de *S. Boulardii*, com e sem adição de extrato de acerola, foram submetidas à estresse oxidativo químico pelo peróxido de hidrogênio e estresse oxidativo físico pela luz ultravioleta (UV), verificando a capacidade de resistência da levedura frente aos estresses oxidativos recebidos, e verificando a capacidade da mesma em resistir ao estresse oxidativo, porém com a incorporação do extrato de acerola ao meio como substância antioxidante, e analisando o potencial efeito do extrato de acerola como um antioxidante perante à aplicação dos estresses oxidativos submetidos a célula. Os resultados obtidos, apesar de serem estaticamente parecidos, revelaram que o extrato de acerola demonstrou uma potencial ação antioxidante, reduzindo os efeitos prejudiciais causados pelo estresse oxidativo nas células da levedura, tanto nos teste com peróxido de hidrogênio como principalmente nos testes com luz UV, essa última sofrendo um melhor efeito protetor, demonstrando que o extrato de acerola possui uma propensão de proteção maior em oxidações extracelulares, como ocorre na luz UV, comparado a oxidações intracelulares, como ocorre no peróxido de hidrogênio.

Palavras-chave: Probiótico. Antioxidante. Extrato de acerola. Estresse oxidativo. Viabilidade.

ABSTRACT

The *Saccharomyces boulardii* yeast, used in this work, is known as a probiotic due to its beneficial actions performed in the gastrointestinal tract, helping in the treatment and prevention of disorders. However, in order for it to maintain all its mechanisms of action and promote the desired effects, they need to remain viable, a feature that can be undermined by oxidative stress caused by some industrial process. The aim of this study is to verify the effect of acerola extract antioxidant on *S. boulardii* cell viability under oxidative stress. Acerola extract has phenolic compounds and ascorbic acid that exhibit the ability to eliminate free radicals together with a reducing action and may reduce the detrimental effects caused by oxidative stress. *S. boulardii* cells, with and without addition acerola extract, were subjected to chemical oxidative stress by hydrogen peroxide and physical oxidative stress by ultraviolet light (UV), verifying the yeast resistance capacity against the oxidative stress received, and verifying its ability to resist oxidative stress, but with the incorporation of the extract of acerola in the medium as an antioxidant in the application of cell-submitted oxidative stresses. The results obtained, although statistically similar, revealed that acerola extract showed a potential antioxidant action, reducing the detrimental effects caused by oxidative stress on yeast cells, both in hydrogen peroxide and UV light tests, this last has a better protective effect, demonstrating that acerola extract has a higher protection propensity in extracellular oxidation, as in UV light, compared to intracellular oxidation, as in hydrogen peroxide.

Keywords: Probiotic. Antioxidant. Acerola extract. Oxidative stress. Viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Meios YPD autoclavados e pronto para utilização.....	22
Figura 2 - Placas com meio YPD preparadas para utilização dos experimentos.	23
Figura 3- Suspensão de leveduras.....	24
Figura 4- Fluxograma de métodos.....	25
Figura 5- Início do tratamento das leveduras com H ₂ O ₂	Erro! Indicador não definido.
Figura 6- Placa com crescimento sendo submetidas a contagem	27
Figura 7 Fluxograma de métodos para o tratamento com H ₂ O ₂	28
Figura 8- Placas contendo a solução de leveduras submetidas a exposição a Luz UV.	30
Figura 9- Fluxograma de métodos para o tratamento com Luz UV	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Viabilidade da <i>Saccharomyces boulardii</i> submetidas ao estresse químico do peróxido de hidrogênio	31
Tabela 2. Viabilidade da <i>Saccharomyces boulardii</i> submetidas ao estresse físico causado pela luz – uv	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

μL - Microlitros

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B.O.D -

CPD's – Dímeros de pirimidina ciclobutano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ERO/ROS – Espécies reativas de oxigênio

FPS – Fator de proteção

g – Gramas

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IgA – Imunoglobulina A

L – Litro

mg – miligramas

mL - Mililitros

mM – Milimolar

°C – Graus Celsius

ppm – Partes por milhão

R.P. M – Rotação por minuto

UFC – Unidades formadoras de colônias

UV - Ultravioleta

YPD – Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	13
2.2 PREBIÓTICO, PROBIÓTICO, SIMBIÓTICO E SUA IMPORTÂNCIA	14
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E PRINCIPAIS CAUSAS DA SUA DIMINUIÇÃO.....	14
2.4 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS	16
2.5 <i>Saccharomyces boulardii</i> , UTILIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO.....	17
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
2.7 EXTRATO DE ACEROLA E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 PREPARO DE SOLUÇÕES	22
4.1.1 Salina 85%.....	22
4.1.2 Meio de cultura YPD.....	22
4.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO DE ACEROLA.....	23
4.3.1 Tratamento com H₂O₂.....	26
4.3.2 Tratamento com Luz UV	29
4.3.1 Delineamento experimental e análise estatística	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro (BURITI & SAAD, 2007). O reconhecimento de alimentos contendo probióticos em sua composição como alimentos funcionais, provê que além de benefícios da nutrição básica, possui um grande potencial na prevenção de doenças, o que têm incentivado a divulgação e o consumo desses produtos (KOURKOUTAS *et al.*, 2005, MACEDO *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de produtos contendo micro-organismos probióticos é um dos interesses das indústrias de alimentos. Geralmente, a produção destes contendo cepas probióticas específicas com concentrações apropriadas de células viáveis, durante a vida útil de um alimento, é um desafio tecnológico, visto que é inevitável a perda da viabilidade desses microrganismos durante várias etapas do processo de produção e armazenamento (BURITI & SAAD, 2007).

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura considerada um probiótico por fornecer benefícios aos seres humanos, obtendo sucesso quando utilizadas em prevenção e tratamento de doenças, reduzindo diarreias e promovendo ações imunoestimulantes e anti-inflamatórias na mucosa intestinal (AVILA *et. al.*, 2012), o que demonstra o interesse de pesquisadores em demonstrarem a sua aplicação, devido ao papel protetor, que a mesma apresenta, com atividades específicas contra vários patógenos entéricos (PIETRA PEDROSO, 2011).

As características mais importantes dos probióticos são a capacidade de resistir ao suco gástrico, sais biliares e às enzimas digestivas, aderir à mucosa intestinal, conviver com a microbiota intestinal endógena e produzir substâncias que inibem o crescimento de bactérias patogênicas. Estas características são específicas de cada cepa. Os efeitos benéficos atribuídos aos microrganismos probióticos têm sido alcançados principalmente através da modulação da população e atividade da microbiota intestinal (BURITI & SAAD, 2007; SOUZA, 2016).

A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, devendo ser estáveis quando aplicados nos alimentos e necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (acima de 10^6 UFC/ ml ou g) para apresentar efeitos fisiológicos benéficos ao consumidor (SOUZA, 2016).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), um produto considerado probiótico deve conter uma dose mínima diária da cultura probiótica de 10^8 e 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias), para ter um propósito terapêutico (BRASIL, 2008),

o que segundo estudos, corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (BURITI & SAAD, 2007). Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.

Os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações e comparadas com substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação destes e podem agir em diferentes níveis da sequência oxidativa, podendo ser classificados, de acordo com sua origem, em sintéticos ou naturais, os sintéticos são aqueles produzidos em laboratórios, tendo como base substâncias químicas, já os naturais são extraídos de matrizes orgânicas ou alimentares. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Durante sua ação, são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda de integridade celular (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A utilização de extratos e compostos de origem vegetal ricos em compostos fenólicos, com reconhecida atividade antioxidante, é uma alternativa promissora no mercado de alimentos e cosméticos, uma vez que consumidores estão em busca de produtos que se aproximem ao máximo do natural e que proporcionem benefícios específicos relacionados à saúde, além dos ligados à valorização da biodiversidade brasileira (FERRARI et al., 2007; ILHA et al., 2008; VIOLANTE et al., 2009; CERIELLO et al., 2016; GHOLAMIAN-DEHKORDI et al., 2017).

Entre as frutas tropicais, a acerola se destaca pela alta concentração de compostos com atividade antioxidante e em especial do ácido ascórbico. No Brasil seu plantio em larga escala começou em 1949, sendo que atualmente praticamente toda produção tem como fim o mercado interno. Ela é conhecida por ser uma planta rústica e resistente, propagando-se com facilidade em várias regiões com diferentes condições climáticas. O interesse pela acerola e os estudos sobre suas potencialidades econômicas só começaram a ser explorados nos anos 40, quando foi descoberto na porção comestível da fruta, altos teores de vitamina C. (ARAÚJO, 1994 ; LIMA et al., 2005; KUKOSKI et al., 2006; MELO et al., 2008; CANUTO et al., 2010).

Tendo em vista manter a viabilidade dos micro-organismos probióticos, de forma que mantenham sua atividade e importância fisiológica quando presentes no organismo humano, este trabalho objetivou avaliar o efeito protetor do extrato de acerola em relação a viabilidade da *Saccharomyces boulardii*, sendo submetida a diferentes estresses oxidativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VIABILIDADE DOS MICRO - ORGANISMOS PROBIÓTICOS

Os micro-organismos são as entidades mais antigas e numerosas do planeta. Sua presença e suas atividades são essenciais para o equilíbrio e funcionamento dos ecossistemas. Além disso, apresentam um papel importante como fontes genéticas contribuindo para o avanço biotecnológico e desenvolvimento econômico sustentável voltado para produções na área da saúde, agricultura e meio ambiente (DELLARETTI, 2014).

