

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Tolerância de *Lactobacillus* ao Estresse Oxidativo em Presença de Leite e  
Mel**

**Vanessa Moraes Ramalho Castro**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**TOLERÂNCIA DE *Lactobacillus* AO ESTRESSE OXIDATIVO EM  
PRESENÇA DE LEITE E MEL**

**VANESSA MORAES RAMALHO CASTRO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**PhD Rosa Helena Luchese**

*e Co-orientação do Professor*  
**Dr. Cristiano Jorge Riger**

Dissertação submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Mestre em Ciências  
e Tecnologia**, no Programa de Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Junho de 2018

C334t CASTRO, Vanessa Moraes Ramalho Castro, 1982-  
Tolerância de lactobacillus ao estresse oxidativo  
em presença de leite e mel / Vanessa Moraes Ramalho  
Castro CASTRO. - 2018.  
62 f.

Orientadora: Rosa Helena Luchese Luchese.  
Coorientador: Cristiano Jorge Riger Riger.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, 2018.

1. Probióticos. 2. Mel e leite. 3. Estresse  
oxidativo. I. Luchese, Rosa Helena Luchese, 1957-,  
orient. II. Riger, Cristiano Jorge Riger, 1972-,  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. IV. Título.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**VANESSA MORAES RAMALHO CASTRO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de Concentração em Ciência de Alimentos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/07/2018



Ph.D. Rosa Helena Luchese- UFRRJ  
(Orientadora)



Dr<sup>a</sup> Janine Passos Lima da Silva – CTAA/EMBRAPA



Dr. André Floravante Guerra – IFRJ Valença

## AGRADECIMENTOS

A Deus por cuidar e estar presente em todo tempo. Nos mínimos detalhes reconheço o teu amor e misericórdia sobre mim. Obrigada por me permitir chegar até aqui!

Durante esses dois anos e três meses, Deus fez cruzar o meu caminho pessoas maravilhosas, que muito me ajudaram. Verdadeiros anjos enviados por Ele! Tenho muito a agradecer e é com alegria e gratidão no coração que faço isso neste momento.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, muito obrigada pela oportunidade!

A minha orientadora *Rosa Helena Luchese*, obrigada por toda a paciência, compreensão, amizade e dedicação ao meu trabalho. Você é exemplo de profissional e ser humano. Quem dera o mundo tivesse mais mestres assim como você!

Ao professor *Cristiano Riger* pela co-orientação deste trabalho, por toda ajuda e incentivo! Aproveito para agradecer em seu nome ao Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos (LEOM), por abrir as portas e me receber tão bem. Eu me sentia em casa aí também.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos profissionais e de vida também.

A todos os funcionários do DTA que prestam serviços indispensáveis e de grande valor!

A todos os técnicos e funcionários do Laboratório de Microbiologia, muito obrigada por toda ajuda dispensada na realização deste trabalho. Em especial, muito obrigada à *Edlene Prudêncio*. Ed, você fez mais que seu papel, se tornou uma grande amiga e confidente.

A *Roberto Laureano*, mestre obrigada pela preciosa ajuda com a estatística desta pesquisa, obrigada por sua amizade e todas as conversas enriquecedoras.

A aluna de iniciação científica *Mariane Motta*. Mari você foi sensacional, obrigada por toda a sua dedicação e empenho. Esse trabalho também é seu!

As amigas que fiz neste período e que jamais esquecerei: Amanda, Barbara, Lívia e Nathália.

A minha família, base da minha vida. Vocês são parte disso!

A *Bruno Haber*, meu companheiro de vida, obrigada pela compreensão e apoio nos momentos difíceis. Sei que posso contar com você sempre!

Ao meu filho *Rafael Moraes*, que mesmo pequenininho, muitas vezes me ajudou a querer ser melhor. Te amo!

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, em algum momento contribuíram para a realização desta pesquisa, muito obrigada!

## RESUMO

CASTRO, Vanessa Moraes Ramalho. **Tolerância de *Lactobacillus* ao Estresse Oxidativo em Presença de Leite e Mel.** 2018.63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia De Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Prebióticos são substâncias que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento/ou a atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon; as bactérias probióticas.. Lactobacilos são beneficiados em ambientes com baixo potencial redox e a presença de compostos antioxidantes é importante neste contexto. Pesquisas têm demonstrado que o mel e o leite são matrizes que auxiliam na viabilidade dos probióticos durante o armazenamento, assim como melhoram seu metabolismo. Por outro lado, alguns probióticos são produtores de peróxido de hidrogênio. . Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar a tolerância de lactobacilos ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em presença das matrizes alimentícias leite e mel. Para esse propósito, ensaios de viabilidade celular foram realizados com e sem a adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em três diferentes matrizes: solução salina, solução de mel a 5% ou leite desnatado reconstituído a 12%. Também foi avaliado o efeito do estresse oxidativo causado pela exposição dos lactobacilos ao peróxido de hidrogênio na peroxidação lipídica de diferentes probióticos (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *S. boulardii*). A matriz leite propiciou proteção para as cepas de *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, cuja viabilidade foi equivalente a da cultura não estressada . Este efeito protetor do leite não foi observado na sobrevivência da cepa de *L. acidophillus*, que foi a mesma independente da matriz. A exposição ao peróxido não afetou a viabilidade da levedura *S. boulardii*. O mel florada assa-peixe na concentração de 5% não manteve a viabilidade dos microrganismos probióticos expostos ao peróxido de hidrogênio e, pelo contrario, causou redução significativa na viabilidade da cepa de *L. rhamnosus* ( $P < 0,001$ ). Foi observado menor peroxidação lipídica, expressa em malonaldeído, decorrente da exposição ao peróxido com os microrganismos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, mas este marcador não mostrou relação com a viabilidade. Apesar de serem todos produtores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando cultivados em solução de mel, supõe-se que bactérias probióticas tenham mecanismos diferentes para evitar os efeitos tóxicos dos radicais reativos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado exogenamente.

**Palavras-chave:** probióticos, mel e leite, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

CASTRO, Vanessa Moraes Ramalho. **Tolerance of Lactobacillus to Oxidative Stress in the Presence of Milk and Honey.** 2018. 63p. Dissertation (Master of Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Prebiotics are substances that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth and / or activity of a limited number of bacteria in the colon; the probiotic bacteria. Lactobacilli are benefited in environments with low redox potential and the presence of antioxidant compounds is important in this context. Findings of previous research have shown that honey and milk are matrices that aid in the viability of probiotics during storage, as well as improve their metabolism. On the other hand, some probiotics are producers of hydrogen peroxide. . The objective of the present study was to study the tolerance of lactobacilli to the oxidative stress induced by hydrogen peroxide in the presence of milk and honey. For this purpose, cell viability assays were performed with and without the addition of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), in three different matrices: saline solution, 5% honey solution or 12% reconstituted skim milk. To evaluate the oxidative stress caused by exposure of lactobacilli to hydrogen peroxide, lipid peroxidation assays were performed in different probiotics (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* and *S. boulardii*). The milk matrix provided protection for the strains *L. paracasei* and *L. rhamnosus*, whose viability was equivalent to that of the non-stressed culture. This milk protective effect was not observed in the survival of the *L. acidophilus* strain which was the same independent of the matrix. Exposure to peroxide did not affect the viability of yeast *S. boulardii*. Five percent honey solution did not maintain the viability of probiotic microorganisms exposed to hydrogen peroxide and, on the contrary, caused a significant reduction in viability of the strain of *L. rhamnosus* (P <0.001). Lower lipid peroxidation due to peroxide exposure, expressed as malonaldehyde, was observed with the microorganisms *L. acidophilus* and *L. rhamnosus*, but this marker showed no relation to viability. Although they are all H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producers when cultured in honey solution, it is assumed that probiotic bacteria have different mechanisms to avoid the toxic effects of the reactive radicals caused by exogenously added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Key words: probiotics, honey and milk, oxidative stress.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído, formando composto colorido medido em espectrofotômetro a 532nm.....17
- Figura 2** – Fluxograma do ensaio de viabilidade celular..... 31
- Figura 3** - Teste de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando fitas dosadoras (Peroxid Test Merck) 32
- Figura 4** –Viabilidade de *L. paracasei* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite. \*\*\* representa  $p < 0,001$  e ###  $p < 0,001$  (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *L. paracasei*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B) 37
- Figura 5** –Viabilidade de *L. rhamnosus* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite.\*\*\* representa  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  e #  $p < 0,05$  (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *L. rhamnosus*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B). .....38
- Figura 6** – Viabilidade de *L. acidophilus* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite. \* representa  $p < 0,05$  (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *L. acidophilus*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B).....41
- Figura 7** – Viabilidade de *S. boulardii* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite. (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *S. boulardii*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B).....44
- Figura 8** – Peroxidação lipídica causada pelo tratamento com peróxido de hidrogênio (20mM) por 1 hora, expressa pela formação de malonaldeído (MDA), em células de *S. boulardii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* (A) e respectivo percentual de aumento de MDA após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) por 1 hora ..... 47



## ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1:</b> Principais proteínas do leite e suas funções.....	26
<b>Tabela 2:</b> Número de UFC/mL do microrganismo <i>L. paracasei</i> , após exposição a diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 1 hora .....	34
<b>Tabela 3:</b> Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) por diferentes cepas de <i>Lactobacillus</i> cultivadas em leite e mel 5% utilizando o método semi-quantitativo (Peroxid Test Merck).....	35
<b>Quadro 1:</b> Cepas de <i>lactobacillus</i> utilizadas no estudo.....	29

## **SIGLAS E ABREVIATURAS**

YPD - Yeast/Peptone/Dextrose

BAL - Bactérias Ácido Lácticas

TBA - Thiobarbituric Acid (Ácido 2-tiobarbitúrico)

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

MDA - Malonaldeído

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

LPO - Lipoperoxidação

EDTA - Etilenodiamin Tetracetic Acid (Ácido etileno diamino tetra acético)

TCA - Trichloroacetic Acid (Ácido tricloroacético)

ABTS - 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

EROS - espécies reativas de oxigênio

SOD - superóxido dismutase

CAT - catalase

GPx - glutathione peroxidase

GABA - ácido gama-aminobutírico

PBAs - peptídeos biologicamente ativos

AAPH - aminodipropano

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1	Radicais livres e estresse oxidativo .....	16
2.1.1	Marcadores Bioquímicos do Estresse Oxidativo.....	17
2.1.2	Mecanismo Celular de Reação ao Estresse Oxidativo .....	18
2.2	Probióticos .....	19
2.2.1	Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	20
2.2.2	Probióticos: Mecanismo de Ação Probiótica .....	21
2.3	Prebióticos e simbióticos .....	22
2.4	Microbiota intestinal e a influência dos probióticos e prebióticos .....	23
2.5	Viabilidade de células probióticas .....	23
2.6	Compostos bioativos presentes no mel .....	24
2.6.1	Antioxidantes no Mel .....	25
2.7	Compostos bioativos presentes no leite .....	26
2.7.1	Proteínas do Leite .....	26
3	OBJETIVOS .....	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Mel.....	29
4.1.1	Determinação do teor de ferro no mel.....	29
4.2	Leite .....	29
4.3	Obtenção, ativação e manutenção das culturas de <i>Lactobacillus spp</i> .....	29
4.4	Obtenção, ativação e manutenção da cultura de <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	30
4.5	Padronização do inóculo de <i>Lactobacillus spp</i> .....	30
4.6	Padronização do inóculo de <i>S. boulardii</i> .....	31
4.7	Sobrevivência ao estresse oxidativo - Viabilidade celular .....	31
4.8	Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio.....	33
4.9	Peroxidação lipídica .....	33
4.10	Tratamento dos Lactobacilos.....	33
4.11	Determinação de Malonaldeído (MDA) .....	34
4.12	Análise estatística .....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	Determinação da Capacidade de Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por <i>Lactobacillus spp</i> .....	35

5.2	Tolerância de lactobacilos ao peróxido de hidrogênio em presença de mel e leite .....	37
5.3	Tolerância de <i>Sacharomyces boulardii</i> ao peróxido de hidrogênio em presença de mel e leite	45
5.4	Avaliação da peroxidação lipídica .....	46
6	CONCLUSÃO .....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

A busca dos consumidores por alimentos saudáveis, saborosos, atrativos e que ao mesmo tempo promovam saúde e bem-estar tem contribuído para investimentos crescentes da indústria alimentícia em pesquisas e desenvolvimento de novos produtos. Hoje, uma dieta adequada é constituída não apenas de nutrientes necessários para a sobrevivência do indivíduo, mas também de nutrientes capazes de assegurar a saúde, reduzir o risco de doenças e apresentar efeito terapêutico frente a determinadas patologias. Alimentos com tais características são denominados funcionais e dentre eles podemos destacar os alimentos probióticos e os prebióticos (SIMEONI et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde e com a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (WHO, 2001; HILL et al., 2014). O termo "prebiótico" foi introduzido por Gibson e Roberfroid (1995), que definiram os prebióticos como um ingrediente alimentar não digerível que afeta de forma benéfica o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon; as bactérias probióticas. Esta definição mais ou menos se sobrepõe à definição de fibra alimentar, com exceção da sua seletividade para determinadas espécies. O termo simbiótico é utilizado quando um produto contém tanto probióticos como prebióticos. Uma vez que a palavra alude ao sinergismo, este termo deve ser reservado para produtos em que o composto prebiótico favorece seletivamente o probiótico (SCHREZENMEIR e VRESE, 2001). Assim uma definição mais ampla não deveria restringir prebióticos a ingredientes não digeríveis, mas a todos aquelas substâncias que afetam de forma benéfica o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon.

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: modulação da microbiota intestinal por competição e produção de compostos antimicrobianos, digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, alívio da constipação (O'MAHONY et al., 2005), diminuição da incidência de diarreia (WADA et al., 2010); aumento da absorção de certos nutrientes como ácidos graxos, minerais e vitaminas, prevenção do câncer de cólon (SIVIERI, 2013), diminuição de sintomas alérgicos

(BROUWER et al., 2006; XIAO et al., 2006) e redução das concentrações de colesterol e triglicerídeos no plasma sanguíneo (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001).

Atualmente o conceito a respeito dos prebióticos vem se expandindo a outras substâncias, além dos tradicionais carboidratos, como exemplo, os compostos fenólicos, antioxidantes encontrados em vegetais e no mel de abelha. De acordo com os estudos, a maior parte dos compostos antioxidantes presentes no mel afeta a viabilidade de uma série de microrganismos indesejáveis, mas não afeta as bactérias probióticas ou, em muitos casos, estimula o seu crescimento e/ou sua atividade (MACEDO et al., 2008; SILVA et al., 2012; DAS et al., 2015).

