

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TESE

Lactobacillus casei CSL3: viabilidade em sorvete funcional e efeito em
modelo *in vivo* de imunossupressão induzida

Khadija Bezerra Massaut

Pelotas, 2023

KHADIJA BEZERRA MASSAUT

Lactocaseibacillus casei CSL3: viabilidade em sorvete funcional e efeito em modelo *in vivo* de imunossupressão induzida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Ângela Maria Fiorentini
Co-orientadores: Ângela Nunes Moreira
Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M414l Massaut, Khadija Bezerra

Lactocaseibacillus casei CSL3 : viabilidade em sorvete funcional e efeito em modelo *in vivo* de imunossupressão induzida / Khadija Bezerra Massaut ; Ângela Maria Fiorentini, orientadora ; Ângela Nunes Moreira, Wladimir Padilha da Silva, coorientadores. — Pelotas, 2023.

147 f.

Tese (Doutorado) — Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Bactéria ácido-láctica. 2. Estresse oxidativo. 3. Imunomodulação. 4. Modelo *in vivo*. 5. Probióticos. I. Fiorentini, Ângela Maria, orient. II. Moreira, Ângela Nunes, coorient. III. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. IV. Título.

CDD : 637.4

Banca examinadora:**Presidente:**

Dr^a. Ângela Maria Fiorentini – Departamento de Ciência e Tecnologia de
Alimentos/ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)
Doutorado em Ciência dos Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina
(UFSC)

Membros:

Dr^a. Graciela Völz Lopes – Doutorado em Ciências Veterinárias pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Dr^a. Isabela Schneid Kroning – Doutorado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)
Dr^a. Juliana de Lima Marques – Doutorado em Biotecnologia pela Universidade
Federal de Pelotas (UFPEL)
Dr^a. Simone Pieniz – Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível!”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar, proteger e me fazer resiliente.

À minha mãe Iria, por ser meu porto seguro, sendo colo, ouvidos e apoio incondicional em todas as minhas escolhas e, aos meus irmãos José Francisco, Ubirajara e Patrick, por estarem presentes quando precisei, tornando os momentos mais leves. Sem vocês nada teria sido possível, muito obrigada!

Às minhas tias Ires e Vera, pelo carinho e imensurável apoio nessa jornada e, aos meus sobrinhos Maria Clara e Theo, por serem minha fonte de inspiração, forças e alegrias.

À minha amada avó Maria Joaquina (*in memoriam*) que, mesmo sem sua presença física, sei que zela por mim e me inspira a ser uma pessoa melhor.

Aos meus orientadores profa. Ângela Maria Fiorentini, profa. Ângela Nunes Moreira e prof. Wladimir Padilha da Silva pelo apoio, aprendizados e amizade, mas, em especial à Ângela Fiorentini, pela parceria, paciência, dedicação, conselhos e, por acreditar em mim e no meu trabalho. Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos Vagner, Tiane, Clarissa, Alice e Yul, por me incentivarem e estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos.

Ao Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal (LPOA), por toda a estrutura e por ser minha segunda casa nesse período e, aos colegas pela parceria e ensinamentos compartilhados. Obrigada Alane, Caroline, Claudio, Elisa, Helena, Maria, Juliana, Pâmela, Paola, Patrícia, Pedro, Silvana e Vitória.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela estrutura e pelos ensinamentos, em especial aos professores Wladimir Padilha da Silva e Graciela Völz Lopes e, à técnica Andreia Saldanha de Lima, pela atenção e disponibilidade.

À equipe do Biotério Central da UFPel, por todo carinho, disponibilidade e auxílio durante o experimento *in vivo*, mas, em especial à Anelize de Oliveria Campelo Felix, pela parceria e amizade.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

MASSAUT, Khadija Bezerra. ***Lactocaseibacillus casei* CSL3: viabilidade em sorvete funcional e efeito em modelo *in vivo* de imunossupressão induzida** 2023, 147 p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2023.

As mudanças no perfil alimentar da população mundial, têm impulsionado indústrias de alimentos a desenvolverem novos produtos funcionais. A ingestão de probióticos é capaz de fornecer benefícios como modulação da microbiota intestinal e resposta imunológica e, regulação dos níveis de colesterol e índices glicêmicos, porém esses benefícios precisam ser avaliados para cada cepa, a fim de validar as propriedades probióticas. Alimentos probióticos, geralmente se restringem à leites fermentados e queijos, o que nem sempre satisfaz o consumidor, em especial uma parcela da população que apresenta restrição à lactose. Neste contexto, objetivou-se avaliar a viabilidade de *L. casei* CSL3 em sorvete funcional e sem lactose, durante o armazenamento, às condições do trato gastrointestinal (TGI) simulado e, a aceitabilidade do produto, bem como avaliar o efeito da administração de CSL3, quanto aos parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo, histológicos e imunológicos, em modelo *in vivo* de imunossupressão induzida. Também foi realizado um estudo sobre o consumo de sorvete nas regiões brasileiras, as preferências e intenções de compra dos consumidores, usando uma plataforma *online*. Para elaboração do sorvete, foi produzida uma infusão de gengibre e mel que foi suplementada com 10^{14} UFC.mL⁻¹ de CSL3, com armazenamento sob congelamento por 180 dias. Análises de viabilidade da bactéria foram realizadas durante o armazenamento e sob a passagem ao TGI simulado e, no produto as análises de composição proximal, compostos fenólicos, antioxidantes, cor, pH, fusão, densidade, *overrun* e análise sensorial. Para o estudo *in vivo*, 40 camundongos *Swiss* machos foram divididos em quatro grupos (Controle, *L. casei* CSL3, Ciclofosfamida, *L. casei* CSL3+Ciclofosfamida), onde dois grupos foram imunossuprimidos com 250 mg.kg⁻¹ de ciclofosfamida e dois grupos suplementados diariamente com 10^{10} UFC.mL⁻¹ de CSL3. Foram realizadas análises de hemograma, colesterol total, expressão gênica de IL-4, IL-23, TNF- α e NF- κ B, estresse oxidativo do rim, fígado e encéfalo, contagem de bactérias ácido-lácticas (BAL) resistentes à bile nas fezes e, histologia do fígado, rim e intestino. O sorvete foi uma matriz eficaz na manutenção da viabilidade do microrganismo, além de contribuir para a qualidade nutricional do produto, através da elevada atividade antioxidante apresentada, além do mais, obteve índice de aceitabilidade e intenção de compra superiores a 95%. Já, em relação ao estudo *in vivo*, foi observado que a suplementação foi segura, não apresentando mortalidade e alterações negativas na expressão de citocinas, os animais que receberam CSL3 não apresentaram redução do leucograma e lipidose hepática quando em comparação aos demais grupos e, apresentaram aumento de 1 log UFC.g⁻¹ na contagem das BAL nas fezes, além da redução nos níveis de colesterol total. Conclui-se que o sorvete é uma matriz eficaz na manutenção da viabilidade de *Lactocaseibacillus casei* CSL3, apresentando potencial probiótico e juntamente com os compostos bioativos pode ser considerado um alimento funcional, com elevado índice de aceitabilidade. No estudo *in vivo*, a suplementação além de segura no modelo

utilizado, influenciou no perfil lipídico dos animais, reduzindo o colesterol total e a lipidose hepática e, na resposta imunológica, através do aumento do leucograma e da expressão de citocinas, sugerindo seu potencial imunomodulador. Contudo, como os efeitos probióticos são cepa e dose dependentes, outros protocolos com diferentes dosagens, períodos de exposição e patologias devem ser estudados, a fim de melhor elucidar o potencial probiótico de *Lactocaseibacillus casei* CSL3.

Palavras-chave: bactéria ácido-láctica, estresse oxidativo, imunomodulação, modelo *in vivo*, probióticos, produtos lácteos, quimioterapia, trato gastrointestinal simulado.

ABSTRACT

MASSAUT, Khadija Bezerra. ***Lactocaseibacillus casei* CSL3: viability in functional ice cream and effect in an *in vivo* model of induced immunosuppression** 2023, 147 p. (Doctorate in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agro-industrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas-RS, 2023.

Changes in the food profile of the world's population have driven food production to develop new functional products. The intake of probiotics can provide benefits such as modulation of the intestinal microbiota and immune response and regulation of cholesterol levels and glycemic indexes. However, in each strain needs to analyze these benefits to validate your probiotic properties. Probiotic foods are generally restricted to fermented milk and cheese, which has only sometimes helped the consumer, especially a portion of the population restricted to lactose. In this context, the objective was to evaluate the viability of *L. casei* CSL3 in functional and lactose-free ice cream during storage, the conditions of the simulated gastrointestinal tract (GIT), and the acceptability of the product, as well as to evaluate the effect of administering CSL3, regarding biochemical, oxidative, histological and immunological stress parameters, in an *in vivo* model of induced immunosuppression. A study was also carried out on the consumption of ice cream in Brazilian regions and consumers' motivations and purchase intentions using an online platform. To make the ice cream, an infusion of ginger and honey was produced and supplemented with 10^{14} CFU.mL⁻¹ of CSL3, with storage under freezing for 180 days. Bacterial viability analyzes were carried out during storage and when passing through the simulated TGI and, in the product, analyses of proximal composition, phenolic compounds, antioxidants, color, pH, melting, density, overrun, and sensory analysis. For the *in vivo* study, 40 Swiss male mice were divided into four groups (Control, *L. casei* CSL3, Cyclophosphamide, *L. casei* CSL3+Cyclophosphamide), where two groups were immunosuppressed with 250 mg.kg⁻¹ of cyclophosphamide and two groups supplemented daily with 10^{10} CFU.mL⁻¹ of CSL3. Blood count, total cholesterol, IL-4, IL-23, TNF- α and NF- κ B gene expression, kidney, liver, and brain oxidative stress, resistant lactic acid bacteria (LAB) count were analyzed to bile in the stool and, histology of the liver, kidney, and intestine. The ice cream was an effective matrix in maintaining the microorganism's viability and contributing to the product's nutritional quality through the high antioxidant activity presented; moreover, it obtained an acceptability index and purchase intention greater than 95%. Concerning the *in vivo* study, it was observed that the supplementation was safe, not presenting mortality and negative alterations in the expression of cytokines; the animals that received CSL3 did not show a reduction in the leukogram and hepatic lipidosis when compared to the other groups and, an increase of 1 log CFU.g⁻¹ in the BAL count in the feces, in addition the reduction

in the levels of total cholesterol. It is concluded that ice cream is an effective matrix in maintaining the viability of *Lactocaseibacillus casei* CSL3, presenting probiotic potential and, together with bioactive compounds, can be considered a functional food with a high acceptability index. In the *in vivo* study, supplementation, in addition to being safe in the model used, influenced the lipid profile of the animals, assisting total cholesterol and hepatic lipidosis and, in the immune response, through the increase in leukogram and expression of cytokines, suggesting its immunomodulatory potential. However, as the probiotic effects are strain and dose-dependent, other protocols with different dosages, exposure periods, and pathologies should be observed better to elucidate the probiotic potential of *Lactocaseibacillus casei* CSL3.

Keywords: chemotherapy, dairy products, immunomodulation, *in vivo* model, lactic acid bacteria, simulated gastrointestinal tract, oxidative stress, probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Graphical abstract – study <i>online</i> of the consumer perception, preferences, and purchase intention towards ice cream in Brazilian regions	47
Figura 2. Characterization of participants in terms of age group (A), gender (B) and education level (C), by Brazilian regions for ice cream consumption (n = 3,339)	52
Figura 3. Types of reported food restrictions, related to consumption or not of ice cream, by Brazilian regions (n = 3,455)	54
Figura 4. Frequency (A) and time of year (B) of ice cream consumption, by Brazilian regions (n = 3,339)	55
Figura 5. Purchase intent for ice cream made for restrictive diets and/or with functional appeal, by Brazilian regions (n = 8,100)	62
Figura 6. Graphical abstract – study to develop and characterize a potentially functional lactose-free ice cream with ginger and honey and to evaluate the viability of the potentially probiotic <i>L. casei</i> CSL3 under storage conditions and the simulated gastrointestinal tract, as well as antioxidant activity and product acceptability	70
Figura 7. Percentage of sensory acceptance by attribute of lactose-free probiotic ice cream with ginger and honey.....	81
Figura 8. Graphical abstract – avaliação de parâmetros imunológicos, bioquímicos, oxidativos e histológicos de camundongos <i>Swiss</i> imunossuprimidos com ciclofosfamida e suplementados por 30 dias com <i>Lactobacillus casei</i> CSL3	91
Figura 9. Linha do tempo do modelo <i>in vivo</i> , camundongos <i>Swiss</i> machos suplementados com <i>Lactobacillus casei</i> CSL3 e imunossuprimidos com ciclofosfamida, no período de 31 dias	95
Figura 10. Viabilidade das bactérias ácido-láticas (BAL, A) e BAL resistentes à bile (BALRB, B) no conteúdo fecal dos animais comparando o mesmo tratamento, ao longo do período experimental (semanas)	99
Figura 11. Concentração de colesterol total no sangue de animais ao longo do período experimental, tratados com <i>L. casei</i> CSL3 e ciclofosfamida	103
Figura 12. Transcrição relativa de TNF- α (A), IL-4 (B), NF κ B (C) e IL-23 (D), em esplenócitos do baço que receberam estimulação <i>in vitro</i> de <i>L.</i>	

casei CSL3, para cada tratamento. Letras diferentes indicam uma diferença significativa por One-way ANOVA ($p < 0,05$) 104

Figura 13. Rim (A1), fígado (A2) e intestino (A3) do grupo controle; Rim (B1), fígado (B2) e intestino (B3) do grupo ciclofosfamida; Rim (C1), fígado (C2) e intestino (C3) do grupo *L. casei* CSL3; e Rim (D1), fígado (D2) e intestino grosso (D3) do grupo *L. casei* CSL3+ciclofosfamida. As amostras de rim e intestino grosso estão inalteradas em todos os grupos. No fígado, as alterações podem ser observadas em A2 e B2, onde o fígado apresenta sinais de inflamação, lipidose e congestão (aumento microscópico de 40x) 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preference of ice cream flavors by Brazilian regions in relation to the total citations (n = 8,448)	56
Tabela 2. Preference for adding fruit to ice cream by Brazilian regions in relation to the total number of mentions (n = 7,360)	57
Tabela 3. Main attributes mentioned in the word association test referring to 'thoughts about ice cream' by Brazilian regions (n = 7,202)	58
Tabela 4. Main categories and justifications mentioned by the participants when answering the question regarding the fact that "ice cream is healthy or not" by Brazilian regions (n = 3,333)	59
Tabela 5. Viability of <i>L. casei</i> CSL3 in probiotic lactose-free ice cream, with ginger and honey, under frozen storage (-18 °C) ¹	77
Tabela 6. Viability of <i>L. casei</i> CSL3 in probiotic lactose-free ice cream, with ginger and honey, in the simulated gastrointestinal tract ¹	78
Tabela 7. Proximal composition of probiotic lactose-free ice cream, with ginger and honey (ICLGH) ¹	78
Tabela 8. Antioxidant activity and total phenolic compounds of the infusion of ginger, ginger with honey and ICLGH*	79
Tabela 9. Viabilidade das bactérias ácido-lácticas (BAL) e bactérias ácido-lácticas resistentes à bile (BALRB) (log UFC.g ⁻¹) no conteúdo fecal dos animais, comparando os grupos durante o período experimental ...	98
Tabela 10. Valores do hemograma dos animais tratados com <i>L. casei</i> CSL3 e ciclofosfamida ao final do experimento	100
Tabela S1. <i>Primers</i> utilizados na avaliação da expressão gênica de IL-4, IL-23, TNF- α e NF κ β , extraídos de esplenócitos de camundongos	112
Tabela S2. Concentração de catalase renal de animais tratados com <i>L. casei</i> CSL3 e ciclofosfamida	113

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. HIPÓTESES	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. CAPÍTULO 1	21
Revisão bibliográfica	
4.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)	21
4.2 Probióticos	24
4.3 Probióticos e o sistema imunológico	26
4.4 Probióticos e quimioterápicos: Estudos <i>in vivo</i>	30
4.5 Probióticos em matriz alimentar	33
4.5.1 <i>Lactocaseibacillus casei</i> em matriz alimentar	36
4.6 Sorvete	37
4.7 Produtos sem lactose	40
4.8 Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	42
4.9 Mel	44
5. CAPÍTULO 2	46
Consumer perception, preferences and purchase intention towards ice cream in Brazilian regions	
5.1 Introduction	47
5.2 Material and Methods	49
5.3 Results	51
5.4 Discussion	62
5.5 Conclusion	68
6. CAPÍTULO 3	69

Potentially functional ice cream with *Lactocaseibacillus casei* CSL3, ginger and honey

6.1 Introduction	70
6.2 Material and Methods	73
6.3 Results	77
6.4 Discussion	81
6.5 Conclusion	89

7. CAPÍTULO 4 90

Administração de *Lactocaseibacillus casei* CSL3 em camundongos Swiss com imunossupressão induzida por ciclofosfamida: efeitos sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos, oxidativos e histológicos

7.1 Introdução	91
7.2 Material e Métodos	93
7.3 Resultados	98
7.4 Discussão	106
7.5 Conclusão	112
7.6 Material complementar	112

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 114

REFERÊNCIAS 116

APÊNDICES 144

Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) 144

ANEXOS 145

Anexo A – Ficha de análise sensorial 145

Anexo B – Aprovação do Comitê de ética em experimentação animal – CEEA 146

1 INTRODUÇÃO

A importância de uma adequada alimentação na promoção da saúde, remonta aos tempos de Hipócrates (377 a.C.), chamando a atenção para o alimento, com a conhecida citação: “*que teu alimento seja o teu remédio e que teu remédio seja o teu alimento*”. Com o passar dos anos, essa necessidade de buscar a prevenção e a manutenção da saúde com uma nutrição apropriada, tem sido cada vez mais confirmada pela ciência, trazendo assim, uma maior preocupação dos consumidores sobre quais os alimentos podem e devem ser ingeridos no seu dia a dia (BALTHAZAR *et al.*, 2017; GRANATO *et al.*, 2018; YAHFOUFI *et al.*, 2018).