Além dessas utilizações, os micro-organismos também foram empregados durante processos para a preparação de alimentos e bebidas (PAZ DE ALMEIDA *et al.*, 2011). Os alimentos são de fundamental importância para a sobrevivência dos indivíduos contribuindo para seu desenvolvimento e crescimento. Desta maneira, foram criados alimentos que sanassem a quantidade de nutrientes necessárias ao ser humano e que simultaneamente apresentassem efeitos benéficos. Esse último pôde ser alcançado através da utilização de microrganismos (HUNGRIA & LONGO, 2009).

No caso dos micro - organismos probióticos, é necessário assegurar a sua viabilidade, sendo esta importante para que eles mantenham sua atividade no ecossistema gastrointestinal do hospedeiro e possuam a capacidade de resistir aos processamentos e estocagem do produto mantendo sua segurança e utilidade para o consumo humano (MELO *et al.*, 2016).

A viabilidade de um microrganismo nada mais é do que a sua capacidade de crescer e se desenvolver, mantendo todas as suas características e o seu funcionamento. Os probióticos considerados viáveis no organismo são aqueles que apresentam estabilidade frente ao ácido presente no estômago e a bile, com capacidade de adesão à mucosa intestinal com sua consequente colonização por pelo menos algum tempo, produção de compostos antimicrobianos, e metabolicamente ativos no intestino humano (COSTA, 2012).

A permanência da sua viabilidade apesar do seu isolamento ocorre por meio da preservação dos microrganismos, garantidas por meio de algumas técnicas como por exemplo e a mais comumente, a liofilização. Dessa maneira, é possível evitar que o microrganismo sofra mutações que levem a alterar suas características perdendo a sua finalidade (DELLARETTI, 2014).

O processo industrial, como o transporte das células e armazenamento, afeta de modo negativo a viabilidade das células, pois essa acaba sendo reduzida ou perdida durante o os

processos de fabricação, e devido a isso vários estudos sobre a sua melhoria vêm se tornando comum buscando aumentar o valor agregado do produto com a sua real viabilidade e eficácia dos microrganismos utilizados para a saúde humana (MELO *et al.*, 2016).

2.2 PREBIÓTICO, PROBIÓTICO, SIMBIÓTICO E SUA IMPORTÂNCIA

Probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Para um microrganismo ser considerado probiótico existem pré-requisitos e a viabilidade é um deles, em que, o número de células viáveis deve atender às concentrações exigidas e se manter até chegar ao ecossistema digestivo (OLIVEIRA, 2014; NOGUEIRA & GONÇALVES, 2011). A ANVISA determina que a quantidade mínima viável para os probióticos são entre 10^8 e 10^9 UFC (BRASIL, 2008).

Os probióticos, geralmente, são ingeridos por meio dos alimentos e com isso auxiliam na absorção dos nutrientes, são referidos como agentes bioterapêuticos e considerados como alimentos funcionais. A procura por alimentos funcionais vêm aumentando e o que aumenta o interesse em pesquisas para manter a viabilidade destes microrganismos (OLIVEIRA, 2014).

A definição de prebióticos é de que se trata de componentes alimentares não-digeríveis, que afetam benéficamente o hospedeiro pelo estímulo seletivo da proliferação de bactérias desejáveis. Os efeitos benéficos associados aos prebióticos incluem o efeito bifidogênico, aumento da absorção de cálcio, diminuição da translocação bacteriana diminuindo conseqüentemente o risco de câncer de cólon, entre outros (OLIVEIRA, 2014; SAAD, 2006).

A associação dos probióticos com os prebióticos, dá origem a um produto denominado simbiótico, capaz de aumentar as chances de crescimento e colonização das bactérias probióticas no organismo humano (OLIVERA, 2014; NOGUEIRA & GONÇALVES, 2011; SAAD, 2006). Na aplicação de simbióticos em alimentos, o ideal é que o ingrediente selecionado seja um substrato metabolizável pelo microrganismo probiótico no intestino, possibilitando o aumento na capacidade de sua sobrevivência (OLIVEIRA, 2014).

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E PRINCIPAIS CAUSAS DA SUA DIMINUIÇÃO

A formação da microbiota normalmente ocorre no momento do nascimento através da passagem pelo canal do parto, entrando em contato imediatamente com os micro-organismos

da mãe e continua posteriormente, atingindo seu ápice em torno dos dois anos de idade (MURRAY, 2007). Embora de base estável, a microbiota do organismo humano mantém ao longo da vida de um indivíduo um contínuo fluxo, determinado por fatores como idade, dieta, alterações hormonais, saúde e higiene pessoal, que contribuem diretamente para alterar quantitativamente e qualitativamente a microbiota (PINTO, 2004; MURRAY, 2007; INGRAHAM & INGRAHAM, 2010; LOURENÇO, 2012).

A maioria dos micro-organismos encontrados na microbiota comensal são bactérias. A relação que estes microrganismos estabelecem com o hospedeiro é chamada de comensalismo, se for mutuamente benéfica ou beneficiarem - se da relação sem causar danos. Existem também os patogênicos oportunistas, que causam infecções caso haja alterações da flora residente, e os patogênicos obrigatórios, cuja presença origina sempre danos no hospedeiro (LEVINSON & JAWETZ, 1998; FORBES & SAHM, 2004; PINTO, 2004; LOURENÇO, 2012).

As bactérias que integram o trato gastrointestinal são em sua maioria anaeróbicas e exerce o papel de proteção, impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas que geralmente são ocasionadas pelo desequilíbrio da microbiota e que desempenham um papel-chave na digestão dos alimentos ao torná-los assimiláveis pelo organismo. A microbiota intestinal tem várias funções que são bem estabelecidas, sendo importantes as de proteção anti-infecciosa que fornecem resistência à colonização por micro-organismos exógenos; a imuno-modulação, que possibilita uma ativação das defesas imunológicas e, por fim, a contribuição nutricional resultante das interações locais e dos metabólitos produzidos oferecendo fontes energéticas e de vitaminas (FROTA et al., 2015).

As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência sobre tudo em determinados grupos etários (crianças e idosos), estas podem ser causados por parasitas, mas há uma grande família de bactérias enteropatogênicas que são capazes de acometer o organismo humano. Os agentes patogênicos quando adquiridos são rapidamente eliminados devido à presença da microbiota comensal. No entanto, ao obter uma quantidade significativa de bactérias patogênicas como a *Salmonella* spp., *Vibrio* ou *Estafilococcus*, podem induzir uma desordem na microbiota natural, burlando assim os mecanismos de defesa, gerando sintomas clínicos (VANDENPLAS, 2009; De AGUIAR, 2009; BARON, 1996).

Um dos fatores que tem importante contribuição para o desequilíbrio da microbiota intestinal é a má digestão, em que o estômago produz ácido suficiente para extinguir as bactérias patogênicas ingeridas na maioria das vezes com alimentos. Além disso, outros

fatores que também têm importância clínica são o abuso do laxante, o consumo excessivo de alimentos crus, exposição com frequência a toxinas ambientais, uso prolongado de antibióticos, que causa uma seleção a bactérias mais adaptadas permitindo sua propagação, disponibilidade de material fermentável e o estado imunológico do hospedeiro (PAIXÃO & CASTRO, 2016).

Diante das alterações metabólicas e das modificações na microbiota intestinal que ocorrem em indivíduos saudáveis ou não, a utilização de probióticos na modulação dessas condições surge como estratégia coadjuvante na prevenção e tratamento dessa condição clínica. Estudos que avaliam a ação desses compostos são fundamentais para verificar os efeitos e/ou mecanismos de ação nas alterações metabólicas e na microbiota intestinal (FROTA *et al.*, 2015).

Os probióticos, e também os prebióticos, apresentam características funcionais que colaboram com a melhoria da microbiota intestinal do cólon e o equilíbrio da manutenção da saúde. Probióticos, por sua vez, tendem a agir mutuamente com as bactérias comensais quando administrados em quantidades adequadas e são caracterizados e indicados para preservar e reestabelecer a homeostase do intestino. A ação dos probióticos sobre o trato gastrointestinal inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos. São utilizadas em sua maioria bactérias ácido-láticas e bifidobactérias, podendo ser úteis também certos fungos e leveduras principalmente a *Saccharomyces boulardii* (WAGNER *et al.*, 2018).

2.4 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS

Os probióticos ainda não possuem um mecanismo de ação muito esclarecido, porém sugerem que esses podem atuar independentemente ou associados (COPPOLA & TURNES, 2004). Seu principal foco de atuação é por meio da modulação da microbiota intestinal e a melhoria da barreira da mucosa intestinal impedindo que patógenos alcancem a corrente sanguínea. Ou seja, de modo geral os seus mecanismos de ação são formas pelas quais foram desenvolvidas pelos microrganismos benéficos no intuito de resistirem ao crescimento excessivo e o estabelecimento de cepas invasoras (BUSANELLO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2010).

Um dos mecanismos mais apontados é a exclusão competitiva, a qual o probiótico irá competir por sítios de fixação e nutrientes com micro-organismos patogênicos, impedindo que

esses últimos se liguem e acarretem problemas ao indivíduo. Esse mecanismo pode explicar a necessidade de administração de doses recorrentes de probióticos, para que esses continuem atuando benéficamente no indivíduo (SOUZA *et al.*, 2010).

Os mecanismos também agem trazendo um efeito nutricional mediante a influência na permeabilidade do epitélio intestinal, proporcionando maior eficiência na digestão e absorção de nutrientes e evitando que patógenos utilizem aminoácidos, minerais e carboidratos para fermentação e produção de toxinas (BUSANELLO *et al.*, 2012).