Os compostos fenólicos têm propriedades antioxidantes devido a capacidade de neutralizar os radicais livres formados durante o metabolismo. O estresse oxidativo gerado em decorrência do desequilíbrio entre a geração e remoção destes radicais nos organismos celulares podem levar à peroxidação dos compostos lipídicos de membrana, agressão às proteínas, modificação da atividade enzimática, polimerização dos carboidratos e alterações cromossômicas (MONIRUZZAMAN et al., 2012); que, por sua vez, podem desencadear diversas enfermidades como carcinomas, doenças cardiovasculares, catarata, processos inflamatórios, doenças auto-imunes e outras (YE et al., 2014; SINGH et al., 2018).

O leite é um alimento de alto valor nutricional, considerado uma importante fonte de proteínas da dieta. Além das funções básicas de nutrição, as proteínas do leite apresentam funções biológicas específicas, tais como: atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-trombótica, funções imunomoduladoras, além de facilitar a absorção de outros nutrientes (MILLS et al., 2011). Lactoferrina é uma proteína com poder antioxidante, sua ligação com o ferro torna o meio estável, prevenindo a peroxidação lipídica (ACTOR, 2009).

Para que o probiótico exerça sua função no organismo, a viabilidade dos microrganismos é fundamental, sendo assim, as células viáveis probióticas devem estar em concentrações mínimas exigidas até o momento do consumo (ABADIA et al., 2013; PIMENTEL et al., 2015). No entanto, a manutenção da viabilidade das bactérias probióticas no período de armazenamento dos produtos alimentícios é um grande desafio tecnológico, já que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição de oxigênio, calor e ácidos (STANTON et al., 2003). A exposição ao oxigênio e a espécies radicalares que o contenham apresenta-se como um fator relevante, uma vez que esse grupo microbiano apresenta metabolismo anaeróbio e/ou microaeróbio, o que pode resultar em morte celular e perda da

funcionalidade do produto.

Conforme os dados apresentados, alguns componentes bioativos do mel como os compostos fenólicos e as enzimas presentes no leite, possivelmente podem vir a auxiliar as defesas endógenas do organismo na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo metabolismo celular, ou mesmo pela permeação de oxigênio pelas embalagens, as quais são prejudiciais às estruturas e funções celulares. Compostos antioxidantes presentes em embalagens, reagem com oxigênio do meio, impedindo a formação de radicais livres (Ramalho e Jorge, 2006) e conseqüentemente a deterioração do produto.

Portanto, considerando a importância do consumo de alimentos probióticos e prebióticos para a saúde dos consumidores e o desafio da indústria alimentícia na elaboração de produtos com células viáveis probióticas em concentrações adequadas até o consumo, faz-se necessário o entendimento acerca do comportamento de tais microrganismos frente a agentes oxidantes e em presença de matrizes potencialmente protetoras. Tal conhecimento fornecerá informações mais precisas para a seleção de cepas probióticas e matrizes alimentícias, para a formulação de alimentos simbióticos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

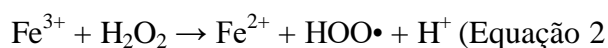
### 2.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Radicaís livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua estrutura química, o que os torna muito instáveis e altamente reativos. Para atingir a estabilidade, as espécies reativas necessitam adquirir elétrons e, para isso, reagem com a maioria dos compostos orgânicos, oxidando-os (BARBOSA, 2010). Os radicaís superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) são exemplos, sendo que este último é considerado um dos radicaís mais reativos dentre as espécies reativas de oxigênio (EROs) (BARBOSA, 2014).

Os radicaís livres são naturalmente produzidos nas células como subprodutos do metabolismo durante a cadeia transportadora de elétrons, fagocitose, atividade enzimática, auto-oxidação de compostos solúveis no citosol, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias (HALLIWELL, 2011; MOLINA SPATH, 2013).

O estresse oxidativo gerado em decorrência do excesso de radicaís livres e consequente ação sobre os constituintes celulares podem levar à peroxidação dos compostos lipídicos de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, modificação da atividade enzimática, polimerização de carboidratos e alterações cromossômicas (MONIRUZZAMAN et al., 2012); que, por sua vez, podem desencadear enfermidades como cânceres, doenças cardiovasculares, catarata, processos inflamatórios, doenças autoimunes e outras (YE et al., 2014; SINGH et al., 2018).

Apesar de não ser um radical livre, o  $H_2O_2$  é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz  $OH^{\bullet}$ . O peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar camadas lipídicas por meio de canais de água, permitindo a ocorrência de reações de oxidação numa grande variedade de tecidos (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006; LUSHCHAK, 2010). Sua toxicidade é aumentada na presença de metais, principalmente o ferro, em virtude da reação de Fenton (STĘPNIAK; LEWIŃSKI; KARBOWNIK-LEWIŃSKA, 2013) (Equações 1 e 2).

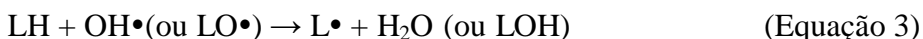




### 2.1.1 Marcadores Bioquímicos do Estresse Oxidativo

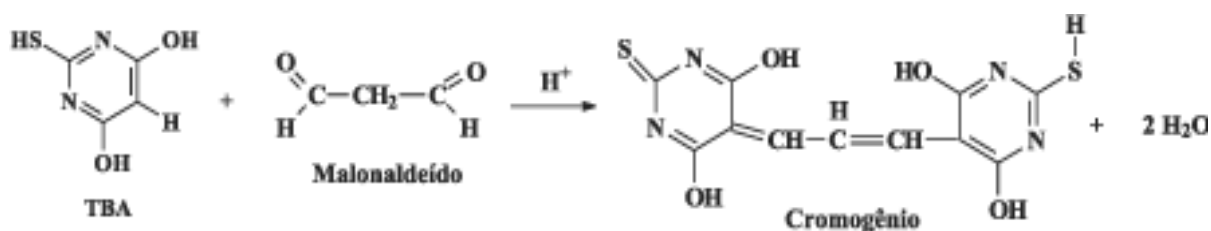
Quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e/ou espécies reativas e a capacidade dos antioxidantes em removê-los, ocorre oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo. Como é complexo medir os radicais livres diretamente *in vivo*, é necessário realizar a quantificação de marcadores celulares que podem reagir com esses radicais livres. Tais marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídeos, proteínas e de moléculas de DNA (Ácido Desoxirribonucléico), sendo os primeiros os de maior expressão. Os peróxidos lipídicos são compostos instáveis, por isso tendem a se degradar rapidamente em uma variedade de subprodutos, incluindo o malonaldeído (MDA) (GROTTO et al., 2009). Uma outra forma de avaliar o estresse oxidativo é o emprego de métodos indiretos, baseados na capacidade antioxidante (BARBOSA et al., 2010).

Os ácidos graxos poliinsaturados de membranas celulares são altamente susceptíveis à oxidação por radicais livres. O processo de peroxidação lipídica constitui-se de reações em cadeia, representadas pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A reação tem início com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado por espécies radicalares e a consequente formação do radical lipídico (L•) (Equação 3). Na etapa de propagação o radical lipídico formado reage rapidamente com o oxigênio molecular, formando um radical peroxil (LOO•) (Equação 4). Este por sua vez sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o radical lipídico da fase de propagação (Equação 5). A etapa final da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais produzidos nas reações anteriores reagem entre si, desfazendo as espécies radicalares (Equação 6) (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).



Uma vez formados, os radicais peroxil (LOO•) podem sofrer reação de ciclização a endoperoxídeos, precursores de malonaldeído. Estudos demonstram que o MDA é mutagênico

em bactérias e células de mamíferos, e carcinogênico em ratos (VALKO et al., 2007). O acúmulo de tais substâncias resultantes da peroxidação lipídica é um importante marcador bioquímico de estresse oxidativo. Existe forte correlação entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 1), como os marcadores de peroxidação lipídica e os produtos que refletem dano oxidativo ao DNA (NELSON et al., 2006).



**Figura 1:** Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído, formando composto colorido medido em espectrofotômetro a 532nm (OSAWA; DE FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

### 2.1.2 Mecanismo Celular de Reação ao Estresse Oxidativo

O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em enzimático e não enzimático. O grupo enzimático inclui enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx); enquanto o grupo não enzimático inclui antioxidantes exógenos adquiridos através da dieta, como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides, flavonoides e outras substâncias com capacidade de diminuir a concentração de radicais livres (YE et al., 2014).

A função do sistema de defesa antioxidante é bloquear e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Em condições fisiológicas esse mecanismo de defesa mantém a concentração de radicais livres a níveis não deletérios dentro das células, e suas concentrações são precisamente reguladas. Uma vez que a célula detecta condição de estresse, uma sequência de genes é ativada para sintetizar enzimas e moléculas de proteção (BARBOSA et al., 2010).

## 2.2 Probióticos

A palavra “probiótico” é de origem grega e significa “para a vida”. Apesar da definição precisa de probiótico ser recente, o interesse por microrganismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos (SCHREZENMEIR e VRESE, 2001).

No início do século passado, o russo Eli Metchnikoff, quando trabalhava no Instituto Pasteur de Paris, ganhou o prêmio Nobel ao explicar cientificamente os efeitos benéficos das bactérias lácticas presentes em leites fermentados. O bacteriologista associou a saúde e a longevidade dos búlgaros com o alto consumo desses produtos. Sua teoria, denominada “Teoria da Longevidade”, tinha como princípio a ação inibitória das bactérias lácticas sobre as bactérias produtoras de toxina normalmente presentes no intestino, resultando em um aumento no tempo de vida da população (LOURENS-HATTINGH; VILJEON, 2001).

No entanto, o termo “probiótico” foi empregado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) para designar “microrganismos capazes de promover o crescimento de outros microrganismos”. Em 1974, Parker definiu probióticos como "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal". Fuller (1989) redefiniu probióticos como “suplemento alimentar contendo microrganismos vivos que benéficamente afeta o animal hospedeiro, melhorando o seu equilíbrio microbiano intestinal”. Esta definição clarifica a necessidade de um probiótico ser viável. Gibson e Roberfroid (1995) e Henker et al. (2007) também consideraram os probióticos suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos capazes de produzir efeitos benéficos na saúde e bem-estar do hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal.

Em 2014, o Consenso Internacional da Associação Científica para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) ratificou uma definição anterior de probióticos descrita pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial de Saúde (FAO / WHO, 2001), como “microrganismos vivos (bactérias ou leveduras), que ao serem ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. O painel de especialistas concordou que a declaração de probióticos abrange amplamente espécies que contribuem para as funções essenciais de sustentar sistemas digestivo e imunológico (HILL et al., 2014).

### 2.2.1 Genêro *Lactobacillus*

A microbiota predominante no intestino humano saudável é composta em sua maioria por bactérias lácticas pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Dentre os lactobacilos mais empregados em Alimentos Funcionais, como leites fermentados e iogurtes, estão as espécies *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (GOMES E MALCATA, 1999).

Os lactobacilos são bactérias anaeróbias facultativas, gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, apresentam-se em forma de bastonetes não flagelados e habitam predominantemente o intestino delgado. O crescimento pode se dar a temperaturas elevadas como 45°C, porém a faixa ótima está entre 35 e 40°C. Tais microrganismos crescem em meio ligeiramente ácido com pH de 4,5 a 6,4; porém podem tolerar ambientes a partir de 0,3% a 1,9% de acidez titulável (RIVERA-ESPINOZA e GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Compreendem o grupo *Lactobacillus casei* bactérias lácticas fenotipicamente e geneticamente heterogêneas que são capazes de manter o equilíbrio de vários ambientes. Nesse grupo, são destaques os lactobacilos típicos do hospedeiro humano, os quais incluem as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, além de *Lactobacillus zeae* (HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004). Essas espécies apresentam comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito similares, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes (FELIS et al., 2001; DESAI, SHAH & POWELL, 2006). Também são reconhecidas como probióticas cepas do grupo *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*) (FAO/WHO, 2002).

A acidificação do meio e os processos enzimáticos que normalmente acompanham o crescimento das bactérias lácticas contribuem para as características de textura e principalmente de preservação da qualidade microbiológica de muitos alimentos fermentados, como os produtos lácteos (KLAENHAMMER, 2005).

Em torno de 56 espécies do gênero *Lactobacillus* foram descritas até hoje. Essas bactérias estão distribuídas por vários nichos ecológicos, sendo encontradas por todo o trato gastrointestinal e geniturinário, constituindo uma importante parte da microbiota de homens e animais. A sua distribuição, porém, é afetada por diversos fatores ambientais como: pH, disponibilidade de oxigênio, nível de substrato específico, presença de secreções e interações bacterianas; tendo propriedades potencialmente probióticas, favorecendo beneficamente o organismo humano (SHAH, 2007).

## 2.2.2 Probióticos: Mecanismo de Ação Probiótica

O principal benefício atribuído aos probióticos é a exclusão competitiva de agentes patogênicos que ocorre através de mecanismos diferentes, incluindo: a) a competição por receptores no epitélio intestinal, como ocorre com lactobacilos que inibem diretamente a ligação de *Salmonella*, *E. coli* e outros agentes patogênicos de origem alimentar; b) a secreção de fatores que inibem a adesão de agentes patogênicos, assim como o aumento da secreção de mucina (MUC2 e MUC3) por algumas espécies de lactobacilos, inibindo a adesão de *E. coli* enteropatogênica; c) o estímulo ao efeito de barreira da mucosa, por lactobacilos e bifidobactérias, que ajuda a impedir os agentes patogênicos de induzirem aumento na permeabilidade intestinal; d) a produção de ácidos graxos de cadeia curta e/ou outras substâncias antibacterianas; além da competição por nutrientes (REID, 2008; LUCHESE, 2012).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; MEARIN; GUARNER; VERDÚ; 2009).

As culturas probióticas produzem uma variedade de substâncias que são inibitórias tanto para bactérias gram-positivas quanto para bactérias gram-negativas (LIONG, 2007). Essas substâncias não reduzem apenas o número de células viáveis dos microrganismos patogênicos, mas também afetam o metabolismo bacteriano ou a produção de toxinas (ROLFE, 2000). Dentre os compostos antimicrobianos estão os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, antibióticos e ácidos biliares desconjugados (SHEIL; SHANAHAN; O'MAHONY et al., 2007).