A indústria de alimentos, aproveitando esta crescente demanda pelos consumidores em manter um estilo de vida saudável, tem produzido inúmeros produtos com alegação de propriedades funcionais, com o intuito de atender a demanda e preencher esse nicho de mercado em constante renovação e expansão (ASIOLI *et al.*, 2017; TERPOU *et al.*, 2019). Desta forma, a oferta de alimentos probióticos têm apresentado importante destaque, tendo em vista que, os probióticos são microrganismos capazes de conferir benefícios ao hospedeiro, quando consumidos regularmente e em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014).

Entretanto, para que produtos probióticos garantam benefícios à saúde como a modulação da microbiota intestinal, resistência contra microrganismos patogênicos e melhora da resposta imunológica, os probióticos devem estar viáveis e ser seguros para uso, podendo ser administrados sob diferentes meios, seja participando da fermentação ou, de forma suplementada no produto (HILL *et al.*, 2014; MARINELLI *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018).

As bactérias ácido-láticas (BAL) compõem uma grande variedade de alimentos probióticos, principalmente os lácteos, sendo as espécies mais frequentes, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*¹, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (DORON; SNYDMAN, 2015; INABA *et al.*, 2014; MACHADO; SOCCOL, 2015). Nesse contexto, *Lacticaseibacillus casei* (*L. casei*) CSL3, isolado de silagem de colostro bovino, tem demonstrado resultados promissores como microrganismo potencialmente probiótico, através de testes *in vitro*

¹O gênero *Lactobacillus*, foi reclassificado segundo sua taxonomia em 25 novos gêneros (ZHENG *et al.*, 2020).

(VITOLA *et al.*, 2018) e *in situ* em manteiga (BELINAZO *et al.*, 2019), queijo *Petit suisse* (VITOLA *et al.*, 2020) e iogurte (AMES *et al.*, 2021), sendo considerado tecnologicamente adequado para adicionar em outras matrizes alimentares.

Porém, para a elaboração de um produto probiótico inúmeros fatores devem ser levados em consideração, que poderão influenciar diretamente na viabilidade do microrganismo tais como: a composição e características da matriz alimentar (pH, acidez, atividade de água, oxigênio molecular, presença de sal, açúcar e produtos químicos), as características do processamento (tratamento térmico, temperatura de incubação, temperatura de resfriamento, escala de produção e armazenamento) e, a distribuição do alimento no mercado, além disso, as características microbiológicas das cepas utilizadas, a proporção de inoculação bem como, o período de vida útil do produto são fundamentais para determinar que o microrganismo permaneça viável e funcional ao ser ingerido pelo consumidor (RANADHEERA *et al.*, 2010; TRIPATHI; GIRI, 2014; MAJID *et al.*, 2018).

Outro fator de suma relevância na escolha do microrganismo, é observar suas características quanto à tolerância ao pH ácido do trato gástrico, aos sais biliares e às enzimas digestivas, ter capacidade de aderência à superfície da mucosa epitelial e persistência no trato gastrointestinal (TGI) (MITROPOULOU *et al.*, 2013). Enfrentando os obstáculos impostos pelo TGI e colonizando a mucosa intestinal, espera-se que o microrganismo exerça os benefícios no hospedeiro, desta forma, há um consenso de que a dose mínima necessária para que um microrganismo seja considerado probiótico é de 6 log UFC.g⁻¹ do alimento (HILL *et al.*, 2014; PAPADOPOULOU *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019). Logo, deve-se levar em consideração tanto as características da matriz alimentar quanto as características da cepa escolhida.

Alguns estudos demonstram que o sorvete é uma matriz alimentar adequada para a adição de bactérias probióticas, em virtude de sua composição e do pH próximo à neutralidade, assim como, por ser um produto cujo armazenamento ocorre sob temperatura de congelamento, fatores estes que beneficiam diretamente na viabilidade e estabilidade dos microrganismos (CRUZ

et al., 2009; PANDIYAN *et al.*, 2012; VALERIO *et al.*, 2014; CRUXEN *et al.*, 2017; FARIAS *et al.*, 2019).

Da mesma forma, por apresentar uma massa base que permite a substituição de ingredientes – como lácteos sem lactose e outras fontes de carboidratos como mel, xilitol e estévia por exemplo, bem como, a adição de inúmeros componentes, como os microrganismos probióticos, prebióticos, frutas e compostos antioxidantes, por exemplo, sua formulação permite que o produto possa facilmente ser transformado em alimento funcional, desde que atenda as especificações dos órgãos regulatórios (LAMOUNIER *et al.*, 2012; PALMIERI *et al.*, 2013; OKKELS *et al.*, 2016).

Os mecanismos de ação dos probióticos ainda não foram totalmente elucidados, contudo, estudos *in vivo* destacam a capacidade de alguns microrganismos em promover a redução dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico, por estarem associados a uma melhora na função imunológica e, também, à redução dos índices de peroxidação lipídica (ARAGÓN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014; MARINELLI *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2022). Do mesmo modo, evidências de que a administração de probióticos é capaz de promover a regulação da homeostase intestinal através da liberação de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta, etanol, ácidos orgânicos, diacetil, acetaldeídos, peróxido de hidrogênio e peptídeos (bacteriocinas) já foram relatadas na literatura (KAREEM *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2021; KARAFFOVÁ *et al.*, 2021; TOUKAM *et al.*, 2021; KANG *et al.*, 2022).

Além disso, foi evidenciado que os probióticos também são capazes de aumentar a adesão das células intestinais, a produção de mucina e, a modulação da atividade do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), podendo ainda interagir no eixo intestino-cérebro e desempenhar um expressivo papel no comportamento do hospedeiro (PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019).

Segundo Maasen *et al.* (2000), dentre os microrganismos do gênero *Lactobacillus* avaliados sob seu potencial probiótico, *Lactobacillus casei* apresentou melhor resposta imunomoduladora, demonstrando que a síntese de citocinas pela mucosa intestinal é cepa dependente, corroborando com o observado por Perdígón *et al.* (1999), que verificaram que cepas de

Lacticaseibacillus casei e *Lactiplantibacillus plantarum* interagiram positivamente com as células M das placas de Peyer, estimulando uma imunidade secretória específica. Ainda, segundo Di Cerbo *et al.* (2016), microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, podem atuar como potenciais adjuvantes na resposta imunológica sistêmica, através da indução de produção de Interferon- γ (INF- γ), expressão de citocinas e aumento da citotoxicidade das células *natural killer* (NF).

Contudo, ainda não existem dados com relação ao comportamento de *L. casei* CSL3 sobre o perfil bioquímico, imunológico de estresse oxidativo e histopatológico de animais saudáveis e com imunossupressão induzida pelo tratamento quimioterápico.

A Tese está estruturada em quatro capítulos: No Capítulo 1, revisão bibliográfica, encontra-se a abordagem sobre bactérias ácido-láticas, microrganismos probióticos, sua relação com o sistema imunológico, com estudos *in vivo* associados ao uso de quimioterápicos e, suas aplicações tecnológicas, principalmente do gênero *Lacticaseibacillus*; ainda, são apresentadas informações acerca da produção e consumo de sorvete, produção de produtos sem lactose, além de características a respeito do gengibre e mel.

No Capítulo 2, é apresentado um estudo *online* sobre o consumo de sorvete nas regiões brasileiras, através da percepção dos consumidores, suas preferências e intenções de compra. Na sequência, no Capítulo 3, é abordado o estudo envolvendo a produção de um sorvete sem lactose potencialmente probiótico de gengibre e mel; a manutenção da viabilidade de *Lacticaseibacillus casei* CSL3 durante o armazenamento do produto e passagem pelo trânsito gastrointestinal simulado; as características físico-químicas, antioxidantes e aceitabilidade do produto. E por fim, no capítulo 4, é apresentado o estudo sobre a influência de *Lacticaseibacillus casei* CSL3 no sistema imunológico de animais saudáveis e imunossuprimidos com ciclofosfamida, avaliando a colonização do trato gastrointestinal, expressão relativa de citocinas pró-inflamatórias, histopatologia, parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo.

2 HIPÓTESES

Hipótese 1: *Lactocaseibacillus casei* CSL3 é capaz de manter a viabilidade, quando aplicado em matriz alimentar como sorvete, durante o período de armazenamento e na simulação ao trato gastrointestinal (TGI).

Hipótese 2: A administração de *L. casei* CSL3, possibilitará melhorar os parâmetros imunológicos, bioquímicos, histológicos e de estresse oxidativo em camundongos imunossuprimidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade de *L. casei* CSL3 em sorvete, durante o armazenamento e, às condições do TGI simulado e a aceitabilidade do produto, avaliar as preferências de consumo de sorvete nas regiões brasileiras, bem como avaliar o efeito da administração de *L. casei* CSL3 *in vivo*, quanto aos parâmetros imunológicos, histológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo, em um modelo de imunossupressão induzida.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as preferências de consumo de sorvete nas regiões brasileiras e identificar a percepção e a intenção de compra de produtos direcionados à pessoas com restrição alimentar e com uma abordagem funcional e de saúde, por meio de pesquisa *online*.
- Caracterizar o sorvete sem lactose com gengibre e mel, suplementado com *L. casei* CSL3, quanto aos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e tecnológicos, bem como avaliar a aceitabilidade do produto;
- Avaliar a manutenção da viabilidade de *L. casei* CSL3, durante o período de armazenamento do produto e às condições do TGI simulado;
- Avaliar os efeitos da administração por gavagem do probiótico *L. casei* CSL3 em camundongos *Swiss* saudáveis e imunossuprimidos com ciclofosfamida sobre os parâmetros imunológicos, histológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

4.1 Bactérias ácido-láticas

Bactérias ácido-láticas (BAL), podem se apresentar na forma de cocos ou bacilos e constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, catalase negativa, não formadores de esporos, que possuem características metabólicas, morfológicas e fisiológicas em comum e, cujas condições de desenvolvimento em meios com baixas concentrações de oxigênio e pH (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007; FUGELSANG; EDWARDS, 2007; FERNANDES *et al.*, 2013).

Compõem o grupo das BAL, principalmente, os gêneros *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (MOGENSEN *et al.*, 2003; MOHANIA *et al.*, 2008). Recentemente, com a reclassificação do gênero *Lactobacillus*, novos gêneros tiveram a nomenclatura alterada, totalizando 25 gêneros (ZHENG *et al.*, 2020). Apresentam-se amplamente distribuídas no ambiente, como solo, água, esgoto e silagem, e compõem parte da microbiota da boca, mucosa do intestino e do trato geniturinário, bem como da epiderme do homem e dos animais, podendo influenciar benéficamente estes ecossistemas (NASCIMENTO *et al.*, 2008; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). Muitas espécies de BAL, estão presentes naturalmente, em alimentos ou são adicionadas intencionalmente, sendo consideradas seguras para ingestão humana (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) (KORCZ; KERÉNYI; VARGA, 2018).

Em virtude da ampla gama de cepas utilizadas na elaboração de produtos fermentados (bebidas, derivados lácteos, cárneos, vegetais e de panificação), diversos autores relatam a importância da sua utilização na tecnologia de alimentos; entretanto, possuem também a capacidade de atuar na bioconservação, através da produção de substâncias antimicrobianas, oriundas do seu metabolismo como o ácido láctico e bacteriocinas (ROSS *et al.*, 2002;

GARCIA *et al.*, 2004; KYUNGWHA; AZLIN, 2007) e, de favorecer as características sensoriais, através da formação de compostos do *flavor*, em virtude da presença de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, como também, influenciam na textura, principalmente de leites fermentados, por secretarem exopolissacarídeos (SAAD *et al.*, 2011; BONOMO *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2012).

Outro ponto a ser considerado, é a recorrente utilização de BAL na realização de ensaios clínicos e biológicos, visando prospectar os benefícios probióticos ocasionados pela ingestão destes microrganismos, através do consumo de alimentos e/ou por suplementação. Inúmeros estudos evidenciaram que a adição de BAL na dieta, têm sinalizado impactos positivos em relação à modulação do sistema imune (YAZDI *et al.*, 2012; YAZDI *et al.*, 2013; VIAUD *et al.*, 2013; ARAGÓN *et al.*, 2014), redução do aparecimento e da intensidade de efeitos colaterais em modelos de neoplasia induzida (SUBBARAMAIAH *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012; NÚÑEZ *et al.*, 2014; LENOIR *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2021) e proteção contra o estresse oxidativo (OU *et al.*, 2012; AMARETTI *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2014; BAMPI *et al.*, 2015), dentre outras, evidenciando os benefícios a curto e longo prazo da utilização destes microrganismos em terapias probióticas (MIZOCK, 2015; MARINELLI *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2021).

Lactobacillus é o gênero de maior diversificação entre as BAL, e apresenta uma vasta aplicação em alimentos e utilização clínica (AYENI *et al.*, 2011; COUSIN *et al.*, 2015; WUYTS *et al.*, 2017). Encontram-se compondo a microbiota no trato gastrointestinal de homens e animais, no entanto, fatores ambientais como: pH, disponibilidade de oxigênio, oferta de substrato, presença de secreções e interações bacterianas podem influenciar seu desempenho e multiplicação, interferindo nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos (HAMMES; HERTEL, 2006; RAIZEL *et al.*, 2011).

A partir da análise da taxonomia, filogenia genômica, critérios fisiológicos e ecológicos dos representantes da família *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*, foi proposta uma reclassificação do gênero *Lactobacillus* e dentre as espécies destaca-se *Lactobacillus casei*, agora denominado *Lacticaseibacillus casei* (*L. casei*) (ZHENG *et al.*, 2020), microrganismo este, já

isolado de inúmeras fontes como silagem de aveia, conservas vegetais, licor de milho, fezes de crianças e vias aéreas superiores (nasofaringe) (WUYTS *et al.*, 2017) e silagem de colostro bovino (VITOLA *et al.*, 2018)

Estudos com isolados de *L. casei*, têm sugerido que além de seguro, a administração do microrganismo pode proporcionar efeitos probióticos em modelos clínicos, biológicos e *in vitro* (JONES, 2017; VITOLA *et al.*, 2018).