Esses micro-organismos benéficos podem afetar os patógenos por meio de outros mecanismos que sintetizam substâncias como bacteriocinas, ácidos graxos voláteis e peróxido de hidrogênio. Além desses, podem provocar efeitos sobre o metabolismo celular por meio da redução da concentração de amônia no organismo e liberação de enzimas como a lactase (COPPOLA & TURNES, 2004).

São discutidos alguns efeitos anticarcinogênicos promovidos por eles, em razão da inibição de enzimas pro-carcinogênicas ou a estimulação do sistema imune do hospedeiro. Essa última pode ocorrer mediante a indução de citocinas anti-inflamatórias, estímulo do aumento da atividade de macrófagos ou pelo aumento da produção de IgA secretora (BUSANELLO *et al.*, 2012; COPPOLA & TURNES, 2004; SOUZA *et al.*, 2010).

2.5 UTILIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA *Saccharomyces boulardii*

Originalmente, a *Saccharomyces Boulardii* foi descoberta em 1923 por Henri Boulard, um microbiologista francês que estava trabalhando na Indochina, quando observou que os moradores locais consumiam um chá feito com as frutas da região, como a lichia e o mangostão, para afastar a diarreia causada por algumas doenças. Destas frutas, Boulard conseguiu isolar a cepa da levedura *Saccharomyces*. Após a descoberta da *S. boulardii*, cientistas europeus começaram a estudar suas propriedades e encontraram evidências de que poderia ser útil no combate a organismos patogênicos (LENABURG *et al.*, 2016; CLOUATRE, 2011; GRAFF *et al.*, 2008). Atualmente os estudos realizados com as leveduras *Saccharomyces boulardii* são afim de conhecer melhor seus mecanismos e efeitos na saúde do homem.

A levedura *Saccharomyces boulardii* é considerada como um dos poucos micro-organismos capazes de ser utilizado como probiótico, não possuindo origem humana. Ela pode ser aplicada em medicações promovendo efeitos em distúrbios gastrointestinais e até

mesmo em tratamentos de algumas doenças como a de Crohn. Ela é ingerida por via oral e percorre pelo tubo digestivo atingindo grandes concentrações no cólon, porém não o coloniza e permanece por poucos dias no organismo (MARTINS *et al.*, 2005).

A *Saccharomyces boulardii* pode ser encontrada em suplementos probióticos, com o objetivo de melhorar a saúde geral do trato intestinal humano. Também serve para proteger as paredes intestinais, aderindo a elas e bloqueando as bactérias nocivas. Estudos mostraram que a *Saccharomyces boulardii* pode apresentar eficiência terapêutica como um “imunobiótico”, um termo proposto para definir cepas microbianas que podem promover a saúde do sistema imunológico de dentro do intestino e melhorar a saúde geral do corpo (CZERUCKA & PICHE., 2007).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, sendo causado pelo aumento do primeiro, gerando substâncias conhecidas como radicais livres, os quais podem acarretar diversos problemas à célula. No entanto, são desenvolvidos os antioxidantes como mecanismos protetores, neutralizando os compostos reativos e prevenindo os efeitos adversos do estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo ocorre durante o processo conhecido como cadeia respiratória, cuja finalidade é a produção de energia para a sobrevivência da célula. Essa possui uma sequência de reações onde seus produtos gerados são eletronegativos, e esses terão alguns de seus elétrons transferidos para a molécula de oxigênio, resultando nas chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO), que incluem o ânion superóxido, o radical hidropéroxila, e o radical hidroxila, conhecidos como radicais livres, e o peróxido de hidrogênio (CATANIA; BARROS & FERREIRA, 2009).

Os radicais livres foram designados como grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não pareados em sua camada orbital externa, o que gera uma instabilidade. Eles podem ser gerados no citoplasma, na mitocôndria ou na membrana plasmática (UFRGS, 2017). Sua formação ocorre por meio da transferência de elétrons entre moléculas devido ao metabolismo celular ou pela exposição à fatores exógenos.

Além disso, se caracterizam pelo tempo de vida curto e possuem a capacidade de reagir com outras moléculas para conseguir alcançar a sua estabilidade, resultando na oxidação de biomoléculas. Esse fato é responsável por causar danos celulares irreparáveis como mutagênese e envelhecimento biológico que atingem o DNA, proteínas, lipídeos, carboidratos

e vitaminas (BIANCHI & ANTUNES, 1999). E cada vez mais há evidências científicas de que o estresse oxidativo desempenha importante papel na etiologia de algumas doenças como aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (BARBOSA *et al.*, 2008).

2.7 EXTRATO DE ACEROLA E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Uma das possíveis fontes de antioxidante naturais são as frutas tropicais, cujo consumo é crescente devido seu caráter promissor como fontes de nutrientes essenciais como vitaminas, minerais e fibras, além de apresentarem em sua composição compostos secundários como os ácidos fenólicos, estes envolvidos com a atividade antioxidante (EÇA, 2015).

Entre essas frutas tropicais, se encontra a acerola (*Malpighia emarginata* D. C.), uma fruta pequena e avermelhada, originária do mar das Antilhas e cultivada em regiões dos Estados Unidos e Japão, no Brasil além de ser amplamente consumida é de fácil plantio, porém são poucos os estudos sobre as propriedades desta fruta. (FREITAS *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2007).

A acerola atrai o interesse de produtores de diversas regiões do Brasil pelo seu potencial como fonte natural de vitamina C, flavonoides, carotenoides e antocianinas e pela possibilidade de aproveitamento industrial, conferindo-lhe uma relevante importância econômica. Durante o processo de maturação uma série de mudanças na composição química ocorre nos frutos de acerola, levando à formação e à degradação de compostos que desempenham papel fundamental na atividade antioxidante. Devido a isso, as variações na composição química da fruta têm sido tema de muitas pesquisas. A acerola é também uma boa fonte de β -caroteno, quando comparada com os demais frutos (FREITAS *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2007; CRUZ, 2017).

Devido aos malefícios gerados pelos radicais livres, necessitou-se de uma forma para interromper suas atividades, e isso foi obtido através de substâncias conhecidas como antioxidantes. Esses são classificados em sintéticos e naturais, sendo o primeiro muito usado pelas indústrias, porém podem provocar danos à saúde do consumidor. Portanto, os antioxidantes sintéticos estão sendo substituídos pelos naturais, e são provindos da extração de plantas e vegetais (JARDINI, 2010; CRUZ, 2014; EÇA, 2015).

Os antioxidantes também são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação. Dentre eles, o primário é aquele no qual há a promoção da remoção ou inativação dos radicais

livres durante a fase de iniciação ou propagação da reação, por meio da doação de átomos de hidrogênio, interrompendo a reação em cadeia (CRUZ, 2014).

Os sinergistas são substâncias que não possuem ação antioxidante ou a possui em pouca quantidade, mas realça os efeitos das atividades de outros antioxidantes. Os removedores de oxigênio têm como papel capturar átomos de oxigênio presentes no meio, evitando a ocorrência das reações oxidativas.

Os antioxidantes biológicos são grupos de enzimas capazes de remover oxigênio ou compostos altamente reativos. Os agentes quelantes complexam íons metálicos e ferro, responsáveis por catalisar a oxidação lipídica por meio da complexação. E a última classe dos antioxidantes são os mistos, compostos de substâncias de origem vegetal e animal (DOSSIÊ ANTIOXIDANTES, 2009).

Como dito anteriormente, alguns antioxidantes são oriundos de plantas, utilizando os seus frutos, como no caso da acerola. Essa fruta é de fácil obtenção e pode ser encontrada em várias regiões do Brasil. Ela é rica em vitamina C, flavonoides, carotenoides e antocianinas, o que lhe confere um grande interesse para as indústrias alimentícias. Durante a sua maturação ocorrem mudanças em sua composição química responsáveis por gerar a formação e degradação de compostos que desencadeiam um papel muito importante reconhecidos nas atividades antioxidantes (FREITAS *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2007; CRUZ, 2017).

A utilização de extratos e compostos de origem vegetal ricos em compostos fenólicos e com atividade antioxidante reconhecida, vem se tornando uma alternativa promissora no mercado de alimentos, uma vez que estes produtos atende a busca dos atuais consumidores por produtos mais naturais, além de oferecerem benefícios à saúde (GHOLAMIAN – DEHKORDI *et al.*, 2017; CERIELLO *et al.*, 2016; VIOLANTE *et al.*, 2009; IHA *et al.*, 2008; FERRARI *et al.*, 2007).