Os efeitos benéficos da ingestão de culturas probióticas à saúde, além da modulação da microbiota intestinal por competição e produção de compostos antimicrobianos, incluem: digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, alívio da constipação (O'MAHONY et al., 2005), diminuição da incidência de diarreia (WADA et al., 2010), aumento da absorção de certos nutrientes como ácidos graxos, minerais e vitaminas, prevenção do câncer de cólon (SIVIERI, 2013), diminuição de sintomas alérgicos (BROUWER; XIAO, 2006) e redução das

concentrações de colesterol e triglicérides no plasma sanguíneo (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001).

Outro importante benefício dos probióticos é o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (SAAD;CRUZ; FARIA, 2011). Mais recentemente foi verificada a capacidade dos probióticos de reduzirem os níveis de cortisol, uma substância ligada ao estresse emocional e uma melhor distribuição do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor que ajuda a controlar a ansiedade (BRAVO et al., 2011).

### **2.3 Prebióticos e simbióticos**

O termo prebiótico surgiu em 1995 a partir dos estudos de Gibson e Roberfroid, e atualmente é definido como ingrediente alimentar não digerido no intestino delgado, que ao atingir o cólon é metabolizado seletivamente por um número limitado de microrganismos benéficos.

Dentre os principais compostos prebióticos destacam-se a inulina e os oligossacarídeos, especialmente os frutooligossacarídeos (FOS). Os oligossacarídeos são açúcares encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel (MACEDO et al., 2008; DWIVEDI et al., 2014; GARCÍA-CAYUELA et al., 2014). Estes favorecem a predominância de microbiota bacteriana saudável, auxiliando o seu crescimento e metabolismo através da competição pelo alimento, favorecendo a proliferação destas bactérias, principalmente os lactobacilos e as bifidobactérias (VALCHEVA e DIELEMAN, 2016).

Tradicionalmente, os prebióticos foram relacionados com oligossacarídeos e polissacarídeos não digeríveis por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon intestinal. No entanto, este conceito vem sendo expandido a outras substâncias, que beneficiam seletivamente bactérias probióticas, estimulando o seu crescimento ou atividade. A maior parte dos compostos antioxidantes presentes no mel afeta a viabilidade de uma série de microrganismos indesejáveis, mas não afeta as bactérias probióticas ou, em muitos casos, estimula o seu crescimento e/ou a atividade (capacidade de produzir os metabólitos da fermentação, especialmente ácidos) (MACEDO et al., 2008; SILVA et al., 2012; DAS et al., 2015).

Simbióticos do grego “sim” que significa união, são alimentos ou suplementos contendo simultaneamente microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos; resultando em produtos com as características funcionais dos dois grupos, que em sinergia vão beneficiar a saúde do hospedeiro. A colonização de probióticos exógenos combinados com os prebióticos pode aumentar a ação dos primeiros no trato intestinal (RAIZEL et al., 2011).

#### **2.4 Microbiota intestinal e a influência dos probióticos e prebióticos**

Em condições normais inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, a maioria delas anaeróbias estritas. Essa composição torna o intestino capaz de responder a possíveis variações anatômicas e físico-químicas (LEE et al., 1999). A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos patogênicos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER, GIBSON, 1998).

#### **2.5 Viabilidade de células probióticas**

O microrganismo é considerado probiótico quando consegue sobreviver às condições gastrointestinais, sendo estável ao pH ácido, aos sais biliares e às enzimas digestivas; além de possuir a capacidade de aderir à mucosa intestinal e de colonizar o trato gastrointestinal, mesmo que temporariamente. Para que um alimento probiótico alcance sua funcionalidade, a viabilidade dos microrganismos é fundamental, sendo assim, as células viáveis probióticas devem estar em concentrações mínimas exigidas até o momento do consumo para terem importância fisiológica ao consumidor (ABADIA et al., 2013; PIMENTAL et al., 2015).

Os prebióticos são ingredientes não digeríveis que podem ser adicionados para promover a manutenção de bactérias como *Bifidobacterium ssp.* e *Lactobacillus ssp.* visando maximizar a eficácia dos produtos que contêm bifidobactérias. Os fatores bifidogênicos são frequentemente incluídos nos produtos, como a inulina e o FOS (frutooligossacarídeos), disponíveis para uso comercial em iogurtes e outros produtos fermentados (GALLINA et al., 2011). Dentre os prebióticos, os oligossacarídeos têm recebido maior atenção, e estes açúcares estão presentes naturalmente como componentes do mel e do leite.

A viabilidade dos microrganismos probióticos depende da linhagem utilizada, da interação entre as espécies, da acidez do produto e das concentrações de ácido láctico e acético. Outros fatores que interferem na viabilidade são: a disponibilidade de nutrientes e de promotores (ou inibidores) de crescimento; a concentração de açúcares (pressão osmótica); o teor de oxigênio dissolvido e a permeabilidade de oxigênio através da embalagem; a quantidade de inóculo; a temperatura de incubação; o tempo de fermentação e a temperatura de estocagem. No entanto, os principais fatores que levam à perda de viabilidade são a redução do pH do meio e a acúmulo de ácidos orgânicos provenientes do crescimento e da fermentação (FREIRE, 2012).

## **2.6 Compostos bioativos presentes no mel**

O mel de abelha é composto por uma solução saturada de açúcares, dos quais frutose (38%) e glicose (31%) são os principais constituintes, além de uma grande variedade de constituintes menores, incluindo compostos fenólicos e carotenóides (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; GORJANOVIC, 2013).

A composição química do mel, assim como o aroma, a cor e as propriedades medicinais estão diretamente relacionadas com a fonte de néctar que o originou, com as espécies de abelhas produtoras, e também com as condições geográficas e climáticas de cada região. Todos esses fatores contribuem para uma grande variação de compostos encontrados no mel (LUCHESE, 2012).

Desde a antiguidade o mel tem sido utilizado em razão de suas propriedades nutricionais e terapêuticas. As propriedades terapêuticas estão relacionadas principalmente a atividade antioxidante e antimicrobiana desse alimento. Um número crescente de evidências científicas sobre a atividade antioxidante do mel tem sido acumulado, sobretudo sua aplicação como antioxidante natural no tratamento de doenças causadas pelo estresse oxidativo (BERETTA et al., 2005).

Bueno-Costa et al. (2016), ao analisarem a atividade antioxidante e antibacteriana de compostos fenólicos e carotenóides de 24 amostras de mel provenientes do Rio Grande do Sul, Brasil, obtiveram resultados positivos. Os compostos fenólicos foram os compostos bioativos encontrados em maiores quantidades, principalmente devido aos ácidos fenólicos. Os carotenóides foram detectados em pequenas concentrações nas amostras, mas o suficiente para contribuir com a sua atividade antioxidante. A atividade antimicrobiana, sobretudo contra microrganismos gram-positivos, *Staphylococcus* e *bacillus*, sugere que os méis



estudados atuaram como antibacterianos naturais ao diminuir os efeitos das infecções bacterianas.

Macedo et al. (2008) estudaram o efeito do mel de *Apis mellifera* sobre o crescimento e viabilidade de linhagens comerciais de lactobacilos e bifidobactérias em leites fermentados. O leite foi inoculado com 2% de cada probiótico separadamente e adicionado com 3% de mel. Após a fermentação, foram armazenados a 7°C por 46 dias e avaliados periodicamente. Apesar do mel não ter afetado o crescimento ou a atividade de lactobacilos, nas culturas de bifidobactérias exerceu efeito positivo significativo ( $p < 0,05$ ), auxiliando na manutenção da viabilidade e estímulo metabólico da atividade dessas bactérias, mesmo a redução do pH.

### **2.6.1 Antioxidantes no Mel**

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixa concentração quando comparadas à do substrato oxidável, regenera-o ou inibe a oxidação do mesmo de maneira eficaz, sendo responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (VEDANA, 2008; ARBOS, 2009).

O efeito antioxidante dos compostos fenólicos se deve à sua atuação como agentes redutores de radicais livres ou quelantes de íons metálicos pró-oxidantes (BORSATO, 2008). A habilidade dos fenóis em neutralizar os radicais livres está fortemente associada com a sua estrutura, principalmente com o número de duplas ligações e a quantidade de grupamentos hidroxilas em anéis aromáticos (LEJA et al., 2007). Na natureza, os polifenóis podem apresentar-se na sua forma livre ou complexados a açúcares e proteínas (PEREIRA, 2010).

Os compostos fenólicos são classificados em dois grupos: flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos). Os flavonóides são os compostos fenólicos encontrados nas frutas e nos vegetais, sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas. Na classe dos não-flavonóides estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico (SILVA et al., 2015).

Entre os componentes do mel, os compostos fenólicos são tidos como os principais responsáveis pelo seu efeito antioxidante, podendo ser encontrados flavonóis, flavonas, flavononas, ácidos benzóicos e cinâmicos (PYRZYNKA e BIESAGA, 2009). O perfil fenólico dos méis, sua concentração e, conseqüentemente, suas propriedades antioxidantes dependem de vários fatores, como a região, sazonalidade, tipo de flora, clima e de fatores

ambientais, como umidade, temperatura e composição do solo (BALTRUSAITYTE et al., 2007; VIURDA-MATOS et al., 2008).

Estudos sugerem que os ácidos orgânicos presentes no mel, tais como glucônico, málico, e ácido cítrico, contribuem para a atividade antioxidante através de quelação de metais e do aumento do efeito dos flavonóides pela sinergia de duas enzimas também presentes no mel, glicose oxidase e catalase; que possuem atividade antioxidante em razão da capacidade para eliminar espécies oriundas do oxigênio molecular e espécies reativas não radicalares nos alimentos (VIURDA-MATOS et al., 2008).

## **2.7 Compostos bioativos presentes no leite**

O leite é a excreção proveniente dos mamíferos, produzido por cerca de 4500 espécies com algumas diferenças específicas. Objetiva atender a necessidade nutricional e fisiológica da qual dependem o recém-nascido da espécie. O leite é um alimento de alto valor nutricional, composto por lactose, proteínas, lipídios, fatores de crescimento e vitaminas; além de exercer funções de proteção dadas por alguns de seus constituintes menores, tais como imunoglobulinas, peptídeos antibacterianos e antimicrobianos (O'MAHONY; FOX, 2014).

### **2.7.1 Proteínas do Leite**

O leite fornece cerca de 30 a 36 g de proteína/L; e é considerado, portanto, uma fonte importante de proteínas na dieta. As proteínas do leite compreendem dois grupos principais: as proteínas do soro são solúveis e representam 20% da fração proteica do leite, enquanto a caseína representa a fração insolúvel, constituindo 80% (DAMODARAN; PARKIN; FENEMMA, 2010).

Além das funções básicas de nutrição, as proteínas do leite apresentam inúmeras funções biológicas específicas, como por exemplo, suas atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-trombótica, funções imunomoduladoras, além de facilitar a absorção de outros nutrientes (MILLS et al., 2011). Tais propriedades fazem desses componentes potenciais ingredientes de alimentos promotores da saúde (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011).

As proteínas do leite são consideradas atualmente as principais fontes de peptídeos biologicamente bioativos (PBAs). Estes são definidos como peptídeos com atividade similar a uma droga ou hormônio, que eventualmente modulam a função fisiológica ao se ligarem a

receptores específicos da célula-alvo, levando a indução de respostas fisiológicas (SAAD, CRUZ; FARIA, 2011).

Os peptídeos bioativos podem ser gerados a partir da fermentação do leite pelas bactérias lácticas, resultando em produtos lácteos que podem trazer benefícios à saúde quando ingeridos regularmente. Peptídeos com atividade antioxidante podem ser liberados durante a degradação de caseínas e durante a fermentação do leite por cepas de lactobacilos proteolíticas. A maior parte desses peptídeos é derivada de alfa-caseína e possui ação contra radicais livres, sendo capaz de inibir a oxidação de origem enzimática e não enzimática (SAAD, CRUZ; FARIA, 2011).

Componentes do soro do leite, como imunoglobulinas, enzimas (lisozima e lactoperoxidase) e lactoferrina participam da imunidade passiva contra infecções no lúmen intestinal, assim como podem contribuir para a redução de cargas oxidantes geradas por inflamações. Parte da lactoferrina (6-10%) não é digerida pelo trato intestinal, podendo alcançar o cólon e desempenhar atividades prebióticas, especialmente favorecendo *Bifidobacterium*. A lactoferrina liga-se ao ferro, tornando o meio mais estável ao eliminar o ferro livre, podendo este catalisar reações oxidantes. Dessa forma, a lactoferrina pode prevenir a peroxidação lipídica em virtude do sequestro de ferro (ACTOR, 2009). Na tabela 1, são apresentadas a composição proteica do leite e suas funções.

**Tabela 1:** Principais proteínas do leite e suas funções.

Proteína	Leite (g.L <sup>-1</sup> )	Funções
Proteína total	34	-
Caseína total	26	Carreador de íons (Ca, Po <sub>4</sub> , Fe, Zn,Cu); precursor de PBAs
Alfa-caseína	13,5	Precursor de PBAs (peptídeos Bioativos)
Beta-caseína	8,6	Precursor de PBAs
Kapa-caseína	3,3	Precursor de PBAs
Beta-lactoglobulina	3,2	Carreador de retinol, antioxidante
Alfa-lactoglobulina	1,2	Síntese de lactose, carreador de Ca, imunomodulação, anticarcinogênico
Lactoferrina	0,1	Antimicrobiano, antioxidante, imunomodulador
Lisozima	1,26 x 10 <sup>6</sup>	Antimicrobiano, imunomodulador
Lactoperoxidase	0,03	Antimicrobiano

Adaptado: Fox et al., Dairy Chemistry and Biochemistry, 2015.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar a tolerância de lactobacilos ao peróxido de hidrogênio em presença das matrizes mel e leite, bem como o efeito deste oxidante sobre a peroxidação dos lipídeos de membrana.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Avaliar a tolerância ao estresse oxidativo de lactobacilos (*L. paracasei* DTA 83, *L. rhamnosus*, DTA 76, *L. acidophilus* LA 05) em presença de leite e mel;
- Avaliar a tolerância ao estresse oxidativo da levedura *Saccharomyces boulardii* 17.
- Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio nas diferentes cepas de lactobacilos;
- Avaliar a peroxidação dos lipídios de membranas dos lactobacilos e da levedura utilizando o malonaldeído (MDA) como marcador do estresse oxidativo.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Mel**

Nesta pesquisa foi utilizado o mel de *Apis mellifera* florada assa-peixe, de cor âmbar escuro, colhido em fevereiro de 2017 na região de Teresópolis-RJ, Brasil. Soluções a 5% de mel foram preparadas em água estéril no momento da utilização.