Wu *et al.* (2021) isolaram *L. casei* T1 de Kurut e observaram a inibição do crescimento de *Helicobacter pylori*, aliviando os sintomas inflamatórios e prevenindo alterações gástricas causadas pela infecção com a bactéria. Já Xu *et al.* (2021), em estudo para análise de efeito antitumoral no cólon de camundongos, utilizaram *L. casei* JY, isolado de talos frescos de milho, irradiado por feixes de $^{12}\text{C}^{6+}$, produzindo um isolado mutante, denominado *L. casei* JY300-8, que foi capaz de promover a modulação da disbiose induzida pelo câncer, uma taxa de sobrevivência de 90% dos animais e, efeito inibitório de 83,5% frente ao tumor no estágio inicial, demonstrando seu efeito promissor na modulação da microbiota intestinal.

Zhao *et al.* (2014), utilizaram soro de leite fermentado por *L. casei* isolado de Koumiss em camundongos com doença hepática alcoólica induzida, observando efeito protetor nos animais através do aumento da atividade antioxidante, redução das alterações histopatológicas e das enzimas hepáticas.

Por outro lado, *L. casei* MYSRD 108, foi isolado de Vellappam por Divyashree *et al.* (2021), e demonstrou inibição frente a diversos patógenos, com destaque para *Salmonella* Paratyphi através da produção de ácidos orgânicos, indicando seu potencial como conservante antimicrobiano na indústria de alimentos. Já Das; Khowala; Biswas (2016), encontraram três isolados de *L. casei* (SB71, SB73 e SB93) em amostras marinhas na costa da Índia e verificaram que todos os isolados foram capazes de produzir bacteriocinas, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Vibrio cholerae*, alta assimilação de colesterol e, de aderência às células Caco-2.

O isolado *L. casei* CSL3, proveniente de silagem de colostro bovino, foi identificado e caracterizado por Vitola *et al.* (2018), apresentando ausência de enzimas DNase, gelatinase e atividade hemolítica, sensibilidade a antibióticos, resistência à passagem pelo TGI, ação antimicrobiana frente aos

microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurim e *Escherichia coli*, e, capacidade de produzir exopolissacarídeos, de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade, demonstrando que o isolado apresenta elevado potencial probiótico e tecnológico.

4.2 Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas conferem efeitos benéficos, através do equilíbrio intestinal, sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014).

Entretanto, para que sejam considerados probióticos, tais microrganismos (bactérias e leveduras) devem ser capazes de sobreviver às condições adversas provenientes da passagem pelo TGI (como pH adverso, presença de sais biliares e enzimas, por exemplo), permanecendo em concentrações $\geq 6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ ou mL^{-1} ao final do processo, na região intestinal (MADUREIRA *et al.*, 2011; EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2015) embora, segundo Sanders *et al.* (2018), o efeito clínico ocasionado pelo microrganismo possa estar associado não somente à sua concentração mas, também, à sua expressão gênica e propriedades tecnológicas.

Dentre os probióticos usados com maior frequência – tanto em humanos quanto em animais –, encontram-se algumas espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo *Lactobacillus*, amplamente explorados em estudos experimentais (COSTA; VARAVALLO, 2011; REIS *et al.*, 2012; CARREIRO *et al.*, 2013; SALVA *et al.*, 2014; MENG *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2021).

Estudos referentes a probióticos tem sinalizado inúmeros benefícios de sua utilização em populações saudáveis ou não, uma vez que podem desempenhar papel expressivo na modulação do sistema imunológico e tratamento à alergias, reduzir a incidência e duração de patologias digestivas e intestinais e, intervir de maneira positiva nas funções metabólicas como diabetes e hipercolesterolemia, tornando-se assim uma ferramenta importante na prevenção de inúmeras enfermidades (SALVA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014;

MARINELLI *et al.*, 2017; GRANATO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021).

Quanto aos benefícios ao hospedeiro, tem sido conferido três mecanismos de ação dos probióticos. O primeiro, é a redução da quantidade de células viáveis de microrganismos patogênicos, através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, da competição por nutrientes e por sítios de adesão nas células intestinais. O segundo, consiste na alteração do metabolismo microbiano, por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. E o terceiro, se caracteriza pelo estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e/ou da atividade dos macrófagos (MIZOCK, 2015; MARINELLI *et al.*, 2017). Sendo assim, algumas cepas, promoveriam não só a regulação da microbiota, como também, seriam capazes de modular o sistema imune do hospedeiro, agindo de forma direta no desenvolvimento e regulação da imunidade local e sistêmica (CARREIRO *et al.*, 2013; SALVA *et al.*, 2014; CALAÇA, *et al.*, 2017; BEDADA *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021).

Microrganismos probióticos e patogênicos competem constantemente por sítios de adesão e substratos no intestino, em virtude disso, uma microbiota saudável poderia impedir o desenvolvimento de patógenos (MARINELLI *et al.*, 2017). Além da competição antimicrobiana, destacam-se outros benefícios como antagonismo à patógenos, estímulo à imunidade, ação anti-carcinogênica, produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias e redução das pró-inflamatórias (CARREIRO *et al.*, 2013; SALVA *et al.*, 2014; MARINELLI *et al.*, 2017; VERÓN *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018).

Porém, é necessário considerar ainda, que nem todas as cepas probióticas que possuem eficácia comprovada, são consideradas adequadas para todas as aplicações, sendo necessário o conhecimento dos mecanismos moleculares e, potenciais efeitos colaterais dos microrganismos nos diferentes modelos patológicos (BADARÓ *et al.*, 2008; MARINELLI *et al.*, 2017).

4.3 Probióticos e o sistema imunológico

O sistema imunológico é constituído por um complexo conjunto de órgãos, células e moléculas (citocinas e quimiocinas), responsáveis pelos inúmeros mecanismos de defesa utilizados contra agentes tóxicos e/ou infecciosos (FURMAN; DAVIS, 2015; GUYTON; HALL, 2017).

Neste contexto, podem ser desencadeados dois tipos de resposta imune, a inata e a adaptativa. A resposta imune inata, representa uma resposta precoce, uma vez que visa reconhecer e eliminar microrganismos invasores e, envolve células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, células *natural killer* (NK) e dendríticas (CHAPLIN, 2010; KOENDERMAN; BUURMAN; DAHA, 2014). Enquanto isso, a imunidade adaptativa por meio de duas vias, a imunidade celular (linfócitos T) e a imunidade humoral (linfócitos B), apresenta uma resposta imunológica específica a um determinado antígeno, num retorno mais lento, através de um componente de memória, quando as células apresentadoras de antígeno (células dendríticas) estimulam os linfócitos T (HAAN; ARENS; ZELM, 2014; MARSHALL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021).

Cerca de 20% das células intestinais são representadas por linfócitos e, 70% do sistema linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT) está situado no intestino, sendo representado por componentes como linfócitos intraepiteliais, linfócitos T, células M, células apresentadoras de antígeno e fagócitos (CARREIRO, 2013; PETERSON; ARTIS, 2014; SALVO-ROMERO *et al.*, 2015). Contudo, a microbiota intestinal possui ainda, microrganismos comensais intimamente envolvidos no reforço das linhas de defesa, através de mecanismos como a exclusão imunológica, a regulação e a eliminação de caráter imune (MAJAMAA; ISOLAURI, 1997; COSTA; VARAVALLO, 2011).

Tem sido associados aos microrganismos probióticos, três possíveis mecanismos de ação, que seriam: 1) redução da quantidade de células patogênicas viáveis, pela produção de compostos com atividade antimicrobiana, da competição por nutrientes e/ou da competição por sítios de adesão; 2) alteração do metabolismo microbiano, por meio da regulação da atividade enzimática; e 3) estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e/ou da atividade dos macrófagos (SAAD *et al.*, 2011; AMARETTI *et al.*, 2013).

Sendo assim, algumas cepas, poderiam estar envolvidas não só com a regulação da microbiota, mas ainda, seriam capazes de modular o sistema imune do hospedeiro, agindo de forma direta no desenvolvimento e regulação da imunidade local e sistêmica (LOLLO *et al.*, 2012; CARREIRO, 2013; SALVA *et al.*, 2014; GENEROSO *et al.*, 2015).

Outrossim, é importante ressaltar que o manejo indiscriminado de antibioticoterapia, além de induzir quadros de multirresistência microbiana, pode, também, desencadear alterações na microbiota. Da mesma forma, doenças metabólicas, estresse, uso contínuo de medicamentos e uma alimentação desbalanceada, também podem instaurar a disbiose, fatores estes, que podem influenciar na ação dos microrganismos probióticos, o que reforça a importância de se estabelecer a homeostase da microbiota intestinal por meio da ingestão destes microrganismo, para a promoção da modulação das funções imunológicas, fisiológicas e metabólicas do hospedeiro (DINIZ *et al.*, 2003; WEISS; HENNET, 2017).

Ademais, estudos indicam que as citocinas, proteínas de baixo peso molecular produzidas e secretadas pelas células do sistema imune e por outras células do organismo, que atuam no desenvolvimento da resposta imunológica (BOULAY *et al.*, 2003; SPANGLER *et al.*, 2015; COOK *et al.*, 2018), podem ser influenciadas pela presença de probióticos, através do estímulo ou repressão de sua secreção, sendo então os probióticos, classificados com ação imunoestimuladora ou imunorreguladora (KEMGANG *et al.*, 2014).

O consumo regular de probióticos, pode apresentar efeito estimulante sob o sistema imunológico, por meio do aumento da atividade fagocítica dos macrófagos e pela capacidade de interação com as placas de Peyer e as células intestinais, incitando os linfócitos B produtores de IgA e a migração dos linfócitos T do intestino (CROSS, 2002; WANG *et al.*, 2020).

A produção das citocinas envolve principalmente subconjuntos de linfócitos T, sendo classificadas em citocinas Th1 (TNF, INF γ , IL-12, IL-2, por exemplo), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) e, reguladoras (IL-10, TGF- β). E, via de regra, sua atuação depende do agente agressor e da sua localização (intra ou extracelular), o que inicialmente envolve componentes da resposta inata, como

células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e células NK, que serão recrutadas para o local da infecção através da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-23 e TNF- α , por exemplo) para, posteriormente, iniciar a atuação da resposta adaptativa (KEMGANG *et al.*, 2014; FURMAN; DAVIS, 2015; MARSHALL *et al.*, 2018).

A interleucina 4 (IL-4), é sintetizada principalmente pelos linfócitos Th2, além de mastócitos, eosinófilos e basófilos, sendo uma das citocinas responsáveis pela síntese de anticorpos (IgE e IgG) e pela ativação da resposta humoral (PAUL; ZHU, 2010), atuando como um potente regulador da imunidade (GADANI *et al.*, 2013). As células Th2 estimulam a imunidade independente de fagócitos e, a IL-4, possui a capacidade de inibir a proliferação de macrófagos e, de suprimir a imunidade mediada pela Th1, logo, quando há um equilíbrio entre a ativação das células Th1 e Th2, podemos determinar a resposta imune mediada por células (SEDER, *et al.*, 1994).

Já a interleucina 23 (IL-23), é uma citocina pró-inflamatória, que pertence à família das IL-12, cuja produção ocorre a partir de diferentes células imunes, como as células dendríticas e macrófagos, por exemplo (LIU *et al.*, 2019; MARKS *et al.*, 2019), ela possui a capacidade de influenciar no processo de diferenciação das células Th17, atuando no processo de estabilização da proliferação celular e, na manutenção de diferenciação dessas células (MARKS *et al.*, 2019). Logo, está associada com a regulação dos sinais tanto da imunidade inata, quanto da adquirida, durante a homeostase tecidual e de inúmeros distúrbios (NEURATH, 2019).

O Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), possui a capacidade de regular a expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B e de genes que codificam proteínas de perfil pró-inflamatório (SEN; BALTIMORE, 1986; TAKEDA; AKIRA, 2004). Sua ativação, se dá por diversos estímulos como TNF- α , IL-1, lipopolissacarídeos (LPS), fatores de crescimento e indutores de estresse (MERIKA *et al.*, 1998) e, a ativação de sua transcrição, pode auxiliar na resposta inflamatória, na eliminação do agente infeccioso e, no reparo tecidual (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Além disso, a regulação da produção de radicais livres também é mediada pela ativação do NF- $\kappa\beta$ logo, agentes que causam estresse

oxidativo, são capazes de induzir sua atividade (D'ACQUISTO *et al.*, 2002; LEVIN; DJURDJEV, 2012; WADA; MAKINO, 2013).

Capaz de promover a proliferação de diversas células e de sinalizar a apoptose, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é considerado um dos mediadores pró-inflamatórias mais potentes, desempenhando um importante papel na resposta inflamatória e na imunidade, estando envolvido principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais da inflamação (NAKAMURA *et al.*, 1997; MOSER; MURPHY, 2000; XIAOJING, 2001). Com ação similar à da IL-12, é sintetizado principalmente por macrófagos embora, a estimulação com LPS desencadeie sua síntese por monócitos, neutrófilos, células T e NK (TRACEY; CERAMI, 1993; VINCENZI *et al.*, 2021). Segundo Vincenzi *et al.* (2021), a inibição ou a indução da expressão de TNF- α mediada por probióticos, pode fornecer respectivamente, efeitos imunossupressores ou imunoestimulantes no organismo.

Neste contexto, sobre o potencial de modulação de probióticos na resposta imunológica durante o tratamento antineoplásico, Marinelli *et al.* (2017) relataram que uma microbiota em equilíbrio homeostático, é capaz de modular beneficemente à resposta imune em diferentes protocolos de tratamento antineoplásico, indicando que a adição de microrganismos probióticos auxiliariam de forma positiva, tornando-se um adjuvante ao tratamento.

Meng *et al.* (2019), ao analisarem a ação de *Lactiplantibacillus plantarum* KLDS1.0318 na melhora dos efeitos deletérios da quimioterapia, observaram que a produção de citocinas foi maior, bem como, houve recuperação da morfologia intestinal nos animais tratados com a bactéria. Resultados também observados por Salva *et al.* (2014), que ao analisarem o efeito de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos Swiss imunossuprimidos, observaram maiores valores de leucócitos e neutrófilos nos grupos tratados com *pool* de *Lactobacillus*, e com o estudo de Wei *et al.* (2007), que verificaram que os camundongos imunocomprometidos, após receberem a suplementação de *Lacticaseibacillus rhamnorus* ZDY114 melhoraram as funções do sistema imunológico.

Contudo, em outros estudos utilizando camundongos em modelo de imunossupressão induzida, verificou-se que o probiótico *L. plantarum* não atuou na modulação do sistema imune (BUJALANCE *et al.*, 2007), dado também observado por Justino *et al.* (2014), ao administrarem *Saccharomyces boulardii* e, por Narcizo *et al.* (2014), ao suplementarem ratos *Wistar* saudáveis com *L. rhamnosus*, reforçando a necessidade de estudos que avaliem diferentes cepas, em diferentes sistemas patológicos tendo em vista que, a capacidade dos probióticos em proporcionar vários benefícios é considerada uma característica específica da cepa (VANDEREHOOF, 2008; FIGUEROA-GONZALEZ *et al.*, 2011).

4.4 Probióticos e quimioterápicos: Estudos *in vivo*

O tratamento quimioterápico, por proporcionar uma abordagem sistêmica, apresenta-se como o protocolo mais utilizado em neoplasias uma vez que, atua na destruição, controle ou inibição das células neoplásicas permitindo a cura e viabilizando o tratamento precoce de processos metastáticos (RODRIGUES; POLIDORI, 2012; BRASIL, 2013; INCA, 2023). Todavia, por agirem em células com alta capacidade de replicação – de origem tumoral e não tumoral –, medicamentos antineoplásicos podem proporcionar efeitos deletérios, fomentando reações adversas que variam de forma dependente conforme a dose, via e tipo de fármaco administrado, sendo classificadas como agudas ou crônicas e apresentando-se de maneira precoce, imediata, tardia ou ultra-tardia (CALIXTO-LIMA *et al.*, 2012; INCA, 2015; INCA, 2023).