Os extratos de acerola possuem comprovada atividade antioxidante, podendo ser utilizados nas indústrias com o intuito de conferir ao produto uma extensão da vida útil e proteção à inibição dos efeitos de oxidação, por meio do seu mecanismo de ação já anteriormente citado. Entende-se que são necessários mais estudos afim de conferir a sua segurança e adequadas concentrações, entretanto, é vasto o campo de utilização em que estes podem ser aplicados, reduzindo a quantidade de substâncias químicas utilizadas, proporcionando a elaboração de produtos com altos níveis de qualidade, capazes de fornecem benefícios aos seres humanos e trazer rentabilidade as indústrias. (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O seguinte trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da *Saccharomyces boulardii* frente ao estresse químico causado pela luz UV e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), incorporando extrato de acerola ao meio como substância antioxidante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade da *Saccharomyces boulardii* de se manter viável frente a submissão de estresse oxidativo como incidência de luz e exposição ao H₂O₂ (peróxido de hidrogênio).
- Determinar o efeito antioxidante do extrato de acerola na diminuição do estresse oxidativo provocado pela incidência de luz e exposição ao H₂O₂ (peróxido de hidrogênio).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DE SOLUÇÕES

4.1.1 Salina 85%

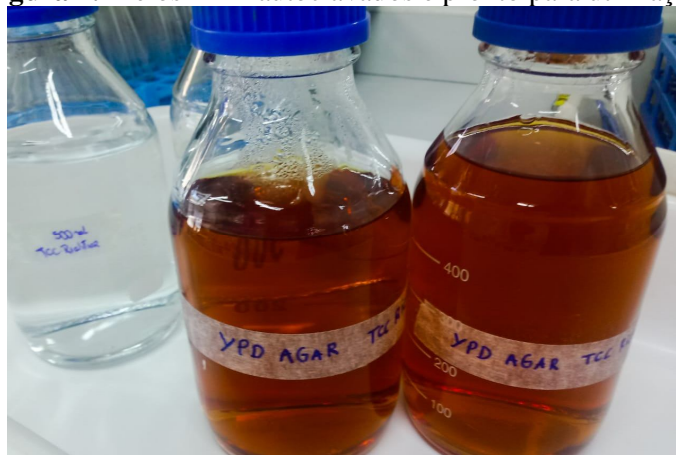
Para 1 L de solução salina estéril, em um balão de 1 L foram adicionados 8,5g de NaCl e o volume aferido com água destilada sendo posteriormente homogeneizada. A solução então foi adicionada em um tubo contendo tampa e levado para autoclavagem durante uma hora a 120°C para sua esterilização.

4.1.2 Meio de cultura YPD

O meio conhecido como Yeast Peptone Dextrose (YPD) foi preparado em duas formas: líquida e ágar. Para o meio líquido foi preparado o total de 1L contendo 1% de extrato de levedura, 2% de dextrose, e 2% de peptona. Portanto, adicionou-se 10g de extrato de levedura, 20g de dextrose, 20g de peptona, os diluindo em 1L de água destilada.

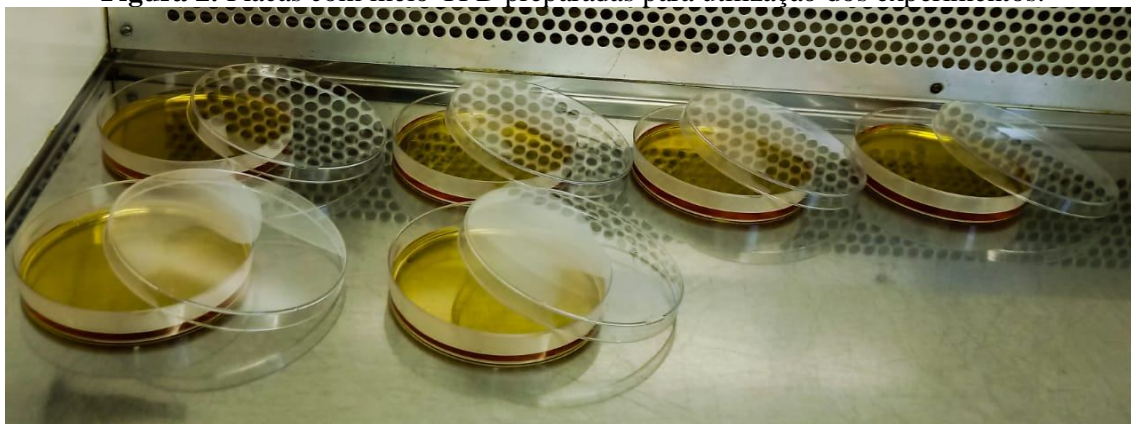
Para o ágar também foi preparado 1L de solução utilizando-se as mesmas medidas de extrato de levedura, dextrose e peptona, acrescentando 2% de ágar bacteriológico, somando 20g desse. Todos esses foram dissolvidos em 1L de água destilada. Tanto o meio líquido, como mostra a Figura 1, quanto o ágar YPD, representando na Figura 2, foram adicionados em tubos contendo tampa e levados para autoclavagem para sua esterilização durante uma hora a 120°C (TRINDADE, 2016).

Figura 1. Meios YPD autoclavados e pronto para utilização.



Fonte: Elaborado pelas autoras.

Figura 2. Placas com meio YPD preparadas para utilização dos experimentos.



Fonte: Elaborado pelas autoras.

4.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO DE ACEROLA

As amostras de acerolas foram coletadas na região de Bauru, no período entre novembro de 2018 e janeiro de 2019, em residências domésticas, sendo escolhidos os frutos já maduros (vermelhos). As amostras foram lavadas com água corrente, cortadas com facas de cozinha em quatro e secas em estufa com circulação forçada de ar à 50°C por 3 dias, homogeneizando as amostras uma vez por dia para secagem completa. Após a secagem, as amostras foram trituradas em liquidificador industrial (M Vithory 800W) por 5 minutos, obtendo-se um pó fino e uniforme.

A produção dos extratos ricos em antioxidantes seguiu a metodologia proposta por Cruz (2017), em que preparou - se uma solução na proporção de 1:60 de acerola em pó e água destilada, sendo esta adicionada em erlenmeyer e em seguida mantida sob agitação média durante 1 hora. Em seguida a mistura de acerola em pó e água foi filtrada com o auxílio de um papel filtro, obtendo-se então o extrato que apresentava 10mg de extrato seco por mL de solução estes foram armazenados em congelador (-15°C) até o momento das análises.

4.3 PREPARAÇÃO DAS CEPAS DE LEVEDURA E TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) E LUZ UV

As cepas utilizadas neste estudo são as *Saccharmyces boulardii*, adquiridas comercialmente em farmácias populares, como Floratil® em cápsulas de 100 mg contendo,

segundo o rótulo, no mínimo $0,5 \times 10^9$, células e excipientes como estearato de magnésio, lactose e sacarose.

Seguindo a metodologia descrita por Cruz et. al (2019), com algumas modificações, as células de leveduras foram suspensas em solução salina até sua completa dissolução (Figura 3), em seguida foram inoculadas em placa de Petri com meio de cultura YPD por esgotamento e encubadas em estufa B.O.D (Demanda Biológica de Oxigênio) por 48 horas á 35°C, para o isolamento de colônias características da levedura *Saccharomyces boulardii* Posteriormente, foi retirada da placa uma colônia isolada de levedura e adicionada a um Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo YPD, levados a estufa encubadora de agitação, por 48 horas com temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, sendo esta etapa o pré- crescimento das leveduras.

Figura 3. Suspensão de leveduras

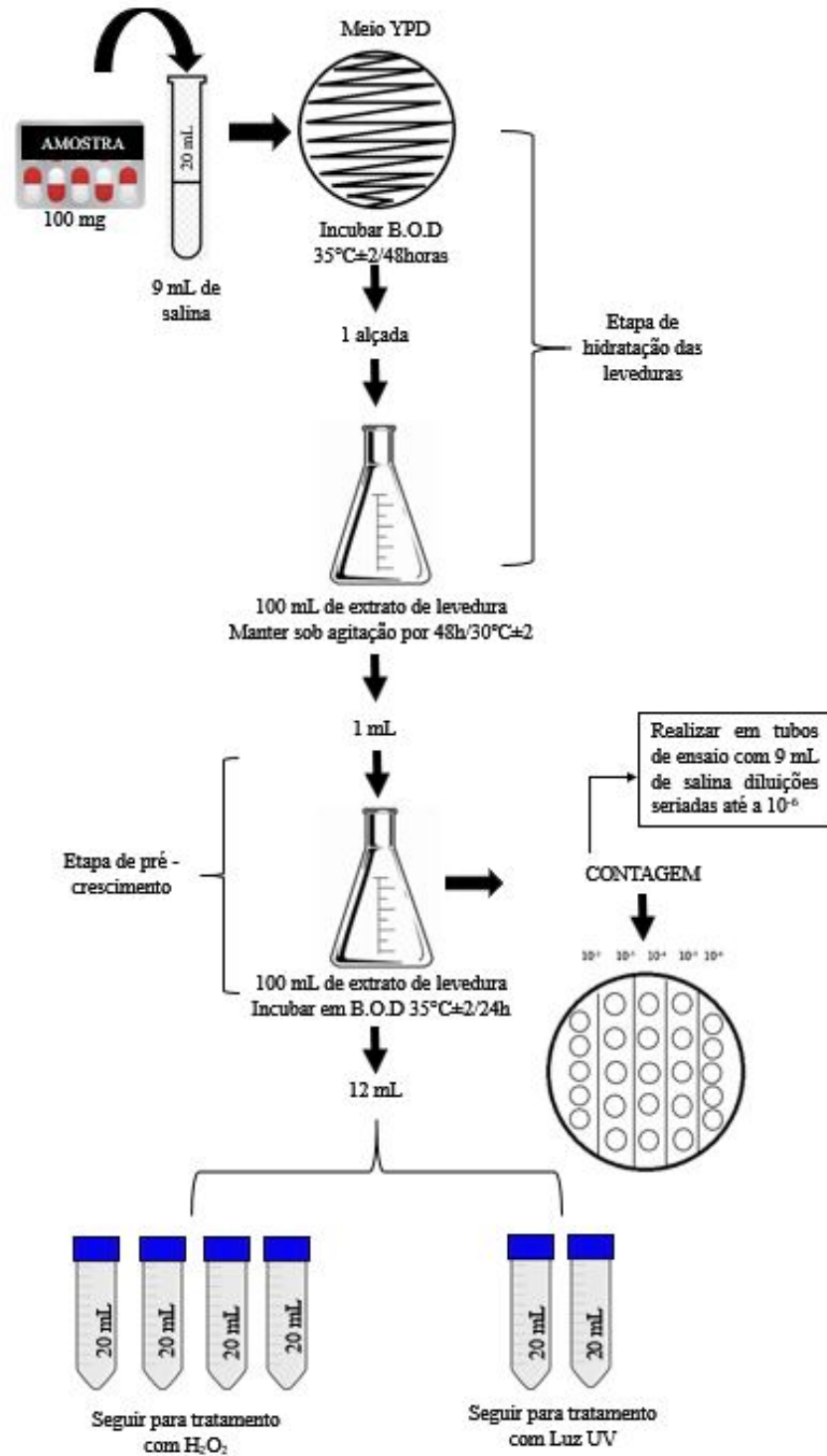


Fonte: Elaborado pelas autoras.