#### **4.1.1 Determinação do teor de ferro no mel**

Três gramas da amostra foram pesados e levados para a placa de aquecimento para eliminação parcial do conteúdo de matéria orgânica, até ausência de desprendimento de fumaça. Para obtenção de cinzas, a amostra foi incinerada em forno mufla a 550 °C / 12 horas. Após o resfriamento, as cinzas foram dissolvidas com solução de HNO<sub>3</sub> (25%) e transferidas com água destilada para um balão volumétrico de 100 mL. A leitura foi realizada em um fotômetro (multiparâmetro HANNA Instruments HI 83200), método Ferro (alta faixa).

### **4.2 Leite**

Leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) foi reconstituído a 12% em água estéril e autoclavado a 0,5 ATM por 10 minutos.

### **4.3 Obtenção, ativação e manutenção das culturas de *Lactobacillus spp***

As cepas de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* foram isolados de material fecal de recém-nascido com até duas semanas de idade, durante o trabalho de doutorado de Oliveira (2011). Estas culturas fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, Seropédica, Brasil. A cultura comercial de *Lactobacillus acidophilus* (La 5) foi obtida da Christian Hansen®.

**Quadro 1:** Cepas de *Lactobacillus* utilizadas no estudo.

<b>Microrganismos</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i> – DTA 83
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> – DTA 76
<i>Lactobacillus acidophilus</i> – La 5

As culturas foram mantidas congeladas a -20°C em caldo MRS (Merck), com 20% de glicerol como um agente crioprotetor (GANCEL et al., 1997). No momento da utilização, as culturas foram descongeladas em geladeira e centrifugadas a 6000 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado reconstituído em caldo MRS. As culturas de trabalho foram mantidas em agar MRS semisólido (0,7% ágar) com 1,5% de carbonato de cálcio. No momento da utilização as culturas foram preparadas por três transferências sucessivas em caldo MRS, adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) incubadas a 36°C durante 24 horas em aerobiose, para os microrganismos *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, enquanto que para o *L. acidophilus* foi utilizada jarra de anaerobiose (atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> reagindo carbonato de cálcio com solução de ácido sulfúrico, além de queima do O<sub>2</sub> residual com vela acesa).

#### **4.4 Obtenção, ativação e manutenção da cultura de *Saccharomyces boulardii***

A cultura comercial de *Saccharomyces boulardii* foi isolada a partir do produto comercial Floratil® (Merck). Para ativação, uma alíquota da cultura liofilizada foi reidratada em 10 mL de caldo YPD (contendo extrato de levedura 1%, glicose 2% e peptona 2%) e incubada em estufa a 30°C por 24 horas. Na segunda repicagem transferiu-se uma alçada para outro tubo de ensaio com YPD (10 mL). Foi realizado isolamento em agar YPD coloração e observação ao microscópio. A cultura de trabalho foi mantida em refrigerador a 7°C.

#### **4.5 Padronização do inóculo de *Lactobacillus spp***

Para estabelecer a concentração do inóculo foi determinada a equação de regressão linear relacionando absorvância com UFC/mL. Diluições 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 foram preparadas e a absorvância determinada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 620nm para cada diluição.

#### **4.6 Padronização do inóculo de *S. boulardii***

Preparou-se inóculo com concentração desconhecida através da transferência de uma alçada de repique fresco para 100mL de meio YPD líquido estéril. Após 22h de incubação sob agitação de 160rpm em shaker a 28°C, uma alíquota de 10mL foi retirada e transferida para micro tubo previamente tarado e reservou-se. A seguir foram feitas diluições 1:5, 1:10, 1:15, 1:25 da cultura e a absorvância lida em espectrofotômetro a 570nm. A alíquota de 10 mL reservada foi centrifugada a 2240 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e lavado duas vezes com água destilada estéril. O pellet foi colocado em estufa a 45 °C por 72h, quando se obteve peso constante.

Através da massa de células contida nos 10mL de meio foi calculada a concentração do inóculo inicial e a partir das absorvâncias das diluições, foi estabelecido uma curva padrão e o fator de conversão de absorvância em concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ).

As culturas de trabalho foram mantidas em agar YPD 2% sólido, em tubo inclinado sob refrigeração. No momento da utilização, foram ativadas através da transferência de uma alçada para superfície em agar YPD sólido e incubadas a 28°C por 22 horas sob agitação de 160rpm em incubadora tipo shaker. Em seguida, transferida pela segunda vez para caldo YPD seguida de incubação sob as mesmas condições. Após o crescimento, a concentração do inóculo foi determinada através da medida da absorvância em espectrofotômetro a 570nm de uma suspensão celular diluída em água estéril e convertida em massa de célula (mg de peso seco de célula/mL de meio de cultura).

#### **4.7 Sobrevivência ao estresse oxidativo - Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pela diferença entre o número de colônias nos meios MRS do controle não estressado e o número de colônias nos meios sob estresse com peróxido de hidrogênio, na presença e na ausência de leite e mel como possíveis agentes protetores. A partir do inóculo, as células foram centrifugadas a 504 g por 3 minutos, descartado o sobrenadante, adicionado solução salina peptonada e levado a centrifuga para lavagem de resíduos do caldo MRS. Em seguida, foram acrescentados um volume de inóculo correspondente a  $10^6$  UFC/ml aos tubos com as matrizes e solução salina peptonada. Os mesmos permaneceram em contato por 2 horas. Após, o volume de cada tubo foi dividido em volumes iguais (em um adicionou-se  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração de 20Mm e ao outro não,).

Ambos foram mantidos em repouso por 1 hora. Em seguida, foi realizado plaqueamento em superfície de alíquotas de diluições decimais seriadas. As placas preparadas em duplicata e as colônias contadas após 48 horas de incubação à temperatura de 36°C(Figura 2).

Já para o ensaio de viabilidade celular com levedura, na etapa de tratamento com as matrizes e exposição ao peróxido de hidrogênio, a *S. boulardii* foi mantida em agitação em incubadora tipo shaker. Preparou-se diluições decimais seriadas com plaqueamento em duplicata em agar YPD e contagem das colônias após 48 horas de incubação à temperatura de 30°C.

### Viabilidade celular

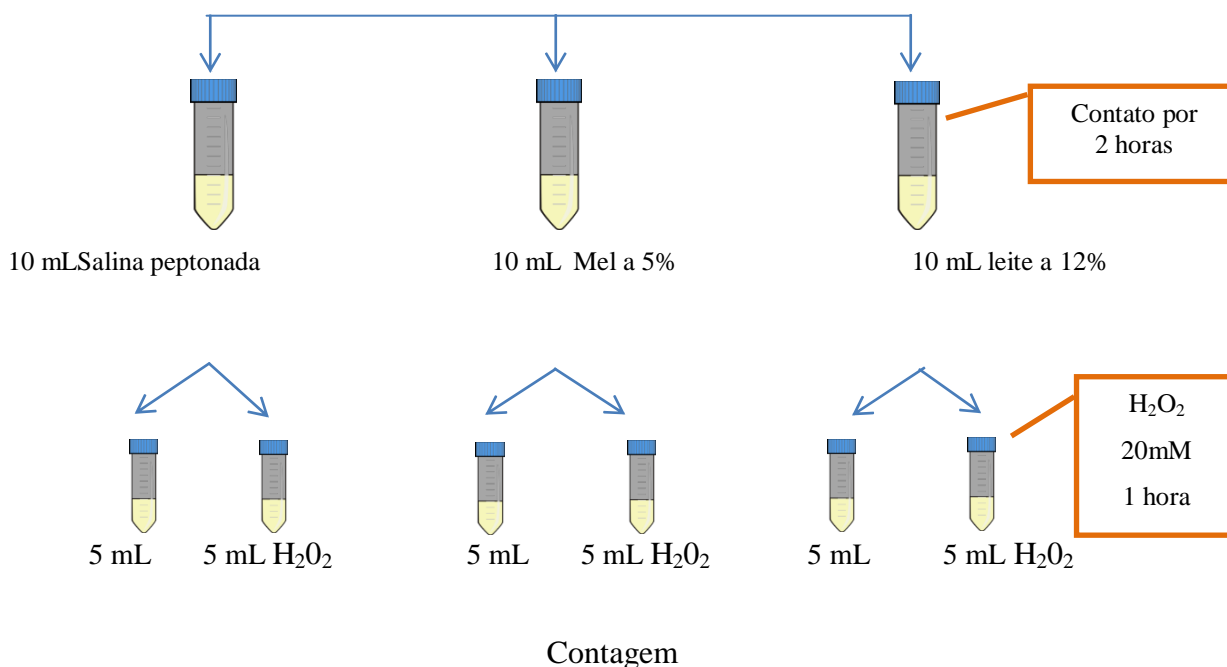
Ajuste do inóculo - $10^6$ UFC/mL

Centrifugação - 504 g /3 minutos

Descarte do sobrenadante, adição de solução salina peptonada (3 mL)

Centrifugação – lavagem resíduo de MRS

Adição do inóculo às matrizes

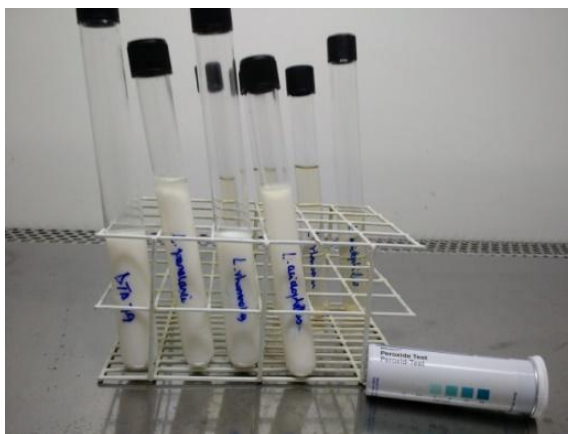


**Figura 2** – Fluxograma do ensaio de viabilidade celular.



#### 4.8 Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio

A capacidade de produção de  $H_2O_2$  por cepas de *Lactobacillus* foi avaliada em duas matrizes, leite e solução de mel. Para tanto a cultura de cada microrganismo em MRS semissólido foi transferida para tubos com 3,0 mL de leite a 12% e mel a 5% e incubadas por 24h a 36°C, que serviu para inocular (2%) tubos contendo 20 mL de leite a 12% e mel a 5%. Após incubação por 24 horas à temperatura de 36°C em aerobiose, foi realizada dosagem de peróxido utilizando tiras do teste semi-quantitativo Peroxid-Test Merckoquant (MERCK, Alemanha).



**Figura 3:** Teste de produção de  $H_2O_2$ , utilizando fitas dosadoras (Peroxid Test Merck).

#### 4.9 Peroxidação lipídica

A avaliação da tolerância ao estresse oxidativo de isolados de lactobacilos potencialmente probióticos foi realizada usando uma modificação do método biológico descrito por Steels; Learmonth e Watson (1994). Este método mede a resposta de células de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse oxidativo com base no aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativo da formação de malondialdeído, produto da peroxidação lipídica.

#### 4.10 Tratamento dos Lactobacilos

A partir do inóculo em caldo MRS, um volume correspondente a 50mg de células foi centrifugado e lavado duas vezes com água destilada estéril. Em um dos tubos foi adicionado

o oxidante peróxido de hidrogênio na concentração de 20 mM e o outro mantido sem adição da substância, sendo, portanto o controle. Ambos permaneceram em repouso por 60 minutos.

#### **4.11 Determinação de Malonaldeído (MDA)**

Após o tratamento, as células foram ressuspensas em 500µL de TCA 10% (ácido tricloroacético), transferidas para tubos de parede grossa contendo 1,5 g de pérolas de vidro de 40µm, agitadas em vortex (Marca Gehaka<sup>®</sup>) por 20 segundos totalizando 6 ciclos de para promover lise da parede celular.

O extrato foi recolhido em microtubos e as pérolas de vidro lavadas com 500µL de TCA 10% (Vetec), sendo recolhidos no mesmo microtubo. Após a lise os extratos foram centrifugados a 1433,6 g. Ao sobrenadante coletado foram adicionados os reagentes para o ensaio TBARS (EDTA, ácido tiobarbitúrico). O ensaio foi realizado com a mistura reacional contendo 150µL de extrato, 150µL de H<sub>2</sub>O, 100µL de EDTA (Vetec) 0,1M e 600µL de ácido tiobarbitúrico (Merck) 1% em NaOH 0,05M. Também foi preparado um branco reacional contendo 0,3mL de H<sub>2</sub>O sem o extrato celular. A mistura reacional foi incubada a 100°C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorvância medida em espectrofotômetro a 532nm. A dosagem foi feita em duplicata e os resultados expressos em picomoles de malonaldeído (MDA – produto da peroxidação lipídica) por miligrama de células (pmoles MDA/mg células) (STEELS; LEARMONTH; WATSON, 1994).

#### **4.12 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média e erro padrão de três experimentos independentes. Em todos os casos foram aplicados o teste de análise de variância ANOVA. Quando avaliadas somente uma única variável experimental, os dados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. Já nos casos em que foram avaliadas duas variáveis experimentais, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias. Nesse caso, quando necessário, foram realizadas múltiplas comparações através do teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Para análise estatística foi utilizado o software Graphpad Prism5 (La Jolla, California, EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado um teste preliminar, a fim de determinar a concentração de peróxido de hidrogênio necessária para causar uma redução decimal. A cepa de *L. paracasei* foi suspensa em solução salina e exposta às concentrações de 2, 8 e 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seguida de contagem cujos resultados estão expressos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Número de UFC/mL do microrganismo *L. paracasei*, após exposição a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora.

Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	UFC/mL
Controle- sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,4 x 10 <sup>9</sup>
2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,8 x 10 <sup>9</sup>
8 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,0 x 10 <sup>9</sup>
20 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,5 x 10 <sup>8</sup>

De acordo com os resultados, a partir da concentração de 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> houve redução de *ca* um ciclo logarítmico na cultura estressada com peróxido e, por isso, esta foi a concentração estabelecida para o experimento.

### 5.1 Determinação da Capacidade de Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *Lactobacillus spp*

Na tabela 3, estão expressos os resultados da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L) pelas cepas de lactobacilos. O peróxido de hidrogênio é produzido em condições fisiológicas normais e tem importância em processos de sinalização celular. Porém, o desequilíbrio em sua concentração pode originar radicais hidroxila de elevado potencial deletério para as estruturas celulares.