Os efeitos colaterais podem estar associados a todas as categorias de agentes antineoplásicos – mostardas nitrogenadas, alquil sulfonados, nitrozuréis e triazenos – sendo os agentes alquilantes, os mais habitualmente utilizados, tendo em vista sua característica ciclo-celular não específica, ou seja, possuem a capacidade de erradicar as células tumorais independentemente de estarem no ciclo celular ou em repouso (ALMEIDA *et al.*, 2005; FERDINANDI; FERREIRA, 2009).

Devido seu amplo espectro, a ciclofosfamida (CF), um pró-fármaco alquilante, metabolizado no fígado, excretado pelos rins e que pode ser administrado por via oral ou intravenosa, é o quimioterápico mais comumente utilizado em tratamentos anti-tumorais (WAITZBERG, 2006; MCCUNE *et al.*, 2022). Pró-fármacos, são medicamentos em sua forma inativa (ou significativamente menos ativa) que ao serem administrados, passarão *in vivo* por biotransformação, originando metabólitos ativos, que favorecerão sua absorção e/ou ação. A metabolização da CF no tecido hepático, gera dois compostos, a fosfaramida e a acroleína, sendo a primeira responsável pelo maior efeito citotóxico desta (EMADI *et al.*, 2009). Entretanto, foi evidenciada a relação da acroleína com a ocorrência de estresse oxidativo e ao desenvolvimento de cistite hemorrágica (VIEIRA *et al.*, 2004; ABRAHAM; RABI, 2011).

Via de regra, os quimioterápicos são capazes de acometer a produção de células sanguíneas na medula óssea, ocasionando mielossupressão, cujas principais alterações hematológicas são leucopenia, trombocitopenia e anemia (FERDINANDI; FERREIRA, 2009; INCA, 2023).

No entanto, outros efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, alopecia, dermatite, amenorreia, oligospermia, esterilidade, pneumonite, cistite hemorrágica, cardiotoxicidade, perda de peso e inapetência também podem ser desencadeados pela utilização do fármaco (SANTOS *et al.*, 2007; EL-SHEIK; RIFAAI, 2014; MCCUNE *et al.*, 2022).

Sabe-se ainda, que agentes antineoplásicos, como a CF, no aumento do estresse oxidativo, ocasionando desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, com predominância do primeiro, como já evidenciado por diversos estudos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; TRIPATHI; JENA, 2010; ABRAHAM; RABI, 2011; EL-SHEIKH; RIFAAI, 2014; MOURA *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2018).

Estudos *in vivo* avaliando a ação citotóxica da CF têm sido realizados por Rehman *et al.* (2012), e verificaram que camundongos Swiss, submetidos a tratamento com CF (100 mg.kg⁻¹), obtiveram maiores níveis de nitrogênio ureico e creatinina no sangue, quando comparados ao grupo controle.

Em um estudo conduzido com ratos *Wistar*, os quais receberam uma única dose intraperitoneal de 150mg.kg^{-1} de CF para indução de dano renal, foi observado, um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e de glutathione peroxidase (GSH) em comparação ao grupo controle, a análise histológica dos rins sinalizou a presença de lesões, caracterizando nefrite glomerular no grupo CF, enquanto os rins dos animais do grupo controle não apresentaram alterações (ABRAHAM; RABI, 2011).

Outro estudo que avaliou o estresse oxidativo induzido por 50mg.kg^{-1} de CF em ratos *Wistar*, também foi constatado que o medicamento induziu, no fígado, um aumento significativo nos níveis de MDA e reduziu os níveis de GSH quando comparado ao grupo controle (TRIPHATI; JENA, 2010). Por sua vez, Patra *et al.* (2012), verificaram que uma dose reduzida de CF (50mg.kg^{-1}), aumenta significativamente os níveis de MDA na medula óssea e no fígado de camundongos *Swiss*, 24 horas após sua aplicação.

Segundo o estudo de El-Sheikh; Rifaai (2014), em ratos *Wistar*, observou-se o mesmo comportamento nos marcadores de estresse oxidativo GSH, óxido nítrico e MDA, onde os níveis encontrados no fígado foram significativamente maiores no grupo que recebeu o fármaco, e a análise histológica dos animais que receberam 150mg.kg^{-1} de CF, apresentou múltiplos focos de necrose, alterações gordurosas e infiltração glomerular inflamatória, além de um aumento do nível da citocina pró-inflamatória TNF- α , em comparação ao grupo controle.

Na avaliação da redução do estresse oxidativo com o uso de probióticos, Yadav *et al.* (2018), com ratos *Wistar*, verificaram um aumento significativo na atividade da enzima CAT nos rins e, da CAT e SOD no fígado de animais tratados com dieta rica em lipídeos e *L. fermentum* MTCC. Já para Moura *et al.* (2016), ratos *Wistar*, tratados com *L. acidophilus* La-5, 15 dias de suplementação promoveu um aumento nos valores de expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) mas, os valores de glutathione peroxidase (GPX) e CAT não diferiram entre os grupos.

Além dos danos já mencionados, estudos realizados com animais relatam que a utilização de medicamentos antineoplásicos pode desencadear a perda de peso e redução nos índices de consumo alimentar, fatores que podem influenciar

diretamente nos valores obtidos nos parâmetros bioquímicos (KANNO *et al.*, 2009; FABER *et al.*, 2011; EL-SHEIK; RIFAAI, 2014).

Contudo, estudos *in vivo* que avaliem o perfil bioquímico, usualmente estão associados a doenças inflamatórias e distúrbios metabólicos induzidos (como doença celíaca, síndrome metabólica, diabetes *Mellitus* e obesidade, por exemplo) porém, protocolos que avaliam citotoxicidade, também têm avaliado alguns destes parâmetros (OU *et al.*, 2012; NÚÑES *et al.* 2014; DI CERBO *et al.*, 2016; BUBNOV *et al.*, 2017; MCCUNE *et al.*, 2022).

Em relação às alterações hematológicas, estudos com roedores demonstraram que o uso de quimioterápicos é capaz de desencadear a redução nas contagens hematimétricas nos animais tratados (FABER *et al.* 2011; JUSTINO *et al.*, 2014; NARCIZO *et al.*, 2014; SALVA *et al.*, 2014).

Zuluaga *et al.* (2006), avaliaram se a aplicação de uma dose reduzida de CF, seria capaz de gerar neutropenia, a fim de determinar um modelo de imunossupressão experimental simplificado. Os resultados obtidos foram satisfatórios, onde a neutropenia severa foi alcançada ainda no 4º dia, quando foi administrada a segunda dose de CF; a leucopenia foi atingida 16 horas após a segunda dose do fármaco (no 5º dia de tratamento); e, a contagem de linfócitos e monócitos sofreram redução de 92% e 96% respectivamente, também ao 5º dia de tratamento. Outros autores também utilizaram o mesmo protocolo proposto por Zuluaga *et al.* (2006), e obtiveram resultados similares na redução da contagem celular da série branca (BUJULANCE *et al.*, 2007; CUNHA, 2016; GRÜTZMANN, 2017) e na produção/liberação de citocinas inflamatórias (DAE-WOON *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2019), evidenciando assim, a eficácia do modelo. Por este motivo, o protocolo de imunossupressão de Zuluaga *et al.* (2006), foi utilizado no presente estudo.

4.5 Probióticos em matriz alimentar

O desenvolvimento tecnológico de novos produtos com apelo funcional, onde segurança, saúde e bem-estar e aspecto econômico e social estejam aliados, tem alavancado, cada vez mais, o setor alimentício no Brasil e no mundo

tendo em vista a mudança no estilo de vida da população, que busca uma alimentação cujo impacto possa ser, cada vez mais, benéfico à saúde (BALTHAZAR *et al.*, 2017; GRANATO *et al.*, 2018; TURKMEN; AKAL; ÖZER, 2019).

Outrossim, alimentos funcionais de base láctea têm apresentado expressivo destaque no setor de alimentos, tendo em vista que representam mais de 40% do mercado consumidor e, incluem produtos suplementados com fibras, frutas, vitaminas, prebióticos, probióticos e baixo ou reduzido teor de lactose, açúcares adicionados e lipídios (ORTIZ *et al.*, 2017). Neste contexto, os alimentos probióticos têm recebido maior destaque, tendo em vista que são considerados alimentos funcionais, capazes de fornecer benefícios adicionais à saúde do consumidor, ou seja, além daqueles já inerentes às funções nutricionais básicas do alimento (FAZILAH *et al.*, 2018).

Atualmente, comercializam-se os mais diversos tipos de alimentos probióticos, sendo os principais, aqueles que apresentam uma base láctea como leites fermentados, iogurtes, kefir e queijos e o mercado mundial, em virtude da crescente preocupação da população com o consumo de alimentos que agreguem benefícios à saúde, prevê um aumento no consumo de produtos probióticos em geral, de 2019 com US\$ 48,88 bilhões , para US\$ 94,48 bilhões em 2027, através da procura mais acentuada dos consumidores, por alimentos que auxiliem na imunidade durante e após o período de pandemia (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021a).

Para a elaboração de um produto, com adição de bactérias probióticas, deve-se considerar a aceitação sensorial deste, uma vez que determinadas cepas podem produzir, a partir de seu metabolismo, compostos que apresentem sabor e aroma desagradáveis (*off-flavors*) (SONG *et al.*, 2012). Tais bactérias, podem ser aplicadas de forma que façam parte do processo de fermentação do alimento, atribuindo positivamente características sensoriais a este ou, por suplementação, onde ocorre adição dos microrganismos ao final do processo, sem causar quaisquer alterações, mas, mantendo os benefícios atribuídos à bactéria na saúde do hospedeiro (DAVIDSON *et al.*, 2000; ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007).

Ressalta-se ainda, que a eficácia da suplementação industrial de alimentos com microrganismos, está intimamente relacionada com as cepas selecionadas e, com seu potencial de contribuição nas características finais do produto (STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017; CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018).

Entretanto, para que o microrganismo possa conferir benefícios ao hospedeiro, é necessário estabelecer algumas características, como sua tolerância ao pH ácido do trato gástrico, aos sais biliares e às enzimas digestivas, ter capacidade de aderência à superfície da mucosa epitelial e persistência no trato gastrointestinal (MITROPOULOU *et al.*, 2013).

Neste sentido, avaliar a viabilidade de microrganismos probióticos em alimentos e na passagem ao TGI, é de suma importância na escolha dos mesmos para sua utilização no desenvolvimento de alimentos probióticos (RANADHEERA *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2011; SHORI, 2016; CHAMPAGNE *et al.*, 2018). Contudo, vale ressaltar que, embora haja um consenso a respeito da dose mínima necessária ($6 \log \text{UFC.g}^{-1}$), por possuírem benefícios cepa-dependentes, as concentrações para promoção da saúde de cada linhagem de microrganismo devem ser validadas individualmente (ANVISA, 2021).

Todavia, a composição das matrizes alimentares é capaz de influenciar na viabilidade dos microrganismos. Alimentos com alta capacidade de tamponamento (pH básico), podem auxiliar na sobrevivência ao promoverem a redução do suco gástrico no estômago durante à passagem do TGI (KLU; CHEN, 2015). Outro fator relevante, é que alimentos na forma líquida possuem tempo de digestão menor em relação aos sólidos, o que reduz o tempo de exposição dos probióticos com o suco gástrico (HUANG; ADAMS, 2004; KLU; CHEN, 2015).

Sendo assim, a elaboração de produtos na faixa de pH ácido, com reduzida atividade de água e/ou que serão submetidos ao processamento térmicos ou mecânico, apresenta um desafio adicional tendo em vista que a sobrevivência dos probióticos é menor na presença destas condições adversas (CUTTING, 2011). No entanto, alimentos lácteos em geral, cuja composição é

rica em carboidratos e proteínas, que possuem pH próximo à neutralidade e processamento e armazenamento sob cadeia fria, favorecem o desenvolvimento e a manutenção das concentrações celulares, embora possuam um prazo de validade reduzido (CRUZ *et al.*, 2009; CUTTING, 2011; BURGAIN *et al.*, 2014). Logo, uma vez que a validade do alimento está atrelada à sobrevivência do microrganismo, a utilização de sorvete como veículo para a distribuição de bactérias probióticas, pode ser um fator favorável ao desenvolvimento de novos produtos funcionais, por ser um produto armazenado sob congelamento, possuir pH neutro e uma composição variada (HOMAYOUNI *et al.*, 2008; CUTTING, 2011; BURGAIN *et al.*, 2014).

4.5.1 *Lactocaseibacillus casei* em matriz alimentar

Além de *status GRAS*, as BAL caracterizam-se como o principal grupo de microrganismos relacionados ao processo fermentativo, sendo frequentemente utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação de inúmeros alimentos (MOJGANI *et al.*, 2015). São capazes também, de promover a bioconservação e atribuir características sensoriais aos alimentos (FANG *et al.*, 2014; BURGAIN *et al.*, 2014). Além disso, sua utilização como probióticos tem sido cada vez mais evidenciada (SALVA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014; MARINELLI *et al.*, 2017; GRANATO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018) e, entre as espécies com potencial probiótico pertencentes ao grupo de BAL, encontra-se *L. casei*.

Diversos estudos têm avaliado a aplicação de *L. casei*, tanto no processo fermentativo como suplementação, em diferentes matrizes alimentares, de origem láctea, para obtenção de produtos probióticos associados ou não a outros alimentos como fibras, frutas e compostos bioativos. Elaboração de uma bebida láctea fermentada de aveia com *L. casei* LAFTI L26 (KLAJN *et al.*, 2021), leite fermentado com polpa de buriti e *L. casei* SJRP38 (BORGOROVI; CASAROTTI; PENNA, 2021), leite fermentado com *L. casei* (Chr. Hansen) e polpa de maracujá (ALVES *et al.*, 2020), sorvete de leite de ovelha suplementado com *L. casei* 01 (BALTAZHAR *et al.*, 2018), iogurte com *L. casei* 431 e farelo de arroz (DEMIRCI *et al.*, 2018), sorvete de leite de cabra com *Myrtus communis* e *L. casei* 431 (ÖZTÜRK; DEMIRCI; AKIN, 2018), queijo minas frescal suplementado com *L. casei* Zhang (DANTAS *et al.*, 2016), leite fermentado com *L. casei* ATCC 393

livre e microencapsulado (DIMITRELLOU *et al.*, 2016), observando que os microrganismos apresentaram viabilidade satisfatória sob armazenamento e boa aceitabilidade, indicando suas promissoras inserções no mercado.

Já a viabilidade *L. casei* CSL3, foi avaliada, primeiramente, em manteiga, mantendo as concentrações $> 6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, além de boa aceitabilidade sensorial (BELINAZO *et al.*, 2019), em queijo *Petit suisse*, adicionado na forma livre e imobilizado em abacaxi onde, tanto o tempo de armazenamento quanto a imobilização não influenciaram nas contagens celulares, porém, na simulação ao TGI, houve diferença estatística entre os tempos, embora a viabilidade em ambos os tratamentos foi $> 7 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ tanto na primeira quanto na oitava semana (VITOLA *et al.*, 2020) e, imobilizado em aveia para aplicação em iogurte onde obtiveram resultados satisfatórios tanto para viabilidade sob armazenamento por 25 dias, quanto sob a simulação ao TGI, além de positiva aceitabilidade sensorial (AMES *et al.*, 2021).

Portanto, considerando-se a crescente procura por alimentos industrializados com alto valor agregado, capazes de oferecer benefícios à saúde do consumidor, estudos que visam testar a viabilidade de *L. casei* CSL3 em outras matrizes alimentares, são importantes para avaliar o comportamento do microrganismo frente ao processamento, armazenamento e composição dos produtos.