Deste Erlenmeyer, foi retirado 1 mL de solução de levedura e transferidos a outro Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo YPD, incubando esta solução de levedura em B.O.D (TECNAL) por mais 24 horas. Foram preenchidos 6 (seis) tubos do tipo Falcon com 12 mL de solução de levedura, sendo centrifugados (Centrífuga Excelsa II FANEM Mod. 206 BL) por 10 minutos a 3600 RPM.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, ressuspensão o “pellet”, que é o concentrado de células viáveis, com o mesmo volume de solução salina, dando assim, início aos tratamentos, como demonstrado na Figura 4 – Fluxograma de métodos.

Figura 4. Fluxograma de métodos



Fonte: Elaborado pelas autoras.

A preparação dos grupos controles, compostos apenas pelas cepas da levedura *S. Boulardii* e salina, não recebendo nenhum tipo de agente estressor e/ou antioxidante, foram preparadas e inoculadas em meio de cultura YPD por meio da técnica de microplaqueamento. O grupo controle é fundamental para a realização dos testes, ele vai indicar a viabilidade do microrganismo testado de acordo com as condições normais, sendo utilizado como um comparativo com os demais grupos.

Para cada teste, realizou – se duplicatas, mantendo as mesmas condições, concentrações e seguindo a mesma metodologia.

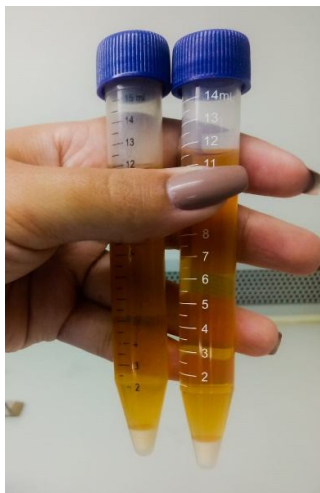
4.3.1 Tratamento com H₂O₂

Para o estresse com H₂O₂, este foi adicionado para se obter uma concentração de 8 mM nos ensaios, no primeiro tubo tipo Falcon, ao “pellet” de leveduras foi adicionado solução salina completando o volume para 12 mL (conforme o volume inicial antes da centrifugação) .

No tratamento utilizando o peróxido de oxigênio e o extrato de acerola, foi adicionado ao “pellet” o extrato de acerola para também atingir 500ppm acrescentando H₂O₂ em 8mM e completando o volume com solução salina. No último ensaio, foi adicionado somente o H₂O₂ até 8mM e completou o volume com solução salina.

Todos os tubos foram vortexados nesta etapa e deixados em repouso por 30 minutos, centrifugados novamente em Centrífuga (Excelsa II FANEM Mod. 206 BL) por 10 minutos a 3600 RPM. Para cada tubo foram realizadas diluições seriadas em tubos Eppendorf de 1,5mL, procedeu - se diluições seriadas, até atingir a diluição para -5 (Figura 5).

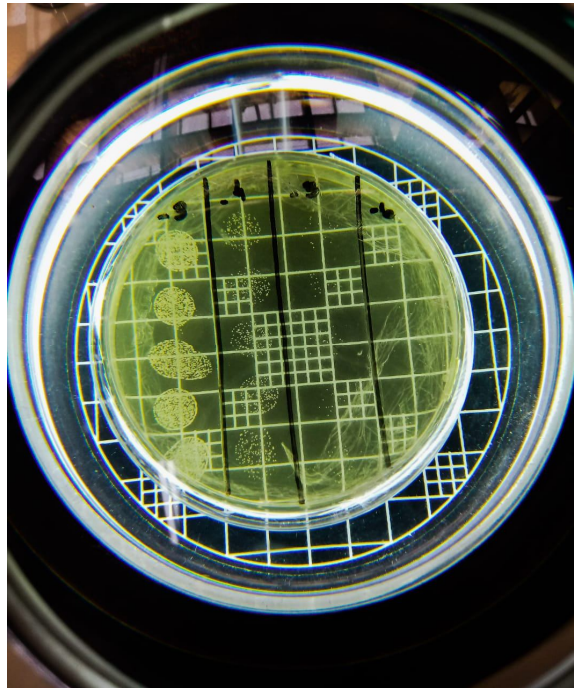
Figura 5. Início do tratamento das leveduras com H₂O₂



Fonte: Elaborado pelas autoras.

Foi realizado o microplaqueamento, até a diluição 10^{-5} , em ágar YPD. Para isso de cada diluição contida no Eppendorf foram retirados 10 μ L e colocados sob o meio em sua respectiva diluição, formando uma única gota esta foi mantida em capela com circulação de fluxo laminar até a secagem das gotas. As placas foram incubadas e mantidas na B.O.D (TECNAL) a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por cerca de 24 horas, realizando a contagem das colônias em Contador de Colônia (PHOENIX CP608) na diluição que apresentou crescimento entre 25 e 250 UFC (Figura 6). Esta metodologia está ilustrada na Figura 7.

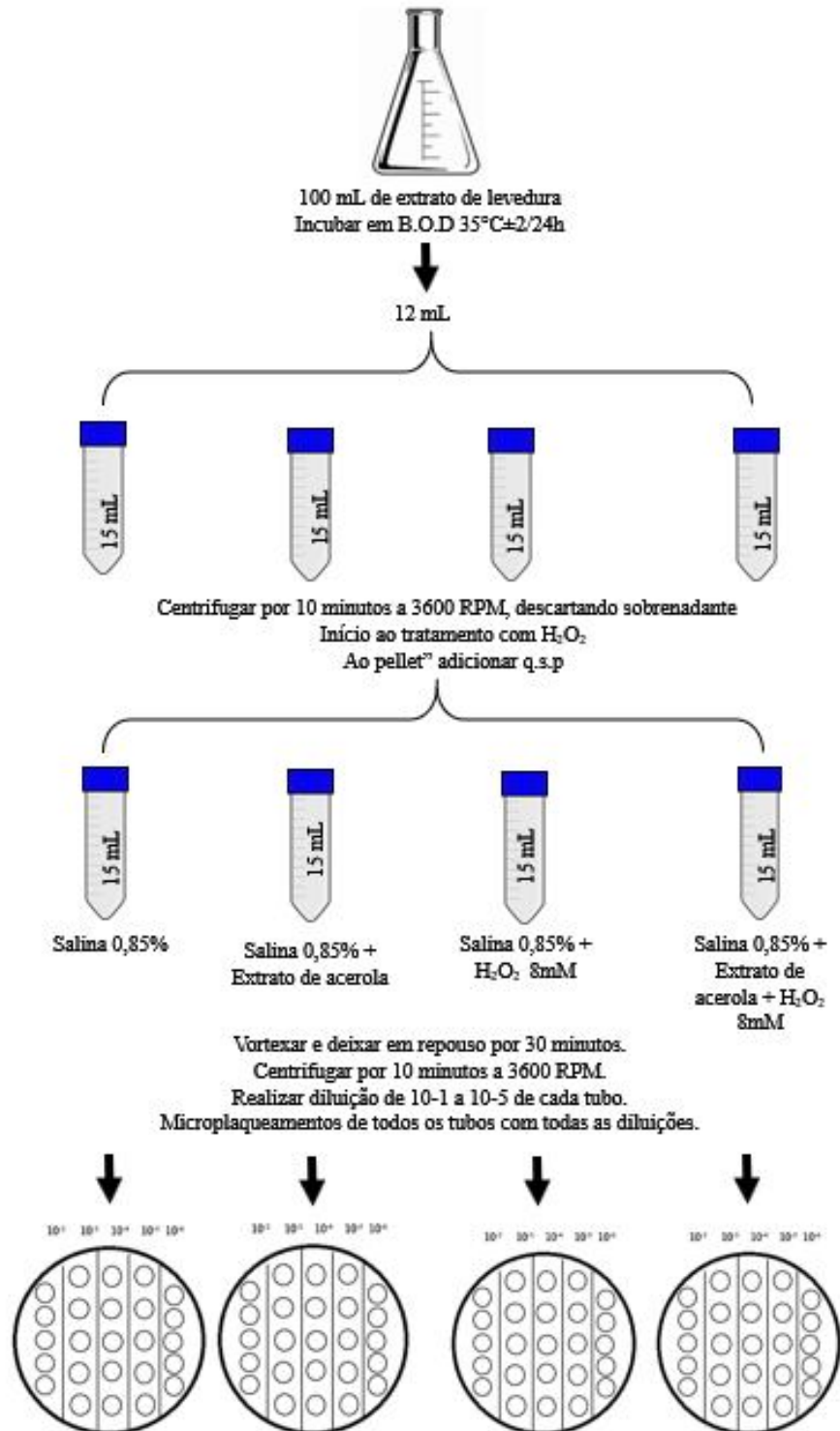
Figura 6. Placa com crescimento sendo submetidas a contagem



Fonte: Elaborado pelas autoras.

Os testes realizados para a avaliação da viabilidade da *S. Boulardii* frente ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 foram realizados em duplicatas, repetindo os procedimentos com o cuidado de manter as mesmas condições. Cada tubo destinado ao teste com peróxido de hidrogênio seguiu um tratamento específico, como demonstrado na figura 7.