É importante salientar que entre as bactérias lácticas é comum a capacidade de produzir peróxido de hidrogênio (MARTY-TEYSSET, DE LA TORRE E GAREL, 2000; REDDY et al., 2008), como é o caso das espécies *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* analisadas neste estudo (Tabela 3). Logo, em baixas concentrações o peróxido de hidrogênio pode ser considerado um fraco oxidante, incapaz de provocar letalidade aos lactobacilos.

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um mecanismo de defesa intracelular das bactérias ácido lácticas (BAL) e se deve à carência da enzima catalase (FORSYTHE, 2002). Pesquisadores sugeriram que o mecanismo de produção de peróxido por BAL envolve reações oxidativas em carboidratos ou compostos relacionados (CONDON, 1987;); outros indicaram que uma NADH oxidase está envolvida (ANDERS et al., 1970).

A produção de peróxido de hidrogênio pelos lactobacilos pode ser benéfica para a preservação de alimentos e a prevenção do crescimento de patógenos transmitidos por alimentos, o que seria uma vantagem competitiva das cepas analisadas. Em trabalho realizado por Cálderon et al. (2007) com iogurtes (contendo *L. casei* CRL 431 e *L. acidophilus* LR 35) os autores constataram diminuição da população de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, em níveis não detectáveis após 12 dias de armazenamento a 4 °C. Parte do efeito antimicrobiano observado em estudos com bactérias lácticas se deve justamente a produção de substâncias inibidoras , como: peróxido de hidrogênios e bacteriocinas (PEREIRA E GÓMEZ , 2007).

Tabela 3: Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L) por diferentes cepas de *Lactobacillus* cultivadas em leite e mel 5% utilizando o método semi-quantitativo (Peroxid Test Merck).

<i>Lactobacillus</i> spp.	Cultivados em leite	Cultivados em 5% mel
<i>L. rhamnosus</i> DTA 79	0,5	0,5
<i>L. paracasei</i> DTA 83	negativo	0,5
<i>L. acidophilus</i> La 05	negativo	5,0
<i>L. rhamnosus</i> DTA 76	0,5	2,0

Todas as cepas de lactobacilos cultivadas em mel em condições aeróbicas, produziram peróxido de hidrogênio. *L. acidophilus* La 5 e *L. rhamnosus* DTA 76 produziram maior quantidade de peróxido. Entretanto *L. acidophilus* La e *L. paracasei* 83 não produziram peróxido quando cultivados em leite nas condições do experimento.

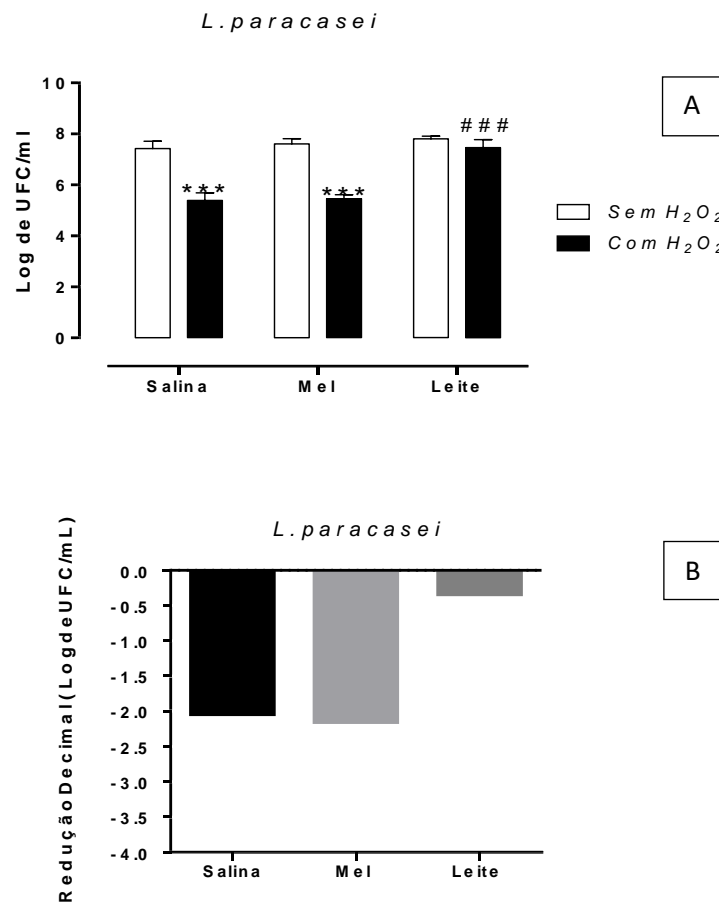
Essa maior produção de peróxido na matriz do mel está possivelmente relacionada à presença de Fe<sup>2+</sup> em sua composição. Valdés-Silverio et al. (2018) relataram a capacidade do mel de eucalipto de reduzir Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup> e consequente aumento da atividade antibacteriana. Hategekimana, Ma e Li (2011) mostraram que os minerais Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> estavam envolvidos na formação do creme no mel, enquanto o Fe<sup>2+</sup> participou da mudança de cor para o alcatrão preto em pH 4,12 e acima. Foi empregado neste estudo mel de cor âmbar escuro, cujo teor de ferro era de 1,32 mg/100g, cerca de quatro vezes acima do normalmente encontrado em méis de cor clara.

Martin e Suárez (2010) verificaram que o peróxido de hidrogênio começa a ser produzido por *L. jensenii* como consequência da aeração das culturas, presumivelmente porque as culturas líquidas estáticas são praticamente anaeróbicas. Culturas com  $\text{Fe}^{3+}$ , hemina e hemoglobina não acumularam  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{Fe}^{3+}$  ativou uma peroxidase extracelular que destruiu o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido pelas culturas.

Por outro lado, na presença de quantidades micromolares de  $\text{Fe}^{2+}$ , *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foi capaz de ligar quantidades nanomolares de ferro. Esta ligação foi o resultado da oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  por  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido pelo microrganismo e a subsequente ligação superficial do Fe (III) resultante, mais provavelmente na forma de  $\text{Fe}(\text{OH})^3$ .

## **5.2 Tolerância de lactobacilos ao peróxido de hidrogênio em presença de mel e leite**

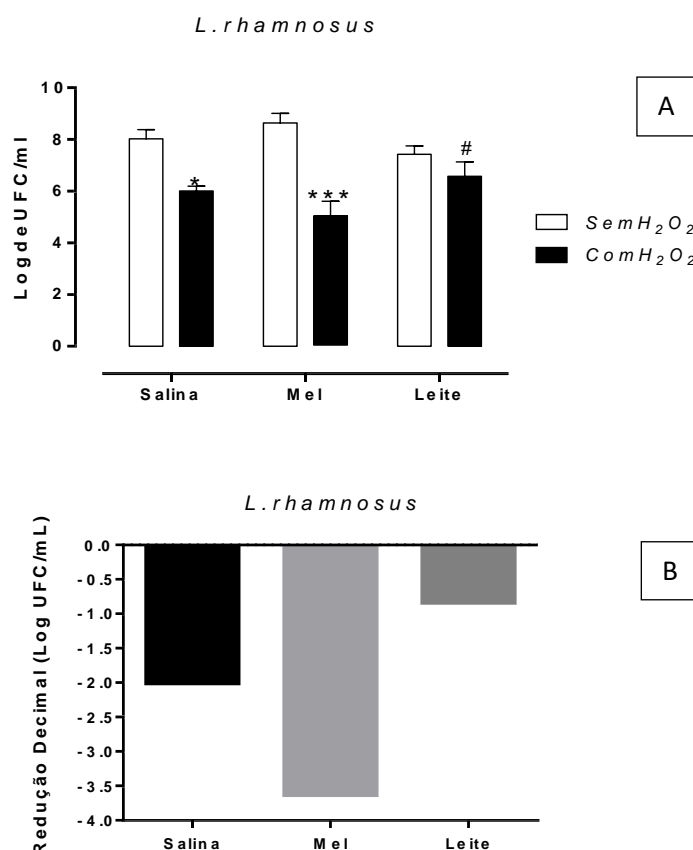
Os resultados da tolerância do *L. paracasei* em presença e ausência do oxidante peróxido de hidrogênio e a influência das matrizes mel e leite sobre a sobrevivência das culturas estão demonstrados na Figura 4.



**Figura 4** –Viabilidade de *L. paracasei* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite. \*\*\* representa  $p < 0,001$  e ###  $p < 0,001$  (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *L. paracasei*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B).

Observou-se redução significativa da viabilidade ( $p < 0,001$ ) quando as células foram expostas ao peróxido de hidrogênio na cultura controle em salina e na presença de mel . Porém, nas células tratadas com leite, foi observado manutenção da viabilidade de *L. paracasei*, tanto na ausência como na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não havendo diferença significativa nas culturas com e sem o oxidante, o que indica efeito protetor da matriz.

Na figura 5, temos os resultados da viabilidade do microrganismo *L. rhamnosus* em presença e ausência do peróxido de hidrogênio e a influência das matrizes mel e leite sobre o crescimento das culturas.



**Figura 5** –Viabilidade de *L. rhamnosus* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite. \*\*\* representa  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  e #  $p < 0,05$  (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *L. rhamnosus*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B).

Observou-se redução significativa da viabilidade quando as células foram expostas ao peróxido de hidrogênio na cultura controle ( $p < 0,05$ ) e na presença de mel ( $p < 0,001$ ). Já em presença de leite, da mesma forma como observado em *L. paracasei*, esta redução não foi verificada ( $p > 0,05$ ) podendo-se concluir que houve efeito protetor do mesmo.

Na indústria alimentícia o leite e seus derivados são os principais veículos para carrear bactérias probióticas (KUMAR et al., 2015; PRISCO e MAURIELLO, 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Certos produtos lácteos contribuem para a sobrevivência dos probióticos a condições hostis como a presença do suco gástrico, particularmente por seu efeito tamponante e protetor (SAAD et al., 2011). De fato, o efeito protetor do leite sobre a manutenção da viabilidade das culturas *L. paracasei* e *L. rhamnosus* encontrados em nossa pesquisa corroboram com a literatura. Buriti et al. (2005) na fabricação de queijos Minas Frescal produzidos com *Lactobacillus paracasei* LBC 82 constataram, em comparação aos queijos

controles, um aumento da viabilidade da cultura probiótica durante todo o armazenamento, com contagens próximas de 7, entre 7 e 8, próximas de 8 e entre 8 e 9 log UFC/g após, respectivamente, 1, 7, 14 e 21 dias.

Lee et al (2015) investigaram os benefícios potenciais do consumo de probióticos através de alimentos lácteos, em comparação a outras matrizes alimentícias ou suplementos. A matriz láctea garantiu um elevado grau de sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal e benefícios desejados no controle de colite.

Aragon-Alegro et al. (2007) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus paracasei* LBC 82 em mousses de chocolate potencialmente probióticas e simbióticas fabricadas, respectivamente, sem e com a adição do prebiótico inulina. Os autores concluíram que a contagem de *Lactobacillus paracasei* foram sempre superiores a 7 log UFC/g durante 28 dias de armazenamento, tanto nas mousses probióticas como também nas simbióticas.

Costa (2014) desenvolveu um sorvete simbiótico de açaí e avaliou, entre outras características, a viabilidade de *L. rhamnosus* GG ao longo de seu armazenamento a -18°C por até 112 dias. Naquele estudo, as populações do microrganismo se mantiveram estáveis e entre 8 e 9 log UFC.g<sup>-1</sup> para todas as formulações, durante todo período de armazenamento.

Sabe-se que no leite numerosas enzimas podem ser encontradas, como lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. A auto-oxidação lipídica no leite é afetada por uma interação complexa de pró e antioxidantes (LINDMARK-MÅNSSON e AKESSON, 2000). Entre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A degradação do peróxido de hidrogênio pode ser catalisada pela catalase e pela glutathione peroxidase que também pode degradar os peróxidos lipídicos. A lactoferrina pode ter um papel importante pela ligação de Fe<sup>2+</sup> pró-oxidantes. Entretanto, estes sistemas enzimáticos são inativados pelo tratamento do leite em temperaturas de pasteurização (GUERRA et al., 2018).

Por outro lado, é sabido que a caseína do leite também pode apresentar atividade antioxidante. De fato, as caseínas parecem favorecer a auto-oxidação do ferro e, assim, inibir a peroxidação lipídica (CERVATO, CAZZOLA e CESTARO, 1999). O efeito da alfa-caseína do leite na atividade antioxidante de polifenóis presentes em chá foi estudada por Bourassa et al. (2013) usando três métodos de oxidação complementares: eliminação de cátions radicais ABTS (+), voltametria cíclica e inibição da peroxidação lipídica. Usando os ensaios ABTS (+), a atividade antioxidante de todos os polifenóis foi reduzida em 11-27% na presença de

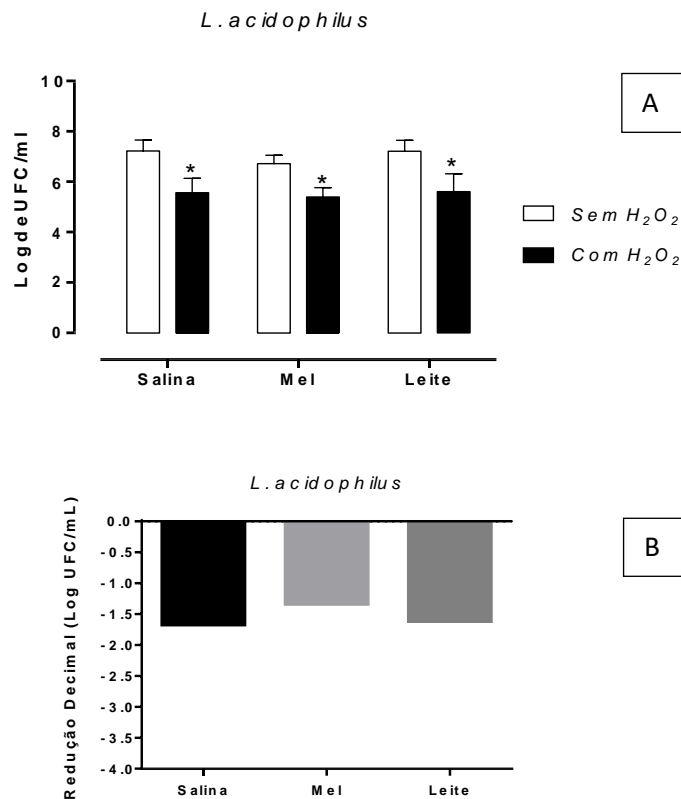


caseínas. Através da voltametria cíclica, a corrente total medida no eletrodo foi diminuída pela presença da proteína, de 21% para 61%. No entanto, empregando o método de peroxidação lipídica, a atividade antioxidante de todos os polifenóis foi alterada (de 6% para 75%) após a adição de alfa-caseína.