4.6 Sorvete

O sorvete pode ser definido como um elaborado alimentício, obtido a partir de uma emulsão estabilizada, apresentado em estado sólido, semi-sólido ou pastoso que, após submetido à pasteurização, maturação e posterior congelamento, deve manter seu grau de plasticidade e de congelamento desde a indústria até o momento da venda ao consumidor (ORDOÑEZ *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010).

De acordo com a legislação vigente, encontra-se na categoria de “alimentos gelados comestíveis”, caracterizados por uma emulsão de gordura e proteínas (de origem láctea) ou, de uma mistura de água e açúcares (origem não

láctica), cuja adição de outros ingredientes pode ser realizada desde que estes não interfiram e/ou descaracterizem o produto (ANVISA, 2005).

Sua forma estrutural consiste em uma espuma, na qual as bolhas de ar estão cobertas por cristais de gelo, proteínas, carboidratos e glóbulos de gordura (individualizados ou parcialmente fundidos), sendo que a fusão dos glóbulos de gordura às bolhas de ar, será responsável pela textura, sabor e cremosidade do alimento, podendo ainda, interferir no tamanho dos cristais de gelo formados durante o processo de batimento da calda (ORDOÑEZ *et al.*, 2009; SILVA JUNIOR; LANNES, 2011; PINTOR *et al.*, 2013).

O consumo mundial de sorvete poderá ter um aumento de 30% até 2027, com faturamento em torno de US\$ 91,9 bilhões (em 2019 foi de US\$ 70,85 bilhões). A expectativa é de que produtos com ingredientes com propriedades nutricionais e fisiológicas, como probióticos, prebióticos e antioxidantes conquistem cada vez mais o mercado, alavancando seu crescimento (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021a).

Sob o âmbito tecnológico, essa matriz alimentar é considerada um sistema alimentício coloidal estruturalmente complexo, constituído por uma mistura congelada, em ordem de importância quantitativa, da combinação de leite (representando 60% da mistura), açúcares (ou adoçantes), gorduras, proteínas, estabilizantes, emulsificantes e flavorizantes (MARSHALL *et al.*, 2003; ORDOÑEZ *et al.*, 2009; SAAD *et al.*, 2011). E, no intuito de transformar este produto em um alimento funcional, podem ser adicionados inúmeros ingredientes e/ou componentes, como os microrganismos probióticos, prebióticos, vitaminas, minerais, frutas, sementes, compostos antioxidantes e adoçantes naturais, de forma combinada ou isolada desde que, respeitem as especificações da legislação e não forneçam nenhum tipo de alteração sensorial e/ou físico-química indesejada ao longo do período de armazenamento (MARSHALL *et al.*, 2001; CHAMPAGNE *et al.*, 2005; GOFF; HARTEL, 2006; SAAD *et al.*, 2011; LAMOUNIER *et al.*, 2012).

Entretanto, é importante ressaltar que a combinação de ingredientes é capaz de influenciar nas características finais do produto pois, a incorporação de ingredientes lipídicos, por exemplo, pode interferir na cremosidade, estrutura,

percepção dos cristais de gelo e sabor do produto, da mesma forma, a alteração da fonte de carboidratos, pode influenciar tanto no dulçor, quanto no ponto de congelamento, preservação, sensação de resfriamento na boca e textura (JASKULKA; SMITH; LARNTZ, 1993; KOEFERLI; PICCINALI; SIGRIST, 1996; GREMBECKA, 2015) logo, novas formulações devem levar em consideração as características reológicas desejadas no produto final.

Além do mais, por ser de fácil digestibilidade, apresentar sabor adocicado e textura macia, é um alimento aceito por todas as faixas etárias, de crianças a idosos, o que o torna um produto bastante atrativo para o setor industrial (CRUZ *et al.*, 2009; ABIS, 2023).

Neste cenário, o sorvete apresenta-se como uma adequada matriz alimentar para a adição de bactérias probióticas em função de sua composição e do pH próximo à neutralidade, características que auxiliam e favorecem a sobrevivência das bactérias (HOMAYOUNI *et al.*, 2008). Outra questão de suma relevância, é que por ser um produto cujo processamento e armazenamento ocorrem sob temperatura reduzida (-18 °C), tanto a vida útil do sorvete, quanto a viabilidade e estabilidade dos microrganismos é favorecida (CRUZ *et al.*, 2009).

Todavia, a incorporação de microrganismos probióticos no sorvete, apresenta obstáculos tecnológicos que necessitam ser sobrepostos, tendo em vista que estas bactérias devem resistir à ação do oxigênio incorporado durante o batimento, necessitam se adaptar ao pH final do produto e, devem permanecer viáveis durante o período de armazenamento deste, resistindo ao congelamento (HOMAYOUNI *et al.*, 2012; TRIPATHI; GIRI, 2014; VALÉRIO *et al.*, 2014). No entanto, ressalta-se que as gorduras e os açúcares podem exercer a ação de crioprotetores das culturas probióticas, auxiliando na sua estabilidade e viabilidade (SAAD *et al.*, 2011).

Diversos pesquisadores têm relatado que a adição de bactérias do gênero *Lactobacillus* em formulações de sorvetes probióticos e simbióticos tem se destacado, mantendo a viabilidade das cepas, as características físico-químicas e sensoriais (DI CRISCIO *et al.*, 2010; NOUSIA *et al.*, 2011; PANDIYAN *et al.*, 2012; VALERIO *et al.*, 2014; CRUXEN *et al.*, 2017; BALTAZHAR *et al.*, 2018).

As concentrações microbianas devem ser asseguradas em todas as etapas do processamento do alimento, desde a sua fabricação até a ingestão pelo consumidor (CRUZ *et al.*, 2009), sendo um consenso entre os pesquisadores a concentração mínima de 10^6 UFC.g⁻¹ no alimento (HILL *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019). Outro requisito a ser atendido, é a avaliação da matriz alimentar e dose ofertada, onde a realização de estudos com diferentes alimentos permita o conhecimento técnico da ausência de efeitos indesejados causados pelo microrganismo (ANVISA, 2021).

Embora o consumo *per capita* de sorvete no Brasil, ainda não seja tão expressivo quanto nos países nórdicos (SOUZA *et al.*, 2010; ABIS, 2023), fato este que de acordo com Renhe *et al.* (2015) está associado à composição do sorvete brasileiro – com baixos teores de sólidos lácteos e altos teores de açúcares – caracterizando-o como sobremesa e/ou guloseima; por apresentar fácil aceitabilidade, o sorvete se apresenta como um alimento bastante indicado para o consumo de pessoas idosas, com inapetência, que apresentam patologias gástricas (como gastrites e úlceras, por exemplo), em tratamento odontológico (pós-operatórios) e antineoplásico (radioterapia e quimioterapia) (GOMES *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2018), tornando-se um veículo promissor no desenvolvimento de novas formulações, suplementadas com microrganismos probióticos e, que atraíam a atenção do consumidor para uma nova linha de produtos funcionais (VALERIO *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2018) motivo pelo qual, foi escolhido como matriz alimentar deste estudo.

4.7 Produtos sem lactose

A intolerância à lactose, ou lactase não persistente, é uma condição clínica que acomete cerca de 75% da população adulta mundial (SILANIKOVE; LEITNER; MERIN, 2015; BATISTA *et al.*, 2018; MARCIANA *et al.*, 2019). Essa patologia ocorre devido a uma redução geneticamente programada na produção da enzima β -galactosidase (ou lactase) e/ou à ocorrência de doenças no trato digestivo que danifiquem a borda em escova da mucosa intestinal como enterites

infeciosas, doença de Crohn, celíaca e diverticular, por exemplo (WOOTEN, 2010; TOMAR *et al.*, 2014; SURI *et al.*, 2018).

A lactose é um dissacarídeo encontrado em produtos lácteos que, ao ser hidrolisado pela lactase, decompõem-se em glicose e galactose. A ausência ou baixa atividade da enzima, impossibilita essa reação, desencadeando sintomas gastrointestinais como gases, diarreia, cólicas e vômitos (WOOTEN, 2010; SURI *et al.*, 2018).

Entretanto, levando em consideração a quantidade de lactose ingerida, a forma e/ou produto no qual o carboidrato está inserido e, o nível de deficiência de lactase, o grau (ou gravidade) dos sintomas pode variar entre os indivíduos (TOMAR *et al.*, 2014). Por esse motivo, o desenvolvimento de alimentos isentos ou com teor reduzido de lactose, surge como uma alternativa para o consumo de produtos lácteos, atendendo à crescente demanda de mercado neste nicho e, proporcionando também, uma melhor digestibilidade do produto independente da faixa etária e do estado de saúde individual (VARDHANABHUTI; WANG, 2022).

Os produtos lácteos isentos ou com baixo teor de lactose, incluem alimentos nos quais parte da lactose é removida ou hidrolisada. O método de remoção enzimática é o mais comumente utilizado, contudo, pode apresentar desvantagens como a necessidade de tempo e equipamentos específicos para monitorar os parâmetros tecnológicos e químicos do processo, além da presença de sabor residual indesejável, devido ao acúmulo de subprodutos decorrentes da reação de hidrólise (ARSEN'EVA *et al.*, 2012; NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017). Porém, o uso de outras tecnologias como a separação por membranas ou a utilização de microrganismos, capazes de hidrolisar total ou parcialmente a lactose durante os processos fermentativos, também podem ser uma alternativa industrial para a redução do teor de lactose nos alimentos (NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017; SURI *et al.*, 2018; TRUBNIKOVA *et al.*, 2018).

Via de regra, produtos sem lactose, obtidos por hidrólise, não apresentam alterações nutricionais, contudo, é importante assegurar que a composição nutricional do alimento não seja comprometida durante seu

processamento, bem como, que o teor residual do carboidrato esteja dentro do estabelecido pelas normas nacionais e/ou internacionais vigentes, seguindo as especificações estabelecidas para alergênicos (SURI *et al.*, 2018; TRUBNIKOVA *et al.*, 2018).

4.8 Gengibre (*Zingiber officinale*)

Zingiber officinale é uma planta herbácea e perene, composta por rizoma e parte aérea, pertencente à família Zingiberaceae (ELPO; NEGRELLE, 2004). O rizoma, pode apresentar coloração amarelo ouro a marrom brilhante em sua parte externa e, marrom amarelado na parte interna, apresentando aroma agradável e sabor bastante pungente (ZANCAN *et al.*, 2002; ELPO, 2004).

Com utilização bastante diversificada, pode ser consumido *in natura*, conserva, cristalizado, seco ou em pó, na forma de condimentos e/ou chá (ELPO; NEGRELLE, 2004), no entanto as principais formas de uso são através da decocção, infusão, desidratação (pó), extrato e xarope (EMBRAPA, 2001).

Sua composição química pode variar conforme o local e origem dos rizomas, bem como, se estão na forma *in natura* ou seca, contudo, as características de aroma e pungência parecem permanecer constantes (ALI *et al.*, 2008). No produto fresco, já foram identificados mais de 60 compostos a partir do extrato de gengibre, dentre eles: aldeídos monoterpênicos, álcoois, bisaboleno, curcumeno (responsável pela coloração característica), sesquifelandreno (responsável pelo aroma marcante e característico e ação antimicrobiana), zingibereno, gingerol, shogaol e capsaicina (responsáveis pela pungência), cineol, citral, borneol e resinas (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2007; ELPO, 2004; SILVA *et al.*, 2017). He *et al.* (1998), relataram que os gingeróis podem ser modificados a uma série de compostos homólogos chamados shogaóis, que são ainda mais picantes, durante o armazenamento ou processamento térmico.

Considerado termogênico, o gengibre opera aumentando a secreção de saliva, produção de sais biliares e a atividade das enzimas digestivas (lipase, amilase, protease, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase), aumentando o

metabolismo e favorecendo assim a digestão e absorção da gordura dietética (PRAKASH; SRINIVASAN, 2012; MIYAMOTO *et al.*, 2015) e, por ser capaz de atuar na modulação de algumas vias bioquímicas ativadas nos processos de inflamação, atua inibindo prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (bastante associado ao 6-gingerol) (MOZAFFARI-KHOSRAVI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; EZZAT *et al.*, 2018).

Além disso, tem sido bastante utilizado no tratamento de diversas patologias, como sintomas gastrointestinais (enjoo e náusea) em pacientes de pós-operatório, em tratamento quimioterápico e gestantes (DABAGHZADEH *et al.*, 2014; BAMESHKI *et al.*, 2018; NUNES *et al.*, 2020).

Recentemente, em um estudo sobre a modulação da composição da microbiota intestinal de homens e mulheres frente à ingestão de suco de gengibre, Wang *et al.* (2021), observaram que o consumo à curto prazo do suco proporcionou um efeito significativo tanto na composição quanto na função da microbiota, sinalizando alterações positivas na diversidade bacteriana em ambos os gêneros.

Entretanto, na literatura são poucos os estudos envolvendo o uso de gengibre como saborizante em matrizes alimentares de origem láctea, sendo sua utilização mais correlacionada a bebidas e produtos de panificação, como condimento.

El-Aziz; Mohamed; Seleet (2012), elaboraram queijo com 15 e 30% de extrato de gengibre, observando um aumento das contagens de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* durante o armazenamento (atribuindo efeito prebiótico ao rizoma), além de uma análise sensorial satisfatória em relação ao sabor, textura e aspecto geral do produto.

Já Chamchan *et al.* (2017), adicionaram 10, 15 e 20% de extrato de gengibre em sorvete com redução de açúcar e verificaram que o índice de aceitabilidade foi melhor com 15%, além do mais, o produto apresentou maior teor de compostos fenólicos e de atividade antioxidante, apresentando-se como um potencial alimento funcional.

A adição de gengibre na forma de suco (2, 4, 6 e 8%), pasta (2, 4, 6 e 8%), doce (5, 10, 15 e 20%) e pó (0,5, 1, 1,5, e 2%) em sorvete, para comparar as propriedades adicionadas ao produto correlacionando aos diferentes processamentos do rizoma, foi analisado (GABBI; BAJWA; GORAYA, 2018). Os autores verificaram que a composição química do produto foi diretamente relacionada ao processamento realizado no gengibre, onde todas as formulações foram capazes de aumentar a atividade antioxidante e o teor de fenóis e de reduzir gorduras e proteínas do produto, sendo as formulações contendo suco de gengibre (6%), pasta (4%), doce (10%) e pó (1%), as de melhor aceitabilidade.

4.9 Mel

A composição química do mel varia conforme a origem floral utilizada pelas abelhas e pelas condições climáticas da região, sendo majoritariamente composto por carboidratos (95 – 99%) seguido de proteínas, vitaminas, minerais, aldeídos aromáticos, ácidos orgânicos, carotenóides, terpenóides e flavonides, que contribuem para formação de seu sabor (MUÑOZ *et al.*, 2007; NIKHAT & FAZIL, 2022).

Considerado uma fonte natural de antioxidantes, seu consumo é capaz de beneficiar o sistema imunológico, reduzir patologias cardiovasculares, processos inflamatórios e prevenção de catarata (ULLOA *et al.*, 2010). Nikhat; Fazil (2022), relatam também sua ação cicatrizante, antitoxina e antimicrobiana além, dos benefícios associados ao baixo índice glicêmico, o que o torna um adoçante recomendando para pessoas com diabetes.

A procura por produtos, que aumentem a imunidade através de suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, durante a pandemia de COVID-19, alavancou a comercialização de mel (aumento de 9% em 2020) e sua adição em bebidas e alimentos saudáveis tem se tornado uma tendência de mercado como um ideal substituto ao açúcar refinado (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021a).

O atributo do mel mais observado pelos consumidores é a cor (TERRAB; DIEZ; HEREDIA, 2002), e existe correlação entre a cor e o conteúdo de compostos flavonoides presentes no produto, sugerindo que os produtos mais escuros apresentam maior concentração destes compostos em relação aos mais claros, entretanto, vale ressaltar que a capacidade antioxidante deve ser comprovada uma vez que, não depende exclusivamente da presença de flavonoides (CIAPPINI; GATTI; DI VITO, 2013).