Figura 7. Fluxograma de métodos para o tratamento com H_2O_2



Fonte: Elaborado pelas autoras.

O primeiro grupo, conhecido como grupo controle, é composto por cepas da levedura e solução salina 0,85%, e não recebeu nenhum tipo de agente estressor e/ou antioxidante,

sendo fundamental para a realização dos testes, indicando quanto o microrganismo testado pode crescer e se manter nessas condições normais. O grupo controle é usado como um comparativo com os demais grupos, tendo os seus resultados comparados. O segundo grupo continha salina 0,85%, células viáveis e extrato de acerola, avaliando o efeito que o extrato de acerola poderia causar nas células. O terceiro grupo, além da solução salina 0,85% e células viáveis, recebeu uma concentração de peróxido de hidrogênio, com o intuito de avaliar o seu efeito na viabilidade das células. O último grupo, composto de solução salina 0,85% e células viáveis com adição de peróxido de hidrogênio e extrato de acerola, possuía a finalidade de avaliar a proteção do extrato de acerola na viabilidade celular, verificando o seu potencial antioxidante diante a oxidação causada pelo peróxido de hidrogênio.

4.3.2 Tratamento com Luz UV

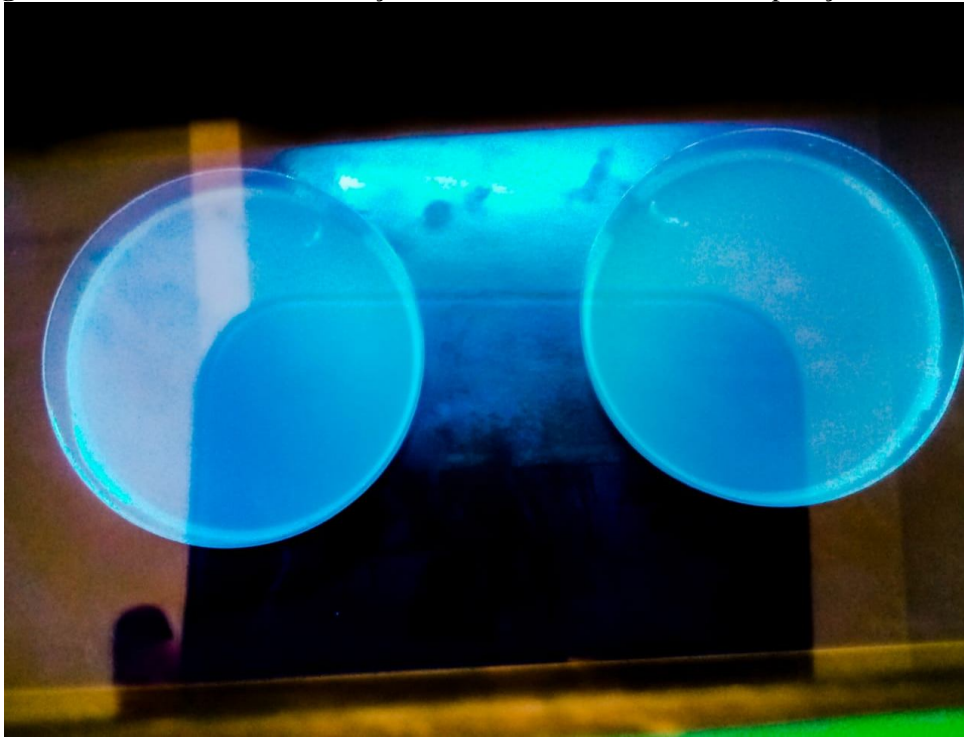
Para o tratamento com a Luz UV utilizou – se a mesma solução de levedura obtida ao final do Preparo das cepas e leveduras, item 4.3. Foi preparado adicionando-se extrato de acerola até atingir a concentração final de 500 ppm, sendo o volume completando com solução salina. No segundo tratamento adicionou – se apenas o mesmo volume de salina no pellet de leveduras e em seguida foi realizado o estresse.

Cada tubo foi adicionado a uma respectiva placa de Petri estéril e submetidos a câmara de luz em 365 nm (Marconi), por 10 minutos (Figura 8). Após a exposição as placas foram retiradas e realizadas microdiluições seriadas em tubo do tipo Eppendorf de 1,5 ml até atingir a diluição de 10^{-5} para microplaqueamento e avaliação da viabilidade da *S. boulardii* frente ao estresse causado pela Luz UV.

O microplaqueamento e incubação foram realizados em meio ágar-YPD conforme descrito 4.3.1

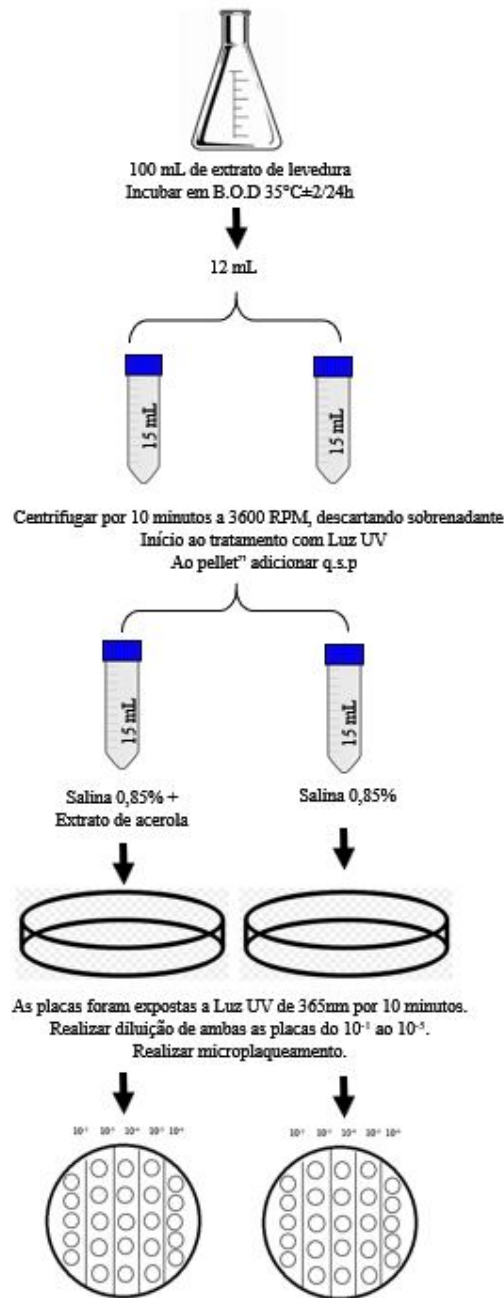
Os testes realizados para a avaliação da viabilidade da *S. boulardii* frente ao estresse físico-químico causado pela Luz – UV é apresentado na Figura 9.

Figura 8. Placas contendo a solução de leveduras submetidas a exposição a Luz UV.



Fonte: Elaborado pelas autoras.

Figura 9. Fluxograma de métodos para o tratamento com Luz UV



Fonte: Elaborado pelas autoras.

4.3.1 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido de forma inteiramente casualizada em quintuplicata e duas repetições. As médias foram submetidas a análises estatísticas pelo teste de tuckey a 5% de probabilidade para avaliar possíveis diferenças entre elas pelo programa R.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) consegue reagir com metais de transição parcialmente reduzidos como o Fe^{2+} ou Cu^+ , formando um radical hidroxila extremamente reativo que induz a oxidação intracelular, comprometendo assim a viabilidades das células. O intuito desses testes foi verificar o poder antioxidante do extrato de acerola, visando o efeito de melhorar a capacidade de sobrevivência celular.

Os resultados obtidos para a viabilidade celular (UFC/mL) de *S. Boulardii* submetidas ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ao possível potencial antioxidante do extrato de acerola, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade das *Saccharomyces boulardii* submetidas ao estresse químico do peróxido de hidrogênio.

Tratamentos	Viabilidade celular (UFC/mL)
Controle	$2,0 \times 10^6 \pm 4,9^a$
Extrato de acerola 500 ppm	$2,4 \times 10^6 \pm 5,2^a$
H_2O_2 8Mm	$1,3 \times 10^6 \pm 7,1^a$
H_2O_2 (8mM) + Extrato de acerola 500 ppm	$2,0 \times 10^6 \pm 5,2^a$

Fonte: De autoria própria.*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 1, são referentes ao comportamento das células de *S. boulardii* submetidos ao estresse oxidativo por meio da aplicação de H_2O_2 . Apesar de todos os tratamentos não apresentarem diferenças significativas ($p > 0,05$) as amostras foram analisadas de forma descritiva.

Apesar dos valores serem numericamente iguais, o grupo tratado com o antioxidante provindo do extrato de acerola, não submetidos ao estresse oxidativo, apresentou maior tendência em aumento da viabilidade ($2,4 \times 10^6$ UFC/mL) quando comparando ao grupo controle ($2,0 \times 10^6$ UFC/mL). O grupo com a adição do extrato de acerola e submetido ao estresse oxidativo com H_2O_2 , obteve viabilidade celular de $2,0 \times 10^6$ UFC/mL, essa, maior em comparação com o grupo submetido ao peróxido de hidrogênio e sem tratamento com antioxidante ($1,3 \times 10^6$ UFC/mL).

Os grupos que receberam o peróxido de hidrogênio não demonstraram valores significativos na redução da viabilidade celular, podendo esse fato ser explicado por dois

motivos: a existência de um mecanismo de defesa da própria célula, reduzindo assim os danos causados pelo composto, ou, pela concentração de agente estressor baixa, não sendo o suficiente para estabelecer uma relação de estresse oxidativo.