Rival, Boeriu e Wichers (2001), avaliaram a atividade antioxidante da caseína e seus peptídeos usando três reações: a oxidação catalisada por lipoxigenase, oxidação induzida por AAPH (aminodipropano) no ácido linoleico e a oxidação catalisada pela hemoglobina do hidroperóxido do ácido linoléico. Os peptídeos foram capazes de inibir a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática, sugerindo que ácidos graxos intermediários são alvos de radicais livres. A capacidade antioxidativa não foi perdida com a desfosforilação ou a proteólise das proteínas. O fracionamento da digestão com caseína trípica produziu peptídeos com atividade antioxidante. Os autores supõem que proteínas e peptídeos possam, juntamente com o ácido graxo, ser o alvo de degradações oxidativas e até iniciar reações indesejadas mediadas por radicais dependendo da estabilidade do radical proteína / peptídeo resultante.

Segundo Ribeiro (2012), as proteínas do soro do leite podem resultar em peptídeos bioativos durante a digestão ao longo do TGI, pela ação de proteases digestivas ou microbianas, ou mesmo por enzimas de cultura starter. Dessa forma, as proteínas do soro ao serem empregadas em alimentos contendo microrganismos probióticos, interagem de forma benéfica na sua multiplicação. Devido ao alto valor proteico, serve como fonte de nitrogênio, amino-açúcares, ácido siálico e N-acetilgalactosamina, que podem ser fermentados pelos microrganismos probióticos. As evidências não deixam dúvidas que o leite é uma matriz efetiva na manutenção da viabilidade, podendo ser empregado na elaboração de diversos alimentos com finalidades probióticas(SILVA, BOLINI e ANTUNES, 2004).

Os resultados da viabilidade do *L. acidophilus* em presença e ausência do oxidante peróxido de hidrogênio e a influência das matrizes mel e leite sobre o crescimento das culturas estão indicados na Figura 6.



**Figura 6** –Viabilidade de *L. acidophilus* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite. \* representa  $p < 0,05$  (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *L. acidophilus*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B).

Diferentemente dos microrganismos *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, que mantiveram a viabilidade em presença de leite; não houve diferença significativa de sobrevivência de *L. acidophilus* frente a ação do peróxido de hidrogênio nas diferentes matrizes.

Shamala et al. (2000) e Stanton (2003) afirmam que bifidobactérias, não se adaptam bem ao leite fermentado e sofrem com a presença de oxigênio. Assim como bifidobactérias, a atividade *L. acidophilus* é maior em baixas concentrações de oxigênio, por ser microaerofílico ou aneróbico e fermentador estrito. Deste modo, na elaboração de alimentos probióticos é fundamental considerar a escolha da cepa mais adequada para cada tipo de produto. Um critério de seleção importante para cepas é a multiplicação e a sobrevivência sob condições de acidificação e aerobiose. Logo, pesquisadores sugerem o aumento da multiplicação dessas bactérias em leites através da adição de fatores bifidogênicos ou prebióticos (TAMINE, et al., 2005).

Segundo Juven & Pearson (1996), o  $H_2O_2$  pode ser convertido em radicais hidroxila por íons de metais de transição (por exemplo, ferro, cobre), que foram implicados na formação de radicais hidroxila a partir de  $H_2O_2$ ; por íons superóxido interagindo com  $H_2O_2$  na presença de  $Fe^{2+}$  para produzir radicais hidroxila, através da reação de Haber-Weiss catalisada por ferro, ou reação de Fenton catalisada por superóxido; e por irradiação UV.

Assim, um mecanismo que pode ser atribuído à ausência de proteção do mel na viabilidade de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* é a “Reação de Fenton”, onde o peróxido de hidrogênio reage com íons metálicos como  $Fe^{2+}$  para produzir radicais hidroxila. Ao se combinar com o átomo de ferro, recebendo um elétron, o peróxido de hidrogênio torna-se o radical hidroxila, o mais reativo e deletério dos radicais, responsável por danos ao DNA, proteínas e membranas (STEVENS et al., 2010). O fato de quantidades traço de metais como Fe, Cu atuarem como promotores da oxidação lipídica na presença de hidroperóxidos, a interação do íon ferro no mel com peróxido de hidrogênio pode ser uma das razões do resultado encontrado na presente pesquisa (WASOWICZ et al., 2004).

Além disso, o interesse em possíveis benefícios para a saúde dos flavonóides aumentou devido à sua atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres observadas *in vitro*. No entanto, a eficácia antioxidante dos flavonóides *in vivo* é menos documentada, e devido às suas propriedades pró-oxidantes, eles são capazes de causar dano oxidativo por reagir com várias biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA. Até que ponto os flavonóides são capazes de agir como anti-oxidante ou pro-oxidantes *in vivo* ainda é pouco compreendido e este tópico claramente requer mais estudos (MAURYA E DEVASAGAYAM, 2010; PROCHÁZKOVÁ, BOUŠOVÁ E WILHELMOVÁ, 2011).

No entanto, existe produção de uma pequena quantidade de peróxido de hidrogênio no mel, em torno de 1 mmol / l (Molan, 1992), cerca de 1000 vezes menos do que na solução a 3% comumente usada como antisséptico. Nestas baixas concentrações os efeitos nocivos do peróxido de hidrogênio são inativados porque ocorre o sequestro e a inativação do ferro livre que catalisa a formação de radicais livres de oxigênio produzidos pelo peróxido de hidrogênio além de seus componentes antioxidantes que ajudam a eliminar os radicais livres de oxigênio (FRANKEL E ROBINSON, 1998).

Estudos têm demonstrado que a adição de mel em bebidas lácteas promove um aumento da viabilidade de microrganismos probióticos nestes produtos. Nesta pesquisa o mel e o leite foram avaliados separadamente e, embora os resultados sejam aparentemente contraditórios, foram obtidos em condições diferentes. O mel misturado ao leite pode ter tido o efeito pró

oxidante de seus componentes anulado pelos peptídios bioativos do leite. . Caldeira et al. (2018) em seu estudo com iogurtes constatou que o mel de Jataí e de abelha africana nas concentrações de 5 e 10% favoreceu a viabilidade de *L. acidophilus* LA-5 avaliados após 35 dias de armazenamento. Fiorda et al. (2016) ao desenvolver uma bebida fermentada com kefir verificou que a adição de mel (5% p/v) favoreceu a manutenção da viabilidade dos lactobacilos durante o armazenamento, atendendo a exigência da legislação para alimentos probióticos.

Em um estudo realizado por Chick, Shin e Ustonol (2001) na avaliação do uso de mel em produtos como iogurte, os autores verificaram que o mel poderia ser utilizado como adoçante adequado na fabricação de produtos lácteos fermentados, uma vez que não inibiu o crescimento e atividade dos microrganismos *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*. Segundo os autores, vários oligossacarídeos encontrados no mel podem ser responsáveis por essa multiplicação. Nestas pesquisas, no entanto, o mel era adicionado ao leite, enquanto que no presente estudo os efeitos do mel e leite foram avaliados separadamente.

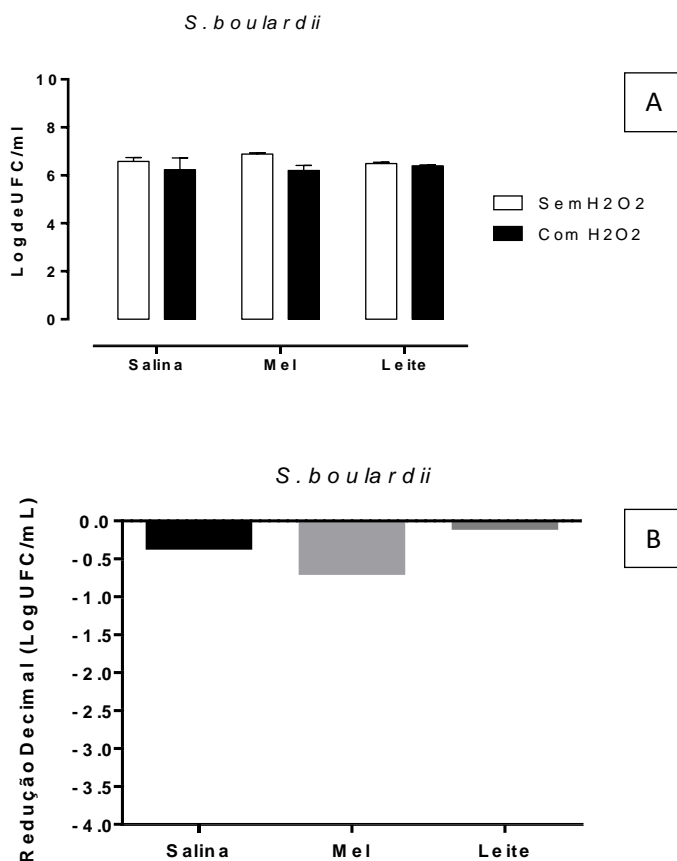
Macedo et al. (2008), embora tenham observado um pequeno crescimento em culturas de leite fermentado de *L. casei* adicionadas de mel *A. mellifera* a 3%, constataram que o mel não interferiu na viabilidade ( $p > 0,05$ ) dos lactobacilos, apenas de bifidobactérias. Varga (2006), testando soluções de mel até 5% em iogurte armazenado por 45 dias nas culturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* não observou influência significativa do mel na viabilidade. Curda e Plockova (1995) avaliaram o efeito do mel em concentrações de 0, 1, 3, 5 e 10% adicionados em leite sobre o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Os méis receberam tratamentos diferentes. Um foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e o outro não recebeu tratamento algum. Os resultados revelaram que *L. acidophilus* foi inibido em concentrações superiores a 5% de mel, independente do tratamento; enquanto as culturas mesófilas foram inibidas somente pela concentração de 10% de mel não tratado, não sendo inibidas por nenhuma das concentrações de mel esterilizado.

As divergências encontradas na literatura em relação ao efeito protetor dessa matriz também podem estar relacionadas à grande variedade de compostos encontrados nos méis. Os oligossacarídeos e polifenóis do mel variam de acordo com sua origem floral; e, portanto, o efeito prebiótico de diferentes méis pode diferir (SILVA et al., 2006). Além disso, a presença

de glicose, frutose e oligossacarídeos do mel pode estar relacionada à função de nutriente necessário ao crescimento, que não foi o objeto desta pesquisa, e não a atuação como antioxidante.

### 5.3 Tolerância de *Sacharomyces boulardii* ao peróxido de hidrogênio em presença de mel e leite

Os resultados da viabilidade celular da *S. boulardii* em presença e ausência do oxidante peróxido de hidrogênio e a influência das matrizes mel e leite sobre o crescimento das culturas estão expressos na Figura 7.



**Figura 7** –Viabilidade de *S. boulardii* submetido a estresse oxidativo em presença de mel e leite (A) e respectiva redução decimal (Log UFC/mL) da população de *S. boulardii*, após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) por 1 hora (B)

Não foi observada diferenças significativas na sobrevivência da cultura de *S. boulardii* para nenhum dos tratamentos (Figura 8: A). A levedura mostrou-se resistente ao peróxido de

hidrogênio com padrão semelhante de crescimento em solução salina, no mel e no leite. Nesse caso, percebemos que a adição das matrizes não interfere na manutenção e atividade da *S. boulardii*, onde mecanismos de defesa intracelular podem estar atuando. Provavelmente, a resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se deve a ação da catalase e glutathione peroxidase, enzimas produzidas por leveduras, sobretudo do grupo *Saccharomyces*, a primeira decompõe o peróxido em água e oxigênio e a segunda catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos a seus correspondentes alcoólicos, através da conversão de glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013).

Estudo taxonômico revela que *S. boulardii* tem semelhanças genéticas com *S. cerevisiae*, sendo diferente apenas do ponto de vista fisiológico e por isso deve ser referida como *S. cerevisiae* var. *boulardii* (KÜHLE; SKOVGAARD; JESPERSEN, 2005). A *S. boulardii* se distingue de *S. cerevisiae* por possuir propriedades benéficas específicas (GRAFF et al., 2008; VANDENPLAS; BRUNSER; SZAJEWSKA, 2009) e ser resistente à acidez gástrica, a proteases e aos antibióticos (LOPES E PINTO, 2010).

A resposta a diferentes tipos de estresse é uma adaptação dos organismos vivos às condições ambientais adversas. Células de *S. cerevisiae*, submetidas à condição de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos causados pelo estresse (SWAN, T. E WATSON, K., 1998; ESTRUCH, F., 2000). Essa resposta é caracterizada pela síntese de proteínas específicas, aumento do nível celular de trealose e glicerol, alteração da composição lipídica da membrana plasmática e da atividade da H<sup>+</sup> - ATPase, modulação do processo de troca iônica e no caso de estresse oxidativo, produção de enzimas como glutathione e superóxido dismutase (BIRCH, R. M. E WALKER, G. M., G. M., 2000).