Devido aos muitos benefícios à saúde, a adição de mel em alimentos lácteos tem sido realizada no intuito de agregar propriedades sensoriais e funcionais aos produtos, proporcionando saúde e bem-estar aos consumidores (PERNA; SIMONETTI; GAMBACORTA, 2019).

A incorporação de mel em sorvete de iogurte, como adoçante alternativo à sacarose, apresentou boa aceitabilidade sensorial, embora tenha apresentado menor tempo inicial e total de fusão quando comparado à amostra controle e com estévia (ARSLANER *et al.*, 2019), e alterações na viscosidade do produto e no tempo de fusão também foram observados por Moriano; Alamprese (2017), ao comparar sorvetes adoçados com mel, eritritol e trealose.

Favarin; Laureano-Melo; Luchese (2015), avaliaram a capacidade prebiótica de mel em condições de trânsito gastrointestinal simulado sobre cepas de *Bifidobacterium* livres e encapsuladas e, foi verificado um efeito protetor do alimento, aumentando a viabilidade celular e a eficiência da microencapsulação.

1 **CAPÍTULO 2**

2 **Consumer perception, preferences and purchase intention towards ice** 3 **cream in Brazilian regions**

4 As páginas 47 à 69 não serão disponibilizadas por motivo de sigilo.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24 **CAPÍTULO 3**

25 **Potentially functional ice cream with *Lactocaseibacillus casei* CSL3, ginger**
26 **and honey**

27

28 As páginas 70 a 89 não serão disponibilizadas por motivo de sigilo.

CAPÍTULO 4

Administração de *Lactacaseibacillus casei* CSL3 em camundongos Swiss com imunossupressão induzida por ciclofosfamida: efeitos sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos, oxidativos e histológicos

Resumo

O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com *Lactacaseibacillus casei* CSL3 em camundongos Swiss imunossuprimidos com ciclofosfamida, sobre os parâmetros imunológicos, bioquímicos, oxidativos e histológicos. Os animais foram distribuídos em quatro grupos (controle, CSL3, ciclofosfamida e CSL3 + ciclofosfamida) onde, dois grupos foram tratados com *L. casei* CSL3 por 30 dias e, dois grupos receberam o quimioterápico (dias 27 e 30). Contagens de bactérias ácido-láticas (BAL) e BAL com resistência à bile em amostras de fezes, hemograma, níveis séricos de colesterol total, atividade da enzima catalase e níveis de TBARS no fígado, rins e cérebro, expressão de IL-4, IL-23, TNF- α , NF- κ B no baço e alterações histológicas no fígado, rins e intestino, foram avaliados. O grupo CSL3 + ciclofosfamida apresentou aumento significativo na contagem de BAL resistentes à bile em fezes, contagem de leucócitos e expressão de IL-23, TNF- α e NF- κ B, reduziu os níveis de colesterol total significativamente e, protegeu os danos ao fígado dos animais suplementados. Conclui-se que a bactéria é segura na concentração de $10 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ e possui potencial probiótico, devido sua influência positiva na resposta imunológica e, no metabolismo de lipídeos.

Palavras-chave: análises séricas, citocinas, fezes, *in vivo*, probióticos, quimioterapia

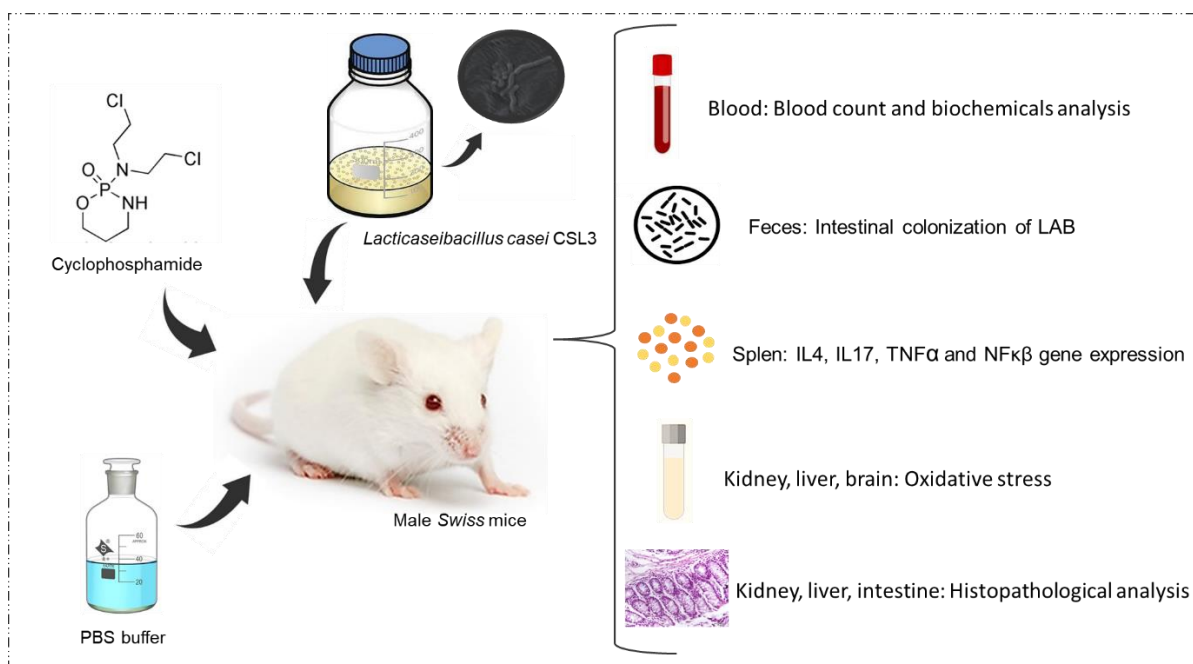


Figura 8. Graphical abstract – avaliação de parâmetros imunológicos, bioquímicos, oxidativos e histológicos de camundongos Swiss imunossuprimidos com ciclofosfamida e suplementados por 30 dias com *Lactobacillus casei* CSL3

7.1 Introdução

O uso de probióticos tem sido explorado nos últimos anos devido à ampla gama de benefícios evidenciados, principalmente, sobre a modulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal, intervindo na saúde do hospedeiro (MARINELLI *et al.*, 2017; BADGELEY *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021).

Embora existam no mercado, muitas cepas com propriedades probióticas, cujos efeitos já foram comprovados, estudos indicam que a dose, o período de administração e os benefícios gerados são dependentes da cepa (FIGUEROA-GONZALEZ *et al.*, 2011; BUBNOV *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2018; CASTRO; LUCHESE, 2022). Portanto, a prospecção de novos microrganismos é fundamental para diversificar a microbiota intestinal e manter o equilíbrio homeostático, além de propiciar a descoberta de novos efeitos fisiológicos benéficos (GEORGIEV; GEORGIEVA, 2015; BAJIC *et al.*, 2018).

No entanto, os probióticos devem ser seguros para o consumo humano (*status* GRAS – Generally Recognized As Safe), e para isso, os microrganismos

precisam ser submetidos a inúmeros testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos, para caracterizá-los (FDA, 2023). Logo, estudos envolvendo a simulação de grupos e/ou fatores de risco como modelos de imunossupressão, com síndrome metabólica, processos infecciosos, gestantes, lactentes e idosos, que auxiliem a evidenciar a ocorrência de translocação bacteriana, toxicidade e/ou a patogenicidade da cepa investigada, são de suma importância, uma vez que, a segurança do microrganismo está correlacionada ao benefício pretendido, ao estado de saúde do consumidor e à dose, duração, forma e frequência de consumo (SANDERS *et al.*, 2010; SANDERS *et al.*, 2016; KOTHARI; PATEL; KIM, 2019).

Muitos estudos indicam que a administração de probióticos é capaz de promover uma boa evolução na resposta imunomoduladora em diferentes modelos biológicos (NÚÑEZ *et al.*, 2014; MARINELLI *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2018; VINCENZI *et al.*, 2021; MCCUNE *et al.*, 2022), no entanto, pesquisas envolvendo tratamento antineoplásico, que atuam em nível celular, também têm se destacado, nos últimos anos (MARINELLI *et al.*, 2017; GORSKA, *et al.*, 2019; LINN *et al.*, 2019; BEDADA *et al.*, 2021; BADGELEY *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021). O uso de quimioterápicos no tratamento antineoplásico tem abordagem sistêmica e, por atuarem em células com alta capacidade de replicação de origem tumoral e não tumoral, os medicamentos podem desencadear diversos efeitos colaterais, de acordo com a dose, via de tratamento e tipo de medicamento administrado (VIVARELLI *et al.*, 2019).

Via de regra, a terapia quimioterápica pode causar mielossupressão, aumento do estresse oxidativo, aumento dos marcadores da função renal e hepática, aumento da liberação de citocinas inflamatórias, cardiotoxicidade, náusea, diarreia, alopecia, dermatite, disbiose e perda de peso (REHMAN *et al.*, 2012; SALVA *et al.*, 2014; EL-SHEIKH; RIFAAI, 2014; CHOI *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2019; LINN *et al.*, 2019; MCCUNE *et al.*, 2022).

Nesse contexto, diferentes microrganismos probióticos têm sido, cada vez mais, associados ao tratamento medicamentoso para promover melhora e proteção contra os efeitos colaterais causados pelos medicamentos (MAROOF *et al.*, 2012; GORSKA, *et al.*, 2019; NAZIR *et al.*, 2018). Importantes probióticos

de aplicação clínica e alimentos, pertencem ao grupo de bactérias ácido-láticas (BAL). Assim, *Lactacaseibacillus casei* CSL3, isolado de silagem de colostro bovino, foi considerado seguro e potencialmente probiótico através de testes *in vitro* (VITOLA *et al.*, 2018), razão pela qual foi escolhido no presente estudo.

Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com *Lactacaseibacillus casei* CSL3 em camundongos Swiss imunossuprimidos com ciclofosfamida sobre os parâmetros imunológicos, bioquímicos, oxidativos e histológicos.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Microrganismo e condições de crescimento

Lactacaseibacillus casei CSL3, foi isolado de silagem de colostro bovino, caracterizado e identificado (número de acesso JQ580986.1 GenBank) por Vitola *et al.* (2018). Cultivado em caldo De Man Rogosa & Sharpe (MRS, Acumedia®) a 37 °C/18 horas em anaerobiose. Uma alíquota de 1% foi transferida para 100 mL de caldo MRS. Posteriormente, 1% do segundo cultivo foi transferido para 500 mL de caldo MRS, mantendo sempre, as mesmas condições de crescimento.

Finalizado as etapas de cultivo, a cultura foi centrifugada a 4.165 g por 10 min a 20 °C (5430-R, Eppendorf®); o *pellet* foi lavado três vezes com tampão fosfato salino (PBS, Canvax®) para remover quaisquer resíduos do meio de cultura, ressuspenso no mesmo tampão e armazenado sob refrigeração (6 °C). Para determinar a concentração do microrganismo, foram realizadas contagens em ágar MRS nos dias 0, 15 e 30 de experimento (dados não apresentados).

7.2.2 Animais

Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos com idade de 28 ± 5 dias. Após o desmame, aos 21 dias de idade, os animais foram submetidos à aclimação por sete dias para eliminar qualquer viés alimentar e, durante o experimento, todos receberam dieta padrão para roedores (Nuvilab CR-1, Nuvital®) e água esterilizada *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gabinetes

de 27x19x20 cm e bebedouro de polipropileno com capacidade para 500 mL, contendo cinco camundongos por gabinete, em ambiente controlado com temperatura de 22-24 °C, umidade relativa de 65-75% e ciclos claro/escuro de 12 horas.

7.2.3 Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente randomizado e organizado em esquema unifatorial (diferentes grupos) para hemograma, estresse oxidativo, expressão de citocinas e análise histopatológica, um sistema bifatorial 4x3 (grupos x tempo) para perfil bioquímico e contagem bacteriana de fezes 4x5 (grupos x tempo).

7.2.4 Modelo *in vivo*

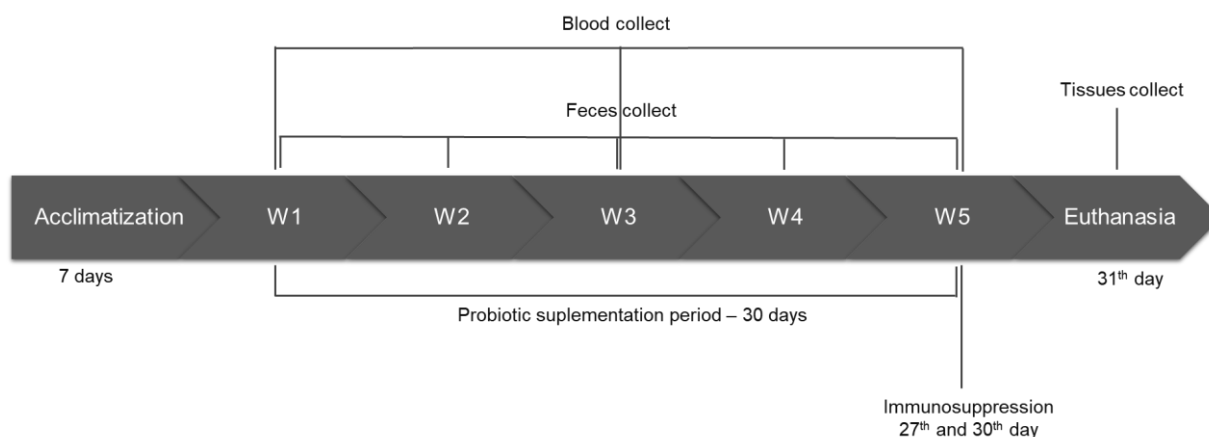
Os animais foram divididos em quatro grupos, cada um contendo 10 animais. Todos receberam gavagem diária por 30 dias e duas injeções intraperitoneais de ciclofosfamida (CFF, Genuxal®) (dias 27 e 30), de acordo com o delineamento de cada grupo.

Grupo controle (C): gavagem com PBS e duas injeções de PBS; grupo Ciclofosfamida (CF): gavagem com PBS e duas injeções de CFF (dose total de 250 mg.kg⁻¹); Grupo *L. casei* CSL3 (LC): gavagem com 10 log UFC.mL⁻¹ de *L. casei* CSL3 e duas injeções de PBS e; Grupo *L. casei* CSL3 + ciclofosfamida (LCCF): gavagem com 10 log UFC.mL⁻¹ de *L. casei* CSL3 e duas injeções de CFF (dose total de 250 mg.kg⁻¹).

A suplementação com CSL3 começou 26 dias antes da primeira injeção de CFF e continuou até o período final do experimento (30 dias). Aos 27 e 30 dias, foi realizada imunossupressão induzida por CFF nos grupos CF e LCCF, conforme protocolo estabelecido por Zuluaga *et al.* (2006), sendo os animais eutanasiados no 31º dia de experimento (Figura 9).

Antes da eutanásia, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (Cristália®) e em seguida submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca, seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo COBEA (DOU, 2016). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, sob o nº 23110.040985/2019-82 e o esquema e o

169 modelo de delineamento estão de acordo com as diretrizes ARRIVE 2.0
 170 (PERCIE DU SERT, 2020).



171

172 **Figura 9.** Linha do tempo do modelo *in vivo*, camundongos Swiss machos
 173 suplementados com *Lactiseibacillus casei* CSL3 e imunossuprimidos com
 174 ciclofosfamida, no período de 31 dias

175 7.2.5 Análise da colonização intestinal por bactérias ácido-láticas

176 Cerca de 100 mg de fezes frescas foram coletadas semanalmente (S1,
 177 S2, S3, S4 e S5) em todos os grupos, diluídas em 1 mL de PBS esterilizado e
 178 mantidas congeladas até o processamento. Para determinar a concentração do
 179 microrganismo, diluições decimais seriadas seguidas de contagens foram
 180 realizadas em ágar MRS para contagem de bactérias ácido-láticas (BAL) e ágar
 181 MRS com 0,3% de sais biliares (Vetec®) para BAL resistentes à bile (BALRB).
 182 As placas foram incubadas em condições de anaerobiose por 72 h/37 °C.