Com os resultados obtidos, apesar de estatisticamente iguais, é possível verificar que o antioxidante utilizado para o tratamento das células apresentou uma tendência em aumentar a viabilidade celular das leveduras protegendo as mesmas dos danos causados pelo estresse oxidativo, o qual é responsável pela diminuição da viabilidade celular, esse fato podendo ser demonstrado pela análise do grupo submetido ao seu efeito e sem tratamento com antioxidante, apresentando menor viabilidade celular. Além disso, o grupo tratado com antioxidante e não submetidos ao estresse oxidativo, revelaram uma viabilidade celular maior em comparação ao controle, indicando mais uma vez, a eficiência da ação do composto antioxidante.

Com base na metodologia adotada por Cruz (2019), foi avaliada a viabilidade de leveduras *S. cerevisiae* aplicando antioxidantes de extrato de acerola e antioxidantes sintéticos (BHT e BHA), sendo submetidos ao peróxido de hidrogênio, onde o uso do extrato de acerola demonstrou um efeito antioxidante baixo, porém apresentou resultados melhores em comparação com o uso de BHA, esse, causando efeitos danosos as células do microrganismo. Com base nisso e nos resultados apresentados, é possível avaliar que a *S. boulardii* apresentou uma resistência maior ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio quando comparado a espécie *S. cerevisiae*. Além disso, o antioxidante presente no extrato de acerola pode manifestar efeitos benéficos, mantendo a viabilidade celular e trazendo resultados de maior potencial quando em comparação a outros tipos de antioxidantes aplicados em testes *in vivo*.

A luz ultravioleta é parte integrante da radiação solar, tendo a sua ação relacionada a alterações causadas, principalmente, pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) gerando danos aos tecidos celulares. é o agente físico capaz de lesionar o DNA a que estamos mais expostos. As ERO's reduzem a quantidade de antioxidante endógenos, podendo ainda atuar como oxidantes de lipídeos de membranas celulares, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (VELASCO *et al.*, 2008).

Andrade e Lima (2015) esclareceram em seu trabalho que a luz UV uma vez absorvida, pode induz a reações nas bases do DNA, gerando lesões conhecidas como fotoprodutos de DNA, os mais comuns são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD's,) promovendo distorções em sua estrutura, o que compromete mecanismos vitais para a célula

por promover um bloqueio físico das maquinarias de replicação e transcrição do DNA, danificando diretamente a membrana das leveduras.

Deste modo, na Tabela 2 encontram – se os resultados obtidos avaliando a viabilidade da *S. boulardii* após ser submetida ao estresse causado pela incidência de Luz UV.

Tabela 2. Viabilidade das *Saccharomyces boulardii* submetidas ao estresse físico causado pela luz – uv.

Tratamentos	Viabilidade celular (UFC/mL)
Controle	$6,4 \times 10^5 \pm 2,5^b$
Extrato de acerola	$1,1 \times 10^6 \pm 5,6^a$

Fonte: De autoria própria.*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O crescimento de colônias foi significativamente maior na placa que continha o tratamento o extrato de acerola ($1,1 \times 10^6$ UFC/mL) em comparação com a placa controle ($6,4 \times 10^5$ UFC/mL), que continha apenas a levedura. Na literatura, os trabalhos consultados que realizaram a avaliação da sobrevivência do mesmo gênero de levedura (*Saccharomyces* sp.), utilizando outras substâncias como antioxidantes, não realizaram testes buscando saber a sobrevivência das mesmas ao estresse físico, como a luz UV, que foi o caso deste trabalho.

Entretanto, é possível fazer uma simples relação entre a capacidade fotoprotetora que os antioxidantes podem oferecer e o aumento da viabilidade da *Saccharomyces boulardii* neste teste.

Pereira (2008), em seu trabalho, avaliando a capacidade fotoprotetora de sementes de oliva e uva pela metodologia desenvolvida por Mansuar (1984), concluiu que as sementes de uva e oliva com adição de metoxicinamato de octila possuíam fator de proteção igual a 12,50 e 12,17, respectivamente. Também utilizando a metodologia descrita por Mansur (1984), Souza, Campos & Parcker (2013), fizeram um estudo avaliando a atividade fotoprotetora da acerola, no qual obtiveram como resultado um FPS (Fator de proteção) 13,65, todos esses valores estão acima dos ditos pela ANVISA, que considera um fator de proteção ideal o FPS de 0,70.

Os antioxidantes são capazes de diminuir ou prevenir uma oxidação, desta forma, utilizar compostos que possuem elevada atividade antioxidante é uma solução na inibição deste processo. Estudos na área provam a capacidade de compostos antioxidantes em retardar o envelhecimento, por evitar a formação do ROS, podendo estes resultados serem

extrapolados para o estresse oxidativo causado pela indução de radiação UV (BALOGH et. al, 2011).

CRUZ *et. al.* (2017) avaliando a integridade da membrana de leveduras submetidas a estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio, mostrou que os antioxidantes não foram capazes de oferecer proteção a membrana das leveduras, uma vez que seus compostos hidrofóbicos não são facilmente incorporados as membranas das células. Neste trabalho, o extrato de acerola utilizado como antioxidante demonstrou capacidade de proteção as leveduras, obtendo crescimento maior que o controle, entretanto, os extratos se mostraram mais eficientes nas análises com a oxidação submetida pelo peróxido de hidrogênio.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerados antioxidantes por apresentarem quantidades significativas de compostos fenólicos e ácido ascórbico, promovendo a remoção de radicais livres e agir como redutores, minimizando os efeitos do estresse oxidativo, a aplicação do extrato de acerola como substâncias antioxidante em leveduras *S. boulardii* apresentou resultados evidentes na viabilidade celular quando submetido ao estresse físico pela luz UV em comparação ao estresse químico causado pelo uso do peróxido de hidrogênio, enquanto os grupos que não receberam o extrato mostraram redução na sua viabilidade celular. Além disso, foi visto que o grupo de células *S. Boulardii* com antioxidante e não submetidas a estresse oxidativo, obtiveram resultados melhores que o demonstrado pelo grupo controle, servindo como controle do tratamento com o extrato de acerola mais a adição do agente estressor (H₂O₂).

Esse fato pode ser de grande importância para indústrias de probióticos, indicando que a adição do extrato de acerola em conjunto com a levedura apresentam resultados promissores, mantendo a viabilidade dos microrganismos diante dos tipos de estresse oxidativos que esses possam vir a sofrer, garantindo a eficácia da ação da célula e tornando o alimento mais nutritivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** Brasília, 2008.
- ALEXANDRE – LIMA, Leonardo Carmo de. **Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular.** Revista da Biologia. São Paulo, v. 14. n.1. p. 6- 16, 2015.
- ARAÚJO, P.S.R. **Acerola.** Campinas: Fundação Cargill, 1994. 81 p.
- AVILA, L.F.C., *et al.* **Saccharomyces boulardii reduces infection intensity of mices with toxocariasis.** Veterinary Parasitology. v. 187. p. 337-340, 2012.
- BALOGH, Tatiana Santana; VELASCO, Maria Valéria Robles; PEDRIALI, Carla Aparecida; KANEKO, Telma Mary; BABY, André Rolim. **Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção.** Anais Brasileiro de Dermatologia, v.86. n.4. p.732-742, 2011.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* **Estresse oxidativo: avaliação de marcadores.** Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. São Paulo, SP, v. 33. nº 2. p. 111-128, 2008.
- BARON, S.; **Medical Microbiology.** University of Texas Medical Branch at Galveston. Texas, ed. 4, 1996.
- BIANCHI, M. L. P., ANTUNES L. M. G.; **Free radicals and the main dietary antioxidants.** Revista Nutrição. 1999; 12(2):123- 130.
- BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Revista de Nutrição, v.12. nº 2. p. 123-130, 1999.
- BURITI, F. C. A; SAAD, S. M. I. **Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância na saúde humana.** Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo- São Paulo, SP, Brasil. Archivos Latino Americanos de Nutricion. v. 57. n. 4. p. 373-380, 2007.
- BUSANELLO, M. *et al.* **Probióticos, seus modos de ação e a produção animal.** Scientia Agraria Paranaensis. v. 11, n. 4, p.14-24, 2012.
- CANUTO, G. A. B; XAVIER, A. A. O; NEVES, L. C; BENASSI, M. T. I. **Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 32. nº 4. p. 1196 – 1205, 2010.
- CATANIA, A. S., BARROS, C. R., FERREIRA S. R. G.; **Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico controversias e perspectivas.**

Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. São Paulo, v. 53. nº 5. p. 550 - 559, 2009.

CERIELLO, A; TESTA, R; GENOVESE, S. **Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications.** Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, v.26. nº 4. p. 285 – 292, 2016.

CLOUATRE, Dallas. *Saccharomyces boulardii*: The Probiotic Yeast. Whole Foods Magazini, 2011.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. **Probiotics and immune reponse.** Ciência Rural. Santa Maria, v.34. nº 4. p. 1297 – 1303, 2004.

COSTA, R. B., **Estudo da viabilidade de microrganismo probiótico *Bifidobacterium lactis* em patê de frango com características simbióticas e sua ação na estabilização da oxidação lipídica.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CRUZ, R. G; **Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

CRUZ, R. G; **Potencial de metabólitos da acerola (*Malpighia emarginata*) como antioxidantes em diferentes sistemas oxidativos mediados por radicais livres.** 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

CRUZ, R. G. *et al.* **Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts.** Food Chemistry, v. 277, p. 698-705, 2019.