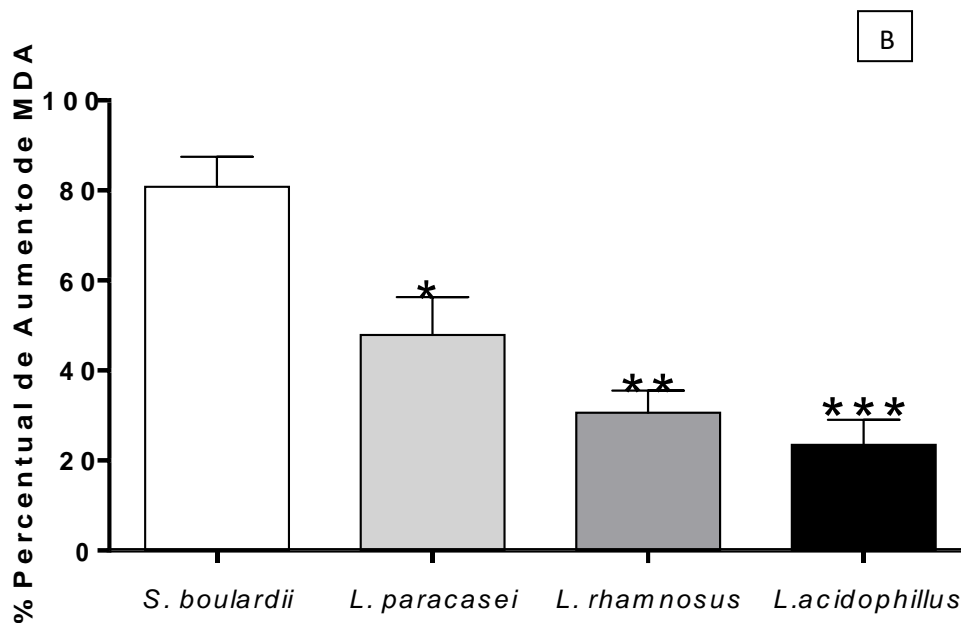
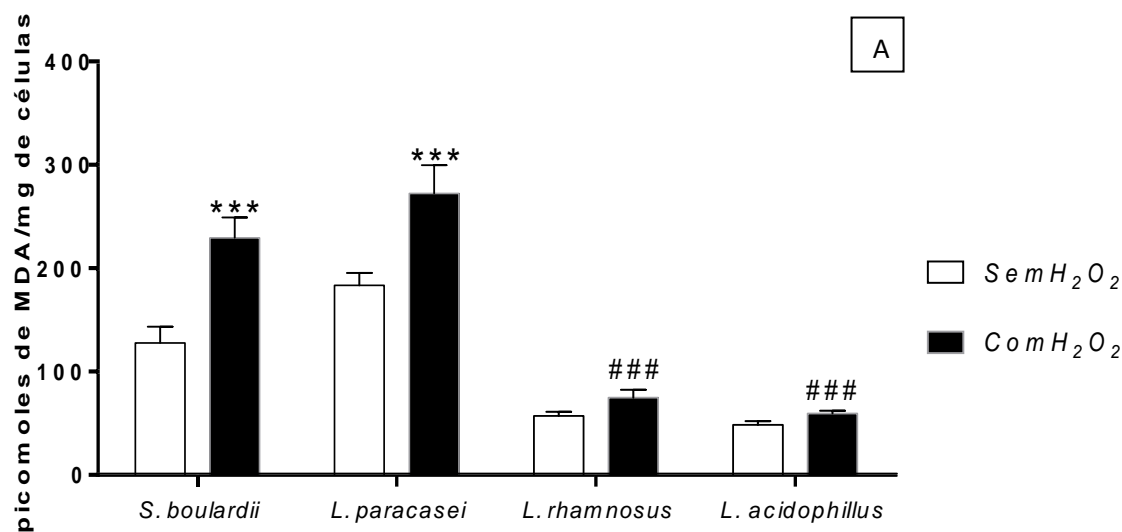
Logo, a resistência da *S. boulardii* ao peróxido de hidrogênio, no caso do presente estudo, sugere que, assim como relatado em cepas de *S. cerevisiae*, um sistema de defesa enzimático está presente e em condições de estresse ativa uma sequência de genes para sintetizar enzimas e moléculas de proteção (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

#### **5.4 Avaliação da peroxidação lipídica**

Através dos resultados de peroxidação lipídica é possível uma avaliação mais apurada da condição redox intracelular, uma vez que quantifica produtos oriundos da degradação dos lipídios de membrana gerados pelo aumento do estresse oxidativo intracelular.

Os fosfolipídios das membranas celulares podem ser completamente degradados quando expostos a espécies radicalares de oxigênio (RLO), fenômeno conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). O aumento do estresse oxidativo intracelular ocasionado pela ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares produzem principalmente radicais lipídicos ( $L\cdot$ ,  $LO\cdot$  e  $LOO\cdot$ ), que levam à destruição da estrutura celular e à falência dos sistemas antioxidantes; e, em condições extremas, à morte celular ( AYALA et al., 2014; GASCHLER, BRENT, 2017).

O ensaio de lipoperoxidação foi iniciado logo após a exposição dos microrganismos ao peróxido de hidrogênio na concentração de 20 mM por 60 minutos. As cepas controles (sem adição do oxidante) permaneceram em repouso durante o mesmo período de tempo. Após as etapas do ensaio de LPO, a absorvância foi medida e os resultados expressos em picomoles de MDA por miligrama de células (Figura 8: A).



**Figura 8** – Peroxidação lipídica causada pelo tratamento com peróxido de hidrogênio (20mM) por 1 hora, expressa pela formação de malonaldeído (MDA), em células de *S. boulardii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* (A) e respectivo percentual de aumento de MDA após contato com  $H_2O_2$  (20 mM) por 1 hora. \*\*\* representa  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  e ###representa  $p < 0,001$ .

De acordo com os nossos resultados (Figura 8: A), *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* apresentaram produção de MDA semelhante em ambas às situações: na ausência e presença de  $H_2O_2$ , demonstrando que para o ensaio de LPO a exposição ao oxidante não interferiu na



degradação dos lipídios de membranas desses dois microrganismos, sendo portanto considerados mais resistentes ao estresse oxidativo celular que os microrganismos *L. paracasei* e *S. boulardii*. Observa-se que a produção de MDA na levedura *S. boulardii* dobrou quando a cultura foi exposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *L. paracasei* apresentou perfil estatisticamente semelhante ( $p < 0,05$ ) a *S. boulardii* no quantitativo de MDA produzido em condições de estresse (Figura 8: A). Porém, no que se refere ao percentual de aumento de MDA após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, células de *L. paracasei* apresentaram produção cerca de duas vezes menor do que o encontrado na levedura (Figura 8 : B).

Os lactobacilos estudados comparadas a levedura *S. boulardii* foram mais resistentes a LPO. Das três cepas analisadas, a que obteve menor porcentagem de aumento (produção) de MDA, e portanto, a cultura que menos sofreu degradação em sua membrana celular (menos sensível, menor percentual de peroxidação) em presença do peróxido de hidrogênio, foi o *L. acidophilus* ( $p < 0,001$ ), seguido do *L. rhamnosus* ( $p < 0,01$ ) e *L. paracasei* ( $p < 0,05$ ). *S. boulardii* apresentou maior sensibilidade à LPO, com aumento de 80% na produção de MDA após contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A maior resistência a lipoperoxidação pelos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* provavelmente indica que tais microrganismos tenham algum sistema de defesa antioxidante, o que os torna melhor adaptados à autoproteção contra os danos oxidativos gerados pelo peróxido de hidrogênio. É interessante salientar que em relação à produção endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em teste realizado neste estudo todas as cepas (*L. acidophilus* La 5, *L. rhamnosus* DTA 76 e *L. paracasei* DTA 83) apresentaram a capacidade de produção de peróxido, ou seja, outros mecanismos de defesa além da capacidade de produção de peróxido podem estar envolvidos e explicar as diferenças de resistência a LPO.

Segundo Condon (1987), muitas bactérias desse gênero sintetizam NADH peroxidase, uma enzima importante para a detoxificação de peróxido de hidrogênio, e NADH oxidase que consome o oxigênio do ambiente.

Em bactérias probióticas, a atividade de NADH oxidase resulta na produção de peróxido de hidrogênio, enquanto NADH peroxidase consome o peróxido de hidrogênio, prevenindo o estresse oxidativo e conseqüentemente a morte celular (TALWALKAR e KAILASAPATHY, 2003).

A capacidade de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* de produzirem peróxido de hidrogênio e de tolerar altas concentrações desse composto pode estar relacionada à

capacidade de síntese de NADH oxidase e NADH peroxidase e assim explicar as diferenças encontradas nos ensaios de peroxidação lipídica dessas três bactérias lácticas.

Além disso, o tipo de lipídio presente na membrana citoplasmática também influencia na peroxidação. A estabilidade oxidativa dos lipídios é influenciada pelo número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes (e.g. íons metálicos de transição) ou de antioxidantes (BERSET E CUVELIER, 1996). O MDA forma-se unicamente a partir dos ácidos graxos, possuindo pelo menos três duplas ligações. Particularmente, quando o teor de MDA é baixo, outros aldeídos não provenientes do processo de degradação dos lipídios podem reagir com o TBA (e.g. acetaldeído e compostos da reação de Maillard). Os açúcares, nomeadamente a sacarose e a glicose, interferem exercendo um forte efeito sinérgico na formação de TBARS, sobrestimando dessa forma a extensão da oxidação. Por outro lado, o MDA pode não reagir com o TBA devido à sua complexação com proteínas, amins e outros compostos (FRANKEL, 1993).

Os dados da LPO não mostraram relação com os resultados da viabilidade celular. Todos os lactobacilos expostos ao peróxido tiveram redução decimal de cerca de 2 ciclos logarítmicos quando comparados aos controles (células em solução salina peptonada). Porém, para o ensaio de LPO, *L. paracasei* expressou maior produção de MDA enquanto *L. rhaminosus* e *L. acidophilus* não apresentaram produção significativa, sugerindo que outros marcadores oriundos, por exemplo, da degradação proteica possam ser utilizados para quantificar com uma maior exatidão lesões da membrana celular.

Um aumento nas carbonilas das proteínas do sangue tem sido relatado como resultado do estresse oxidativo. Quando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio atacam aminoácidos, lipídios e carboidratos, grupos carbonilas são produzidos e podem ser quantificados por HPLC ou técnicas de imunoensaio; no entanto, estas técnicas têm sido criticadas como não específicas e não confiáveis (GROTTO et al., 2009). Porém, a quantificação da carbonilação de proteínas não reflete a peroxidação lipídica, mas a oxidação da proteína.

Os ensaios de TBARS medem o MDA presente na amostra, bem como o malonaldeído gerado a partir de hidroperóxidos de lípidos pelas condições hidrolíticas da reação. O MDA é um dos vários produtos finais de baixo peso molecular formados através da decomposição de certos produtos de peroxidação lipídica primárias e secundárias. No entanto, apenas alguns

produtos da peroxidação lipídica geram o MDA, e o MDA não é nem o único produto final da formação e decomposição de peróxido graxo, nem uma substância gerada exclusivamente por meio de peroxidação lipídica (TREVISAN et al., 2001). Assim, é possível que não seja um bom marcador para avaliar este tipo de dano em células de diferentes microrganismos.

## 6 CONCLUSÃO

Depreende-se que em baixa concentração peróxido de hidrogênio não foi capaz de provocar letalidade aos lactobacilos, visto que os mesmos apresentaram capacidade em produzir este oxidante.

O tratamento com leite para os microrganismos *L. paracasei* DTA 83 e *L. rhamnosus* DTA 76 manteve a sobrevivência e metabolismo das culturas mesmo em presença de peróxido de hidrogênio; sendo, portanto, considerada uma matriz efetiva por seu efeito protetor.

O mel florada assa-peixe na concentração de 5% não foi capaz de auxiliar na manutenção da viabilidade dos *Lactobacillus* quando as células foram expostas ao peróxido de hidrogênio para nenhum dos microrganismos analisados, tendo inclusive causado efeito deletério na cepa de *L. rhamnosus* DTA 76.

A viabilidade celular da *S. boulardii* não apresentou relação com a peroxidação lipídica. A levedura *S. boulardii* apresentou resistência ao peróxido de hidrogênio nos testes de viabilidade celular, porém foi o microrganismo com maior produção de MDA nos ensaios de lipoperoxidação, e conseqüentemente, o microrganismo que sofreu maior estresse oxidativo comparados aos lactobacilos.

Em conclusão, diferentes mecanismos de proteção contra oxidantes são acionados por diferentes microrganismos e que a matriz leite protege lactobacilos da ação dos peróxidos.

Sugere-se que o teste da peroxidação sofra adaptações para avaliar o possível efeito das matrizes alimentícias, incluindo um cultivo prévio nestas matrizes antes do recolhimento das células para medição do MDA.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABADÍA-GARCÍA, L., CARDADOR, A., CAMPO, S., ARVÍZU, S., CASTAÑO-TOSTADO, E., REGALADO-GONZÁLEZ, C. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, 33, 191-197, 2013.

ACTOR JEFFREY K., HWANG SHEN-A., KRUZEL, MARIAN L. Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. **Curr Pharm Des** ; 15(17): 1956–1973, 2009.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; BOMPADRE, S.; QUILES, J. L.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1508-1516, 2012.

ANDERS, R.F., HOGG, D.M., AND JAGO, G.R. Formation of hydrogen peroxide by group N streptococci and its effect on their growth and metabolism. **Appl. Microbiol.** 19: 608-612, 1970.

ARAGON-ALEGRO LC, ALEGRO JHA, CARDARELLI HR, CHIU MC, SAADSMI. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Sci Technol.** 2007; 40 (4): 669-675.

ARBOS, K. A. **Qualidade sanitária e nutricional de hortaliças orgânicas.** Curitiba, 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2009.

AYALA, A. et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014.

AXELSSON L. **Lactic acid bacteria: classification and physiology.** In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; p.1-66, 2004.

BALTRUSAITYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; CEKSTERYTE, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, v. 101, p. 502-514, 2007.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, M. R; SILVA, M. M, A; WILLADINO, L; ULISSES C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, mar, 2014.

BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination

of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 553, n. 2, p. 185-190, mar. 2005.

BERSET, C., CUVELIER, M.E. Méthodes d'Évaluation du Degré d'Oxydation des Lipides et de Mesure du Pouvoir antioxydant. **Sci. Aliments** 16:219–245, 1996.

BIRCH, R. M. E WALKER, G. M., G. M. Influence of magnesium ions on shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae* and Microbiol. Technology. **26**, 678-687, 1999.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1758, n. 8, p. 994-1003, ago. 2006.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013.

BOURASSA P., CÔTÉ R., HUTCHANDANI S, SAMSON G. , TAJMIR-RIAHI. The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 128, 43–49, 2013.

BRAVO, J. A., FORSYTHE, P., CHEW, M. V., ESCARAVAGE, E., SAVIGNAC, H. M., DINAN, T. G., et al.. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, p. 16050-16055, 2011.

BROUWER ML, WOLT-PLOMPEN SA, DUBOIS AE, VAN DER HEIDE S, JANSEN DF, HOIJER MA *et al.* No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. **Clin Exp Allergy**, 36, p. 899-906, 2006.

BORSATO, D. M. **Avaliação de méis com indicação monofloral**. Ponta Grossa, 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

BUENO-COSTA, et al. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Science and Technology**, 65, 333-340, 2016.

BURITI F. C. A., ROCHA J.S., ASSIS E.G., SAAD S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT-Food Sci Technol**; 38 (2): 173- 180, 2005.

CALDEIRA et al.. Probiotic bacteria in bioyogurt with honey from Jataí and Africanized bees Pesq. agropec. bras., Brasília, v.53, n.2, p.206-211, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2018000200009>

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicioa yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.1p.51-55, mar. 2007.

CERVATO G, CAZZOLA R, CESTARO B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. **Int J Food Sci Nutr.** Jul; 50(4):291-6, 1999.