183 7.2.6 Análise do hemograma e perfil bioquímico

184 Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais, no início (T0)
 185 aos 15 dias do experimento (T15) – pela veia facial – e, ao final do experimento
 186 (T30), durante a eutanásia.

187 Volumes de 500 µL/animal foram coletados ao final do experimento,
 188 colocados em tubos com EDTA (Vacuplast®) e imediatamente transportados,
 189 sob refrigeração, a um Laboratório de Análises Clínicas especializado para
 190 realização do hemograma.

A análise bioquímica de colesterol total, foi realizada utilizando kit diagnóstico comercial padronizado (Labtest®) onde, em média, 500 µL/animal foram coletados em microtubos sem anticoagulante e centrifugados a 200 rpm/5 minutos em temperatura ambiente, para separação do soro e avaliações posteriores.

7.2.7 Expressão gênica de IL-4, IL-23, TNF- α e NF- κ B

Para a análise de interleucina 4 (IL-4), interleucina 23 (IL-23), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), os baços dos animais foram coletados sob condições assépticas e triturados, passando por uma membrana de filtro celular de 40 µm (Corning®). Em seguida, as células foram precipitadas pela adição dos tampões de lise 1 e 2 e centrifugação a 2000 rpm/7 min. As células foram lavadas com solução balanceada de Hanks (Merck®) e ressuspensas em meio RPMI suplementado com anfotericina B, penicilina (100 U. mL⁻¹ Laborclin®), estreptomicina (100 mg. mL⁻¹ Laborclin®) e soro fetal bovino (10%, Sigma®). O cultivo foi realizado em placas de 24 poços com fundo chato e incubadas a 37 °C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ (GONÇALVES *et al.*, 2021).

As células coletadas foram estimuladas com a mesma cultura de *L. casei* CSL3 e ciclofosfamida na concentração administrada aos animais (10 log UFC.mL⁻¹ e 250 mg.kg⁻¹, respectivamente).

A extração do RNA ocorreu de acordo com o protocolo estabelecido para o Trizol™ Reagent (Invitrogen®), e a quantificação das amostras foi realizada em Nanovue (ng µL⁻¹), por meio da absorbância em 260 nm, que fornece o conteúdo total de ácido nucléico, e em 280 nm, que determina a pureza da amostra.

A síntese do cDNA foi realizada por Real-Time Workstation utilizando "High-Capacity cDNA Reverse Transcription" kit (Applied Biosystem®), e para a reação de PCR em tempo real, foram utilizados 0,25 µL de primer F, 0,25 µL de primer R (sequências na Tabela S1, em material complementar), 3,5 µL de água, 5,0 µL de Syber e 1,0 µL de cDNA.

7.2.8 Análise do estresse oxidativo no tecido hepático, renal e cerebral

Durante a eutanásia, o fígado, cérebro e rins foram removidos assepticamente, colocados em microtubos e imediatamente congelados a -70 °C, para posterior análise.

No momento das análises, pesou-se cerca de 0,5 mg de tecido e adicionou-se uma solução tampão Tris (Synth®) (cinco vezes o peso do cérebro e dez vezes o peso dos demais órgãos), para realizar a homogeneização manual. O material foi centrifugado a 1000 rpm/10 minutos em temperatura ambiente (5430-R, Eppendorf®), e os sobrenadantes foram coletados para análise espectrofotométrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), utilizando o protocolo descrito por Ohkawa *et al.* (1979) e, atividade da enzima catalase (CAT), conforme definido por Aebi (1984).

7.2.9 Análise histopatológica

Durante a eutanásia, amostras de rim, fígado e intestino foram extraídas dos camundongos e fixados em formol a 10% (Synth®), para exame histopatológico. Os tecidos passaram pela embebição em parafina (Synth®), na sequência a desparafinização (tecidos foram submetidos a banhos de álcool em concentração decrescente), cortados com micrótono na espessura de 5 mm e corados com hematoxilina (Dinâmica®) e eosina (Dinâmica®), para avaliação histológica em microscópio óptico (Olympus BX43) (SAINTE-MARIE, 1962).

7.2.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, quanto à homocedasticidade pelo teste de Hartley, e verificando-se dados com comportamento não paramétrico, procedeu-se à remoção de *outliers* e à transformação dos dados visando obter dados de comportamento paramétrico. Os *outliers* foram identificados traçando resíduos externos estudantis (RStudent) em relação aos valores previstos (variável Y) e avaliando o gráfico de Distância de Cook. A partir dos gráficos RStudent, os valores fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW; LEROY, 1987; BARNETT; LEWIS, 1994). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de comparação de variâncias por meio do teste F ($p < 0,05$). Para

significância estatística, os fatores de tratamento com três ou mais níveis foram comparados usando o teste de Bonferroni ($p < 0,05$), e os fatores de tratamento com dois níveis foram comparados usando o teste t (*student*).

7.3 Resultados

7.3.1 Análise da colonização intestinal com bactérias ácido-láticas

A análise de variância para viabilidade de bactérias ácido-láticas nas fezes, mostrou uma interação entre os fatores de tratamento ($p=0,0001$) para BAL e BALRB. A comparação dos grupos em cada tempo é mostrada na Tabela 9, enquanto a viabilidade de BAL e BALRB em função do tempo é mostrada na Figura 10.

Tabela 9. Viabilidade das bactérias ácido-láticas (BAL) e bactérias ácido-láticas resistentes à bile (BALRB) ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) no conteúdo fecal dos animais, comparando os grupos durante o período experimental

Tempo (semanas)	Controle	CF	LC	LCCF
BAL				
1	$8,89 \pm 0,13^{ab}$	$8,49 \pm 0,02^{bc}$	$8,23 \pm 0,24^c$	$8,98 \pm 0,09^a$
2	$8,77 \pm 0,30^b$	$9,39 \pm 0,15^{ab}$	$8,56 \pm 0,04^b$	$9,57 \pm 0,29^a$
3	$8,64 \pm 0,05^b$	$9,70 \pm 0,13^a$	$8,64 \pm 0,09^b$	$9,53 \pm 0,24^a$
4	$8,63 \pm 0,13^b$	$9,26 \pm 0,24^a$	$8,59 \pm 0,11^b$	$9,68 \pm 0,16^a$
5	$8,52 \pm 0,15^c$	$9,58 \pm 0,11^a$	$8,85 \pm 0,08^{bc}$	$9,28 \pm 0,29^{ab}$
BALRB				
1	$8,87 \pm 0,17^a$	$8,60 \pm 0,15^a$	$8,42 \pm 0,10^a$	$8,60 \pm 0,35^a$
2	$8,91 \pm 0,11^b$	$9,64 \pm 0,05^a$	$9,46 \pm 0,09^a$	$9,55 \pm 0,12^a$
3	$8,87 \pm 0,15^{bc}$	$9,38 \pm 0,23^{ab}$	$8,71 \pm 0,23^c$	$9,87 \pm 0,11^a$

4	$8,57 \pm 0,11^b$	$9,36 \pm 0,10^a$	$8,56 \pm 0,24^b$	$9,64 \pm 0,18^a$
5	$8,88 \pm 0,16^c$	$9,64 \pm 0,08^{ab}$	$9,05 \pm 0,40^{bc}$	$9,80 \pm 0,04^a$

266 Médias $\pm$ desvio padrão seguidas de letras diferentes na mesma linha, indicam
 267 diferença significativa pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) na comparação dos
 268 grupos. CF: ciclofosfamida; CL: *L. casei* CSL3; LCCF: *L. casei*
 269 CSL3+ciclofosfamida.

270 Foram obtidas contagens de bactérias BAL e BALRB entre 8 – 9 log
 271 UFC.g⁻¹ em todos os grupos; no entanto, há uma diferença significativa na
 272 concentração de microrganismos entre os tratamentos, ao longo do período
 273 experimental.

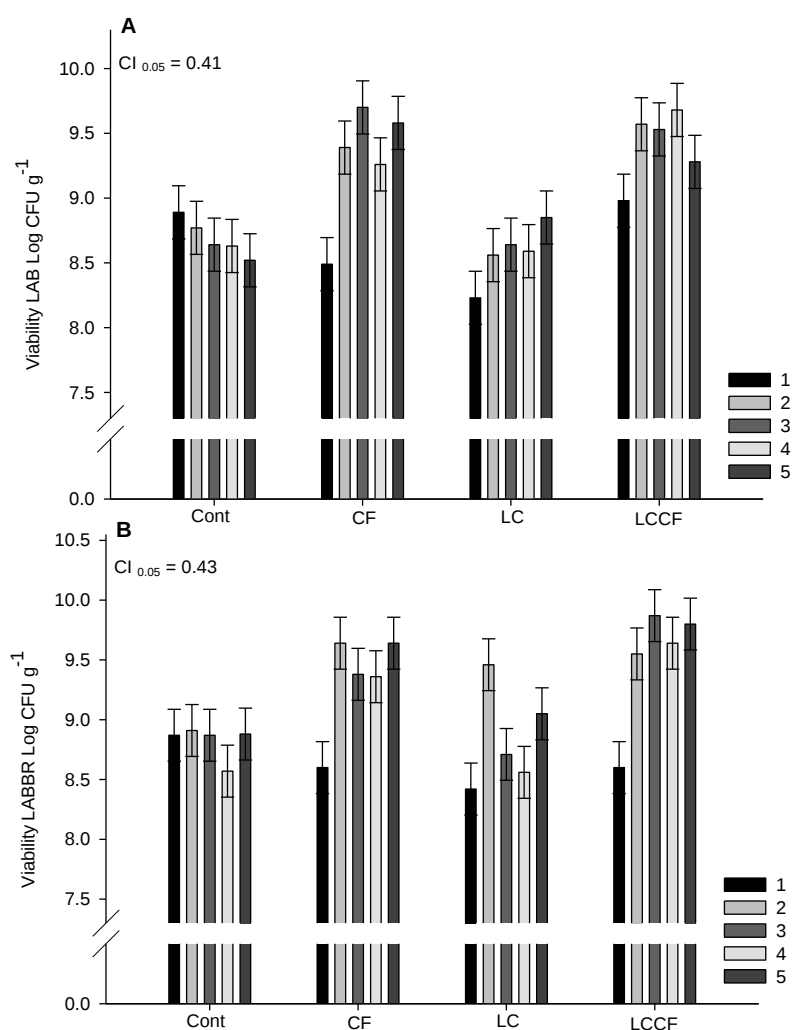


Figura 10. Viabilidade das bactérias ácido-láticas (BAL, A) e BAL resistentes à bile (BALRB, B) no conteúdo fecal dos animais comparando o mesmo tratamento, ao longo do período experimental (semanas). Cont: controle; CF: ciclofosfamida; CL: *L. casei* CSL3; LCCF: *L. casei* CSL3+ciclofosfamida

Pode-se observar que nos grupos controle e LC, para BAL, não houve alteração nas contagens ao longo do tempo, permanecendo com concentrações superiores a $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$, embora tenha havido diferença significativa entre esses grupos, na primeira semana. Esse comportamento não se refletiu nas contagens BALRB porque, ao contrário do grupo controle, os grupos CF, LC e LCCF apresentaram um aumento de 1 ciclo logarítmico ao final do período.

Ressalta-se também que os animais que receberam o fármaco (CF e LCCF), para as contagens de BAL e BALRB apresentaram concentrações maiores que os demais grupos, embora não significativas, principalmente na quinta semana (período em que a CFF foi administrada), sugerindo que a presença do medicamento influenciou a concentração de microrganismos. No entanto, ao avaliar as concentrações nos grupos que receberam suplementação de CSL3 (LC e LCCF), houve diferença significativa apenas para a contagem de BALRB no grupo LCCF, que foi significativamente maior.

7.3.2 Análise do hemograma e perfil bioquímico

A análise de variância mostrou que apenas o volume corpuscular médio (VCM), proteína plasmática total (PPT), fibrinogênio e monócitos não foram significativos ($p > 0,05$), indicando que os diferentes tratamentos não interferem nessas variáveis dependentes. Os resultados significativos do hemograma podem ser vistos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores do hemograma dos animais tratados com *L. casei* CSL3 e ciclofosfamida ao final do experimento

Análises	Controle	CF	LC	LCCF
Hemácias (milhões/mm ³)	9,62 ± 0,40 ^a	8,60 ± 0,36 ^b	10,01 ± 0,55 ^a	8,65 ± 0,58 ^b
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	13,34 ± 0,19 ^{ab}	12,14 ± 0,38 ^c	14,04 ± 0,51 ^a	12,52 ± 0,73 ^{bc}

Hematócrito (%)	50,14 ± 0,87 ^a	44,26 ± 1,40 ^b	53,14 ± 1,77 ^a	45,60 ± 2,56 ^b
CHCM (%)	26,74 ± 0,15 ^b	27,36 ± 0,25 ^a	26,50 ± 0,29 ^b	27,46 ± 0,20 ^a
Plaquetas* (10 ³ /mm ³)	17,02 ± 0,99 ^a	12,98 ± 1,56 ^b	17,26 ± 1,32 ^a	13,52 ± 2,01 ^b
Leucócitos* (mm ³)	24,60 ± 3,57 ^b	6,00 ± 3,57 ^c	32,50 ± 1,00 ^a	7,75 ± 3,77 ^c
Neutrófilos* (mm ³)	6,18 ± 1,07 ^a	1,05 ± 0,70 ^b	7,21 ± 4,74 ^a	0,85 ± 0,51 ^b
Linfócitos* (mm ³)	16,19 ± 4,73 ^b	4,74 ± 2,15 ^c	25,76 ± 6,90 ^a	8,54 ± 4,95 ^{bc}

301 Média ± desvio padrão seguida de letras diferentes na mesma linha, indicam
 302 diferença significativa pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$); *100x os valores
 303 observados na tabela; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular;
 304 CF: ciclofosfamida; CL: *L. casei* CSL3; LCCF: *L. casei* CSL3+ciclofosfamida.

305 Os resultados observados indicam que a suplementação com CSL3 não
 306 influenciou na análise de hemácias, hemoglobina, hematócrito, concentração
 307 média de hemoglobina corpuscular (CHCM), plaquetas e neutrófilos, visto que
 308 não houve diferença significativa entre os grupos controle e LC para estes
 309 parâmetros. Já nos grupos que receberam CFF (CF e LCCF), os valores obtidos
 310 nesses parâmetros, foram significativamente menores.

311 Em relação às contagens de neutrófilos, leucócitos e linfócitos, houve
 312 redução significativa nos grupos que receberam a CFF, mostrando que o
 313 protocolo utilizado para imunossupressão foi eficaz. Além disso, os animais do
 314 grupo LC, que receberam suplementação com CSL3, apresentaram valores
 315 significativamente maiores que os animais dos demais tratamentos, indicando
 316 que o microrganismo foi capaz de influenciar a resposta imune. Da mesma
 317 forma, o grupo LCCF apresentou valores de linfócitos significativamente
 318 semelhantes ao grupo controle, sinalizando potencial modulação da resposta
 319 imune desse grupo.

320 Os níveis de colesterol total foram significativos apenas para o tempo
 321 ($p=0,0001$), onde foi observado que T30 diferiu de T15 a T0, e todos os
 322 tratamentos avaliados foram significativamente menores (Figura 11).