CZERECKA, D & PICHE, T; **Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*.** Alimentary Pharmacology & Therapeutics, v. 26. p. 767 – 778, 2007.

De AGUIAR, E.; **Introdução à microbiologia clínica e ao tratamento das doenças infecciosas.** Livros Grátis, 2009.

DELLARETTI, E. M.; **Preservação de fungos em baixas temperaturas.** Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas). Universidade Federal São João del-Rei, Sete Lagoas MG, 2014.

DOSSIÊ ANTIOXIDANTES. **Os Antioxidantes.** In Revista: Food Ingredients Brasil, nº6. p. 16 – 27, 2009

EÇA, K. F; **Desenvolvimento de coberturas e filmes de pectina incorporados de extratos de frutas: Estudo da estabilidade e difusão de nutrientes, efeito fotoprotetor e antioxidante quando aplicado em alimentos.** Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia dos Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

- FERRARI, M; OLIVEIRA, M. S. C; NAKANO, A. K; ROCHA-FILHO, P. A. **Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17. nº 4. p. 626 – 630, 2007.
- FORBES, B., & SAHM, D.; **Diagnóstico Microbiológico.** Médica Panamericana. Buenos Aires, 2004.
- FREITAS, C. A. S *et al.* **Acerola: Produção, Composição, Aspectos Nutricionais e Produtos.** In Revista: _____Bras. Agrociência, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- FROTA, Karoline de Macedo Gonçalves; SOARES, Nina Rosa Melo; MUNIZ, Viviane Ramos da Cunha; FONTENELLE, Larissa Cristina; CARVALHO, Cecília Maria Resende Gonçalves de; **Efeito de prebióticos e probióticos na microbiota intestinal e nas alterações metabólicas de indivíduos obesos.** Revista Nutrire, v. 40. nº 2. p. 173 – 187, 2015.
- GHOLAMIAN-DEHKORDI, Neda; LUTHER, Tahra; ASADI-SAMANI, Majid; MAHMOUDLAN-SANI, Mohammad Reza. **An overview on natural antioxidants for oxidative stress reduction in cancers; a systematic review.** Immunopathology Persa, v.3, n.2, p. 1-12, 2017.
- GLENDENING, E. D., REED, A. E., CARPENTER, J. E., AND WEINHOLD, F. NBO Version 3.1, 2009.
- GRAFF, Sandrine; HUSSAIN, Sajjad; CHAUMEIL, Jean – Claude; Charrueau. **Increased Intestinal Deliberly of Viable *Saccharomyces boulardii* by encapsulation in microspheres.** Pharmaceutical Research, v. 25. nº 6. p. 1290 – 1296, 2008.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine.** Oxford: Clarendon Press, p. 543, 1989.
- HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C. M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. **The production, application and action of lacticcheese starter cultures.** In: Law BA, editor. Technology of cheesemaking. Boca Raton. p. 90 - 131, 1999.
- HUNGRIA, T. D.; LONGO, P. L. **Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida de prateleira.** Revista Saúde, Braz Cubas, v. 3, n. 3, p. 10-15, 2009.
- ILHA, S. M; MIGLIATO, K. F; VELLOSA, J. C; SACRAMENTO, L. V; PIETRO, R. C; ISAAC, V. L; BRUNETTI, I. L; CORRÊA, M. A; SALGADO, H. R. **Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocósmética.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18. nº 1. p. 387 – 392, 2008.
- INGRAHAM, JOHN, L. & INGRAHAM, CATHERINE. **Introdução Microbiologia: Uma abordagem baseada em estudo de caso.** Ed. 4. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

- JARDINI, F. A.; **Avaliação da Atividade Antioxidante da Romã (*Púnica granatum*, L.): efeitos da ação sobre sistemas in vivo e em culturas de células.** São Paulo, 2010.
- KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS, V.; KALLIS, M.; BEZIRTZOGLOU E.; KANELLAKI, M. ***Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production.** Process Biochem, v. 40. n. 1. p. 411-416, 2005.
- KUKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G; MORALES, M. T; FETT, R. **Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas.** Ciência Rural, v. 36. nº 4. p. 1283 – 1287, 2006.
- LENABURG, Lauren; KIMMONS, Mackenzie; KAFER, Leah; HOLBROOK, Emma; FRANKS, Dylan. **Yeast Growth: The effect of tap water and distilled water on yeast fermentation with salt additives.** Journal of Introductory Biology Investigations, v. 4. nº 3, 2016.
- LEVINSON, WARREN & JAWETZ, ERNEST. **Bacteriologia Clínica.** In:_____. Microbiologia Médica E Imunologia. Ed. 4. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, p. 60 - 114.
- LIMA, V. L. A. G; MÉLO, E. A; MACIEL, M. I. S.; PRAZERES, F. G; MUSSER, R. S; LIMA, D. E. S. **Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages.** Food Chemistry, v.90. nº 2. p. 565 – 568, 2005.
- LOURENÇO, C. I. F.; **Diagnóstico laboratorial em microbiologia clínica: Um estudo no centro hospitalar.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Dezembro, 2012.
- MACEDO, L. N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C. G. **Efeito probiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Em leite.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28. n. 4. p. 935-942, Campinas, 2008.
- MAIA, G. A *et al.* **Efeito do Processamento Sobre Componentes do Suco de Acerola.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2007.
- MARTINS, F.S., *et. al.* **Utilização de leveduras como probióticos.** Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 5, n. 2, 2005.
- MELO, E. A; MACIEL, M. I. S; LIMA, V. L. A. G; ARAÚJO, C. R. **Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas.** Alimentos e Nutrição, v. 19. nº 1. p. 67 – 72, 2008.
- MELO, T. A. *et al.* **Levantamento e caracterização dos produtos probióticos disponíveis no mercado varejista da região metropolitana do Rio de Janeiro.** Revista Rede de Cuidados em Saúde, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2016.
- MURRAY, P. R.; **Microbiología médica,** 7ªed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.

- NASCIMENTO, Cinthya Santos; NUNES, Lívio César Cunha; LIMA, Ádley Antonini Neves de; GRANGEIRO-JUNIOR, Severino; ROLIM-NETO, Pedro José. **Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha.** Revista Brasileira de Farmácia. V.90, n.4, p. 334-339, 2009.
- NOGUEIRA, J. C. R; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos: Revisão da literatura. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v. 15. n. 4. p. 487 – 492, 2011.
- OLIVEIRA, Larissa de. **Probióticos, prebióticos e simbióticos: definição, benefícios e aplicabilidade industrial.** Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, 2014.
- PAZ DE ALMEIDA, C., *et al.* **Biotecnologia na Produção de Alimentos** (Dossiê técnico). Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Universidade de São Paulo, 2011.
- PAIXÃO, Ludmilla Araújo da & CASTRO, Fabíola Fernandes dos Santos. **A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro.** Universitas: Ciências da Saúde, v. 14. nº 1. p. 85 – 96, 2016.
- PEREIRA, Gabriela Garrastazu. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato e actila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.
- PIETRA PEDROSO, S. H. S.; **Ação probiótica da levedura *Saccharomyces boulardii*.** Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. p. 34-55, 2011.
- PINTO, A. M.; **Flora microbiana, Sistema Imunitário e Atopia.** Revista Portuguesa de Imunoalergologia. v. 12 p. 199-208, 2004.
- SAAD, Susana Marta Isay. **Probiótico e prebiótico: o estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42. n. 1, 2006.
- SOUZA, Aline Francisca de. **Estudo da viabilidade de microrganismos probióticos encapsulados em matriz polimérica natural contendo ingredientes prebióticos e fibras alimentares.** 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.
- SOUZA, F. S., *et al.* **Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas.** Revista Paulista de Pediatria. v. 28, p. 86– 97, 2010.
- SOUZA, Franciele Piovesana de; CAMPOS, Gabriela Rached; PACKER, Janaína Fernanda. **Determinação da Atividade Fotoprotetora e Antioxidante em Emulsões Contendo Extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola.** In:_____Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 34. n. 1. p. 69 – 77, 2013.
- SOUZA, Rosenilda de Jesus. **Propriedades e a viabilidade probióticas específicas de *Lactobacillus* em leite fermentado: uma revisão bibliográfica.** Trabalho de

Conclusão de Curso – Departamento de Botânica e Ecologia. Universidade Federal do Mato Grosso. Cuiabá, 2016.

TALWALKAR, A. & KAILASAPATHY, K. **Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts.** International Dairy Journal. v. 14. n. 2. p. 143 - 149, 2004.

UFRGS. **Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante.** 2017. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wpcontent/uploads/2017/10/antioxidantesElissa.pdf>. Acesso em: 23 de abr. 2019.

VANDENPLAS, Y.; **Gastrointestinal Flora Composition and Health.** Journal de Pediatria, v. 85. n. 4. p. 285-286, 2009.

VIOLANTE, I. M. P; SOUZA, I. M; VENTURINI, C. L; RAMALHO, A. F. S; SANTOS, R. A. N; FERRARI, M. **Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.1. nº 2. p. 452 – 457, 2009.

VELASCO, Maria Valéria R, *et al.* **Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância.** Latin American Journal of Pharmacy, v.21, n.1, p.23-27, 2008.

WAGNER, Nathalia Ramori Farinha; ZAPAROLLI, Marilia Rizzon; CRUZ, Magda Rosa Ramos; SCHIEFERDECKER, Maria Eliana Madalozzo; CAMPOS, Antônio Carlos Ligoeki. **Mudanças na microbiota intestinal e uso de probióticos no pós-operatório de bypass gástrico em y-de-rooux e gastrectomia vertical sleeve: uma revisão integrativa.** Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, v. 31. nº 4. p. 31 – 34, 2018.