CHICK H., SHIN H.S., USTUNOL Z. Growth and Acid Production by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Grown in Skim Milk Containing Honey. **Journal of food science**, Vol. 66, No. 3, 2001.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v.46, p. 269 - 280, 1987.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4-5, p. 217–246, 2001.

COSTA, M. G. M. (2014). Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí (*Euterpe oleracea*) com *Lactobacillus rhamnosus* GG e resistência do probiótico em um modelo de digestão gastrointestinal in vitro. 2014 (Tese de doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CURDA, L.; PLOCKOVA, M. Impedance measurement of growth of lactic acid bacteria in dairy cultures with honey addition. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 7, p. 727-733, 1995.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Artmed, Porto Alegre, p. 900. 2010.

DAS A, DATTA S, MUKHERJEE S, BOSE S, GHOSH S, DHAR P. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. **LWT - Food Sci Technol** 61:244-250, 2015. doi:10.1016/j.lwt.2014.11.044.

DESAI AR, SHAH NP, POWELL IB. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. **J Dairy Sci**, 89 (9): 3345-3351, 2006.

DWIVEDI, S.; SAHRAWAT, K.; PUPPALA, N.; ORTIZ, R. Plant prebiotics and human health: biotechnology to breed prebiotic rich nutritious food crops. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, p.238-245, 2014. DOI: 10.1016/j.ejbt.2014.07.004.

ESTRUCH, F.. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**. **24**, 469-486, 2000.

FELIS GE, DELLAGLIO F, MIZZI L, TORRIANI S. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a gange in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. **Int J Evol Microbiol**; 51 (6): 2113-2117, 2001.

FIORDA, et al. Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. **Food Science and Technology International**, 22(8) 732–742, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424 p.

FRANKEL E.N.. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends Food Sci. Technol.**, 4, 220–225, 1993.

FRANKEL S, ROBINSON GE, BERENBAUM MR. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J Apic Res.*, **37**(1): 27-3, 1998.

FREIRE, V. A .P. **Viabilidade de culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. E *Bifidobacterium* spp. em iogurte adicionado de polpa e farinha do albedo de maracujá (*Passiflora edulis*).** 2012. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas – UFP, Pelotas, 2012.

FULLER R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F. K. H .S.; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Láticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, 2011.

GANCEL, F; DZIERSZINSKI, F; TAILLIEZ, R. Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*). *Journal of Applied Microbiology*. v.82, n.6, p.722-728, 1997.

GARCÍA-CAYUELA, T.; DÍEZ-MUNICIO, M.; HERRERO, M.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T.; MORENO, F.J. Selective fermentation of potential prebiotic lactose-derived oligosaccharides by probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.38, p.11-15, 2014. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.03.012.

GASCHLER ,MICHAEL M. STOCKWELL ,BRENT R.. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482 ; 419-425, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

GIBSON G.R., ROBERFROID M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, Bethesda, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p. 139-157, 1999.

GORJANOVIC, Z. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, 30, p. 13-18, 2013.



GRAFF, S. et al. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 54, p. 221-227, 2008.

GROTTO et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 1, 169-174, 2009.

GUERRA, André Fioravante; MELLINGER-SILVA, C.; ROSENTHAL, A.; Luchese, Rosa Helena. Holder pasteurization of human milk affects some bioactive proteins. **Journal of dairy science**, v.1, p.1 - , 2018.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants-*quo vadis?* **Trends in Pharmacology Sciences**, v. 32, p. 125-130, 2011.

HATEGKIMANA J, JG MA, Y LI. Effect of Chemical Composition of Honey on Cream Formation in Honey Lemon Tea. Karangwa, W. Tang and F. Zhong **Advance Journal of Food Science and Technology** 3(1): 16-22, 2011.

HENKER, et al., The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 166, n. 4, p. 311–318, 2007.

HILL, C., *et al.* (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 11: 506–514.

HOLZAPFEL WH, HABERER P, GEISEN R, BJÖRKROTH J, SCHILLINGER U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr.**; 73 (2) Suppl: 365S-373S, 2001.

JUVEN B.J., PEARSON, M.D. Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. **Journal of Food Protection**, Vol. 59, No. 11, p. 1233-1241, 1996.

KLAENHAMMER, T.R., BARRANGOU, R., BUCK, B.L., AZCARATE & PERIL, M.A., ALTERMANN, E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, p. 393-409, 2005.

KÜHLE, A. van der Aa; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Turin, v. 101, p. 29-39, 2005.

KUMAR, B. V., VIJAYENDRA, S. V. N. and REDDY, O. V. S. Trends in dairy and nondairy probiotic products: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6112-6124, 2015.

LEE, B. et al. Attenuation of Colitis by *Lactobacillus casei* BL23 Is Dependent on the Dairy Delivery Matrix. V: 81 Number 18. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015.

LEJA, M.; MARECKEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 237-240, 2007.

LEE, Y. K. Handbook of probiotics. New York: Wiley, 1999.

LILLY D.M, STILLWELL R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**.147, p.747-748, 1965.

LINDMARK-MANSSON H. , B. AKESSON. Antioxidative factors in milk. **British Journal of Nutrition**, 84, Suppl. 1, p. 103 a 110, 2000.

LIONG, M. T. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemic and perimenopausal treatments. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 7, p. 16-328, 2007.

LOPES T. R; PINTO, M. A. O. Aplicação terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em diarreias: uma revisão. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 36, n. 2, p. 107-122, abr./jun, 2010.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1/2, p. 11-17, 2001.

LUCHESE, R.H. Microbial interactions in the gut: the role of bioactive components in milk and honey. **Probiotics**.v.2, p. 400-416, 2012.

LUSHCHAK, V. I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. **Acta Biochimica Polonica**, 2006.

MACEDO, L.N.; LUCHESE, R.H.; GUERRA, A.F.; BARBOSA, C.G. Efeito prebiótico 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, 2008.

MARTÍN R, SUÁREZ J E. Biosynthesis and Degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Vaginal Lactobacilli. **Applied and environmental microbiology**, Vol. 76, No. 2 p. 400–405, 2010.

MARTY-TEYSSET, C., DE LA TORRE, F., & GAREL, J. -R. Increased production of hydrogen peroxidase by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* upon aeration: Involvement of na NADH oxidase in stress. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 262-267, 2000.

MAURYA, D. K., DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food and Chemical Toxicology**, 48 , 3369–3373, 2010.

MEARIN, FERMÍN; GUARNER, FRANCISCO; VERDÚ, ELENA. Probióticos y aparato digestivo. Evidencias actuales. XII REUNION NACIONAL DE LA ASOCIACION ESPANOLA DE GASTROENTEROLOGIA. **Gastroenterol Hepatol**, v. 32, n. 1, p. 1-14, 2009.

MILLS, S. et al.. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 6, p. 377–401, 2011.

MOLAN P.C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* ; v. **73**, n.1: 5-28, 1992.

MONIRUZZAMAN, M.; KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: A review. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 9, p. 36-42, 2012.

MOLINA SPATH, N. C. **Avaliação de compostos bioativos em amostras de méis de *Melipona scutellaris*** .2013.72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Universidade Federal da Bahia- UFB, Salvador, 2013.

NELSON, S. K. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 2, p. 341–347, 2006.

OLIVEIRA D., VIDAL L. , ARES G., WALTER EDUARDO H.M., ROSENTHAL A. , DELIZA R.. Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. *LWT - Food Science and Technology*, v. 79, p. 234-241, 2017.

OLIVEIRA, G.S. **Modulação da Microbiota Colônica e Sanidade de Lactentes: Fatores Prébióticos de Leite e de Virulência de microrganismos**. 2011, 122p. Tese (Doutorado) – Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

O'MAHONY, . A.; FOX, P. F. Chapter 2 - Milk: An Overview, in **Milk Proteins**(Second edition), Eds. San Diego: Academic Press, p. 19–73, 2014.

OSAWA, C. C.; DE FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655–663, 2005.

PEREIRA, L. L. **Análise físico-químicos de amostras de méis de *Apis mellifera* meliponíneos**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestre em Entomologia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade São Paulo, Piracicaba, 2010.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. . Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PIMENTEL, T. C., MADRONA, G. S., GARCIA, S., & PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 415–422, 2015.

- PRISCO, A., & MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, 48, 27–39, 2016.
- PROCHÁZKOVÁ, D. , BOUŠOVÁ, I. , WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia** 82, 513–523, 2011.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALEDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.
- PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 893-902, 2009.
- RAIZEL R.; SANTINI E.; KOPPER A. M.; FILHO A. D.R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- REDDY G., ALTA F M., NAVEENA B.J., VENKATESHWAR M., KUMAR E.V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation: a review. **Biotechnol Adv.** v.26, n.1, p. 22-34, 2008.
- REID G. Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. **International Dairy Journal**, v. 18(10-11), p. 969-975, 2008.
- Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada: 2002. April, May. Guidelines for evaluation of probiotics in food.
- RIBEIRO, M.C. O.. **Caracterização do *Pediococcus acidilactici* B14 quanto às propriedades probióticas e sua associação com *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 com aplicação em sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica.** Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- RIVAL, SANDRINE G.; BOERIU, CARMEN G.; WICHERS, HARRY J. Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxygenase Inhibition. **J. Agric. Food Chem.**; 49, 295-302, 2001.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARO, U. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, p.1-11, 2010.
- SAAD, S.M.I; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011.
- SCHREZENMEIR J, VRESE M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **Am J Clin Nutr**, 2001.

SHAH, N.P. Function cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p.1261-1277, 2007.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHAMALA, T.R.; SHRI JYOTHI, S; SAIBABA, P. Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo condition. *Letter in Applied Microbiology*, v. 30., p.453-455, 2000.

SHEIL, B.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, L. Probiotic effects on inflammatory bowel disease. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 819-824, 2007.

SILVA, J.C., RODRIGUES S, FEÁS X, ESTEVINHO LM. Antimicrobial activity , phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food Chem Toxicol**, v. 50, p. 1790-1795, 2012. doi:10.1016/j.fct.2012.02.097

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A.; ANTUNES, A.J. Soro de leite bovino em sorvete. *Alimentos e Nutrição*, v.15, p.187-196, 2004.

SILVA, R.A. et al. Composição e propriedades terapêuticas do Mel de Abelha. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 17, n. 1, p. 113-20, jan./mar., 2006.

SILVA, R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, p. 36–43, 2015.

SIMEONI et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **REGET**, v. 18. Ed. Especial Mai., p. 66-75, 2014.  
<http://dx.doi.org/10.5902/2236117013020>

SINGH, K.; HERTZBERGER R. Y.; KNAUS, U. G. Hydrogen peroxide production by lactobacilli promotes epithelial restitution during colitis. **Redox Biology**, v. 16, p.11–20, 2018.

SIVIERI, KATIA; BEDANI RAQUEL; DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI AND ELIZEU A. ROSSI. Probiotics and Intestinal Microbiota: Implications in Colon Cancer Prevention, 2013.

SWAN, T.M. E WATSON, K. . Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and threulose. **FEMS Microbiology Letters**, 169, 191-197, 1998.

STANTON, CATHERINE, FITZGERALD GERALD, PAUL ROSS R., DESMOND COLETTE, COAKLEY MAIREAD, COLLINS, J. KEVIN. Challenges Facing Development of Probiotic-Containing Functional Foods. **Handbook of Fermented Functional Foods**. p.27 – 58; mar, 2003.

STEELS E. L., LEARMONTH R. P, WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, 140, p. 569-576, 1994.

STĘPNIAK, J.; LEWIŃSKI, A.; KARBOWNIK-LEWIŃSKA, M. Membrane lipids and nuclear DNA are differently susceptible to Fenton reaction substrates in porcine thyroid. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 1, p. 71–78, fev. 2013.

STEVENS, MARC J. A. . Involvement of the Mannose Phosphotransferase System of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in Peroxide Stress Tolerance. **Applied and environmental microbiology**, p. 3748–3752 Vol. 76, No. 11, June, 2010 .doi:10.1128/AEM.00073-10

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K.. Metabolic and Biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal Dairy Sciences*, v. 86, p-2537-2546, 2003.

TAMINE, A.Y.; SAARELA, M.; SONDERGARD, A. K; MISTRY, V.V; SHAH, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: TAMINE, A., ed Probiotic dairy products. Oxford : Blackwell Publishing, 2005. Cap. 3, p.39-72.

TREVISAN, M., BROWNE R., RAM M., MUTI P., FREUDENHEIM J., CAROSELLA A. M., ARMSTRONG, D. .Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. *American Journal of Epidemiology*, Volume 154, Issue 4, 15 , p. s 348–356, 2001.

VALCHEVA, R., DIELEMAN, L.A., Prebiotics: Definition and protective mechanisms. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, p. 27-37, 2016.

VALDÉS-SILVERIO L. A, et al. Physicochemical parameters, chemical composition, antioxidant capacity, microbial contamination and antimicrobial activity of Eucalyptus honey from the Andean region of Ecuador. *Journal of Apicultural Research*, 2018.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1426349>

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44– 84, 2007.

VANDENPLAS, Y.; BRUNSER, O.; SZAJEWSKA, H. *Saccharomyces boulardii* in childhood. **European Journal of Pediatrics**, Heidelberg, v. 168, no. 3, p. 253-265, Mar. 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/f2193759467t0374/fulltext.pdf>>.

VARGA, L. Effect of acacia (*Robinia pseudo-acacia* L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 272-275, 2006.

VEDANA, M. I. S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. Curitiba, 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2008.

VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., PÉREZ-  
ÁLVAREZ J.A. **Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly.** *Journal of  
Food Science.* v. 73, n. 9, 2008.

WADA M, NAGATA S, SAITO M, SHIMIZU T, YAMASHIRO Y, MATSUKI T,  
ASAHARA T, NOMOTO K. Effects of the enteral administration of *Bifidobacterium breve*  
on patients undergoing chemotherapy for pediatric malignancies. **Supp Care Cancerv.** 18, p.  
751–759, 2010.

WASOWICZI E, et al.. Oxidation of lipids in food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 13/54, SI 1,  
pp. 87–100, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of health and nutritional  
properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria .**  
Córdoba; 2001.

XIAO J.Z., KONDO S, YANAGISAWA N, TAKAHASHI N, ODAMAKI T, IWABUCHI N  
*et al.* Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-  
controlled trial. **Clin Exp Allergy**; v. 36, p. 1425-1435, 2006.

YE, Z.-W. et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular  
differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - General Subjects, v. 1850, n. 8, p.  
1607–1621, 2014.

ZIEMER C.J., GIBSON G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in  
the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J.**, Amsterdam,  
v.8,p.473-479, 1998.