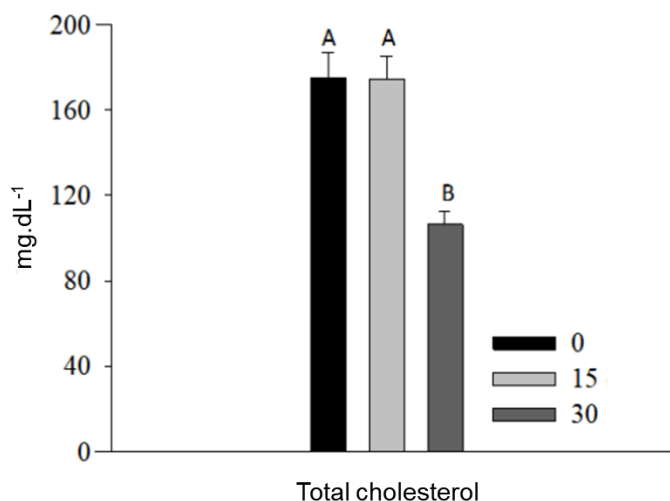


Figura 11. Concentração de colesterol total no sangue de animais ao longo do período experimental, tratados com *L. casei* CSL3 e ciclofosfamida; Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$)

7.3.3 Expressão gênica de IL-4, IL-23, TNF- α e NF- $\kappa\beta$

A análise de variância mostrou interação entre os tratamentos LC x CF e LC x LCCF para TNF- α ($p < 0,001$) e NF- $\kappa\beta$ ($p < 0,01$) e, entre os tratamentos LC x CF para IL-23 ($p=0,0228$). Os resultados obtidos para IL-4 não foram significativos ($p > 0,05$) (Figura 12).

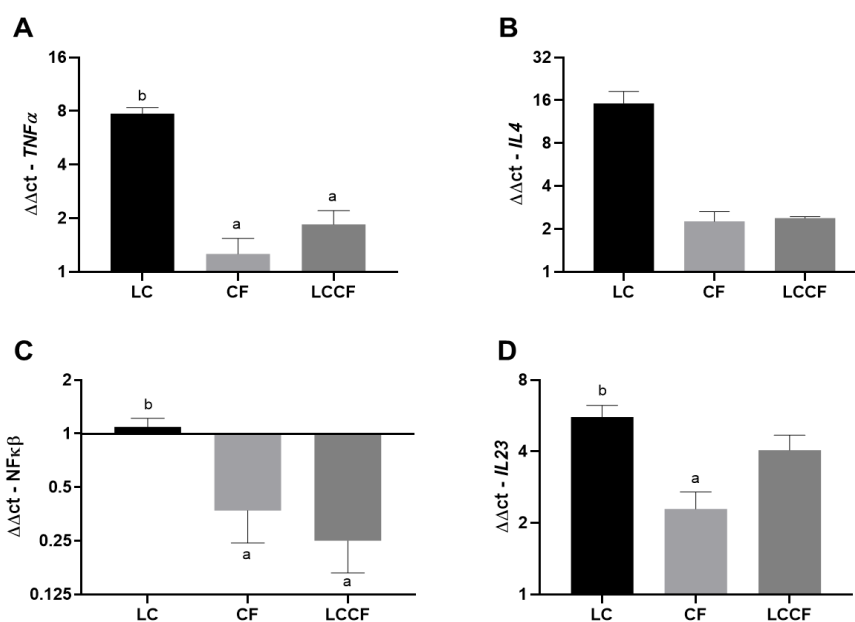


Figura 12. Transcrição relativa de TNF- α (A), IL-4 (B), NF- $\kappa\beta$ (C) e IL-23 (D), em esplenócitos do baço que receberam estimulação *in vitro* de *L. casei* CSL3, para

cada tratamento. Letras diferentes indicam uma diferença significativa por One-way ANOVA ($p < 0,05$). CF: ciclofosfamida; CL: *L. casei* CSL3; LCCF: *L. casei* CSL3+ciclofosfamida

A partir da estimulação *in vitro* de esplenócitos com *L. casei* CSL3, ao comparar a transcrição relativa de TNF- α no grupo LC (7,74) com o grupo tratado com CFF (CF), observa-se uma redução de 1,26 vezes e, a partir o grupo suplementado com o microrganismo e tratado com o fármaco (LCCF), uma diminuição para 1,85 vezes. Esse comportamento também pode ser observado nos valores relativos de transcrição da IL-23, onde comparado ao grupo LC (5,58 vezes), houve redução para 2,29 vezes no grupo CF e 4,05 vezes no LCCF. Da mesma forma, a transcrição relativa de NF- κ B também apresentou reduções entre os grupos CF (0,37 vezes) e LCCF (0,25 vezes) quando comparado ao grupo LC (1,09 vezes).

Com relação à transcrição da interleucina 4, embora os resultados não sejam significativos, os grupos CF (2,26 vezes) e LCCF (2,39 vezes) também apresentaram redução em sua expressão em comparação ao grupo LC (15,21 vezes).

3.4 Análise do estresse oxidativo no tecido hepático, renal e cerebral

A análise de variância mostrou que apenas os resultados para catalase renal foram significativos ($p=0,0001$), sendo maior apenas no grupo controle, indicando que os diferentes tratamentos influenciaram essa variável dependente (Tabela S2, material complementar); portanto, catalase hepática e cerebral e TBARS rim, fígado e cérebro não foram significativos ($p > 0,05$).

3.5 Análise histopatológica

O exame microscópico dos tecidos não revelou alterações no rim e intestino grosso (porção inicial) dos grupos analisados. Em relação ao fígado, para o grupo LCCF, os animais não apresentaram danos teciduais, porém, nos grupos controle, CF e LC, 100, 60 e 20% dos animais demonstraram lesão tecidual, respectivamente, demonstrando sinais de inflamação, degeneração gordurosa (lipidose) e congestão tecidual, como primeira manifestação de dano celular (Figura 13).

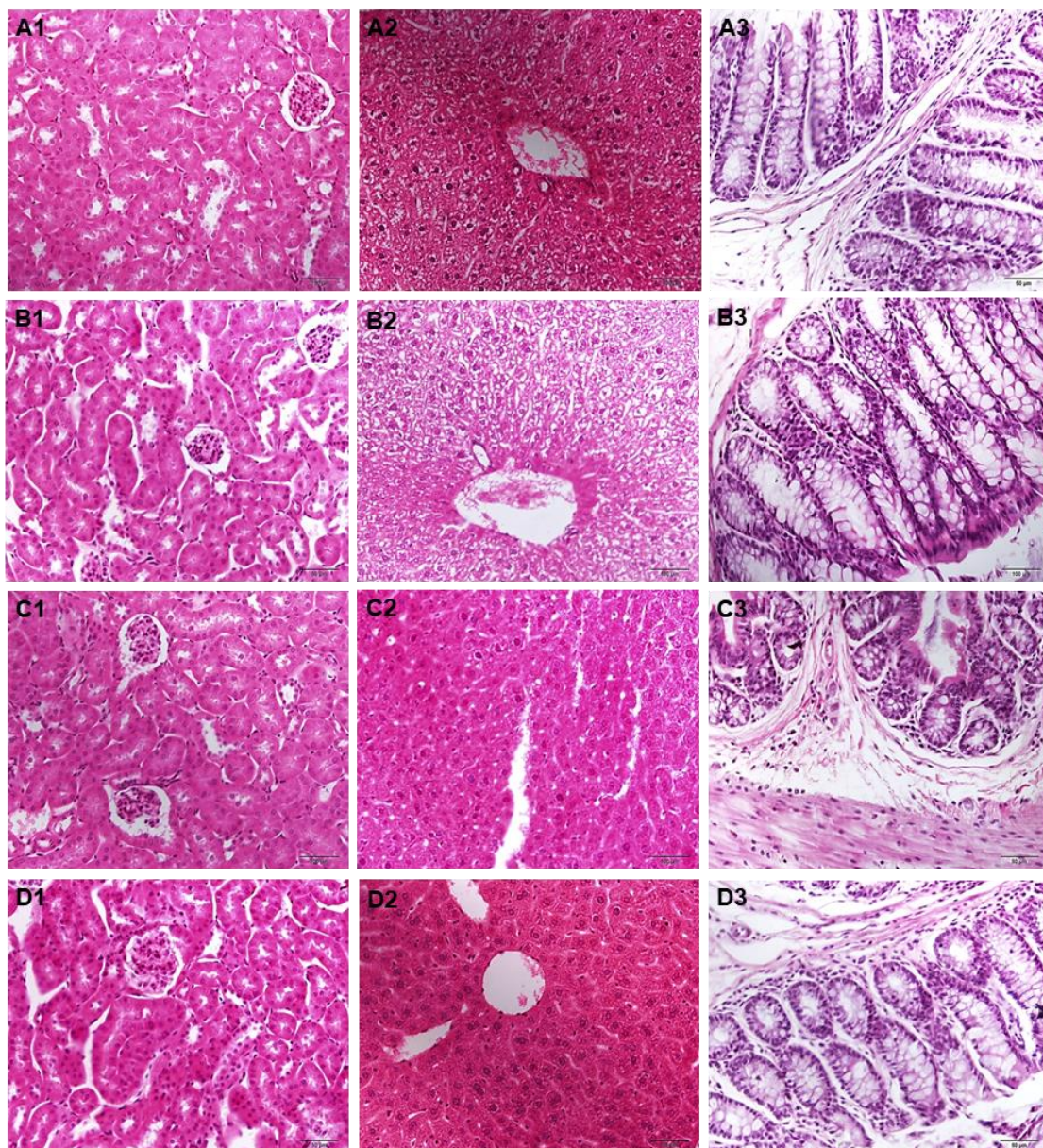


Figura 13. Rim (A1), fígado (A2) e intestino (A3) do grupo controle; Rim (B1), fígado (B2) e intestino (B3) do grupo ciclofosfamida; Rim (C1), fígado (C2) e intestino (C3) do grupo *L. casei* CSL3; e Rim (D1), fígado (D2) e intestino grosso (D3) do grupo *L. casei* CSL3+ciclofosfamida (aumento microscópico de 40x).

As amostras de rim e intestino grosso estão inalteradas em todos os grupos. No fígado, as alterações podem ser observadas em A2 e B2, onde o fígado apresenta sinais de inflamação, lipidose e congestão.

7.4 Discussão

Os agentes quimioterápicos podem afetar a produção de células sanguíneas na medula óssea, sendo a anemia e a leucopenia as alterações mais comumente encontradas (FERREIRA *et al.*, 2013). No presente estudo, não foi observada anemia nos animais tratados com ciclofosfamida (CFF), porém, houve a manifestação de leucopenia, neutropenia e linfopenia em relação aos animais dos grupos controle e LC.

Camundongos *Swiss* suplementados com *L. casei* CRL 431 e *L. rhamnosus* 1506 apresentaram contagem de leucócitos e de neutrófilos semelhantes aos observados no grupo imunossuprimido com CFF; porém, ao final do estudo os autores observaram que a recuperação da depleção celular foi mais rápida nos grupos que receberam os microrganismos, sugerindo um efeito modulador (SALVA *et al.*, 2014).

No entanto, para Moura *et al.* (2016), ratos *Wistar* tratados com *L. acidophilus* La-5 não apresentaram alterações significativas nas contagens de células sanguíneas, embora tenha sido observada uma redução nos parâmetros bioquímicos em relação aos níveis de triglicerídeos e colesterol LDL e aumento do colesterol HDL. Além disso, 15 dias de suplementação promoveram aumento nos valores de expressão da enzima superóxido dismutase (SOD). No entanto, os valores de glutathione peroxidase (GPX) e CAT não diferiram entre os grupos.

A análise do perfil bioquímico, geralmente está correlacionada à estudos que avaliam distúrbios metabólicos induzidos (como diabetes mellitus e obesidade, por exemplo) e, com protocolos que avaliam níveis de citotoxicidade (como fármacos, substâncias bioativas e metais pesados) (OU *et al.*, 2012; DI CERBO *et al.*, 2016; MCCUNE *et al.*, 2017), não sendo comumente associada à modelos de imunossupressão.

Com relação à avaliação dos marcadores bioquímicos, camundongos BALB/c saudáveis e obesos, suplementados com *L. casei* CRL 431, apresentaram níveis séricos reduzidos de colesterol total e fracionado apenas nos animais obesos, mantendo-se inalterados no grupo saudável (NÚÑES *et al.* 2014).

Bubnov *et al.* (2017), ao comparar os efeitos hipocolesterolêmicos da suplementação em camundongos BALB/c com *L. casei* IMV B-7280, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMV B-7281, *B. animalis* VKL e *B. animalis* VKB, separadamente ou em combinação, verificaram que a redução significativa nos níveis de colesterol total dos animais obesos em relação ao controle foi cepa dependente, sendo o *L. casei* IMV B-7280, o microrganismo que apresentou maior eficácia.

O efeito hipocolesterolêmico dos probióticos, tem sido associado à assimilação da molécula de colesterol pela membrana celular do microrganismo e/ou à produção da enzima sal biliar hidrolase (LE; YANG, 2019; LIANG *et al.*, 2020). No presente estudo, ao longo do tempo, foi demonstrado que os níveis de colesterol total diminuíram significativamente em todos os grupos; e, essa influência observada no metabolismo lipídico, pode estar associada aos resultados obtidos na análise histológica do tecido hepático, onde foi evidenciado que os animais suplementados com CSL3 não apresentaram sinais de lipidose, diferentemente do que foi observado nos animais do grupo controle e CF.

Quanto a análise da expressão gênica em esplenócitos dos camundongos, os dados obtidos para as citocinas TNF- α , NF- $\kappa\beta$ e IL-23, sugerem que os animais do grupo LC tiveram respostas mais expressivas do que os animais submetidos à quimioterapia.

Segundo Di Cerbo *et al.* (2016), bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem atuar como potenciais adjuvantes na resposta imune sistêmica, por induzir a produção de Interferon- γ (INF- γ), expressão de citocinas e aumento da citotoxicidade de células *natural killer* (NF). No entanto, para que ocorra o efeito imunomodulador desejado, esses microrganismos precisam resistir às barreiras impostas pela passagem pelo trato gastrointestinal (como pH ácido e presença de enzimas) e, também, serem capazes de aderir à mucosa intestinal do hospedeiro, sendo este último, um fator determinante para melhorar as funções da barreira intestinal (PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019).

A IL-4, que pode inibir a ativação de macrófagos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, é um potente indutor de diferenciação de células dendríticas; antagoniza os efeitos do IFN- γ e regula sua expressão (MOSMANN; COFFMAN,

1989). A IL-23, por outro lado, é produzida por células dendríticas, expressa por células T, regula a produção de IL-17 (Th17), pode ativar vias de sinalização semelhantes à IL-12 e desempenha um papel vital na defesa contra bactérias extracelulares na patogênese de doenças autoimunes e distúrbios autoinflamatórios intestinais (alguns deles previamente atribuídos à IL-12) (WATFORD *et al.*, 2004; HUE *et al.*, 2006; NEURATH, 2019).

As implicações da resposta imune *in vivo* e *in vitro* à suplementação com Nanometric *L. plantarum* nF1 foram avaliadas por Choi *et al.* (2018). Durante o estudo, os animais foram imunossuprimidos com CFF e suplementados com doses baixas (10^9 UFC.kg⁻¹) e altas (10^{10} UFC.kg⁻¹) do microrganismo. Os autores observaram que o efeito obtido foi dose-dependente, pois apenas a administração de altas doses da bactéria foi capaz de induzir aumento da resposta imune inata (IL-12 e TNF- α) e adaptativa (IFN- γ), ambas na medula óssea e nos esplenócitos.

Quanto aos efeitos mediadores do TNF- α , além de induzir ciclicamente a secreção de diversas interleucinas e quimiocinas, pode ativar diretamente o NF-kB, afetando a captação celular de glicose, desencadeando resistência à insulina e elevando a glicemia (FREITAS *et al.*, 2014).

Além disso, independentemente do estímulo, a ativação do NF-kB pode estar correlacionada com o estresse oxidativo, uma vez que esse fator de transcrição tem sido referido como regulador de processos imunológicos e inflamatórios (LEVIN; DJURDJEV, 2012; WADA; MAKINO, 2013). Os valores obtidos para a transcrição relativa desta citocina, corroboram com os resultados obtidos no presente estudo para a análise do estresse oxidativo visto que a resposta do NF-kB ao estímulo com *L. casei* CSL3 nos grupos tratados com CFF foi significativamente menor, enquanto que, da mesma forma, dentre os parâmetros (TBARs e CAT) e os órgãos (rins, fígado e cérebro) analisados, apenas os valores de CAT nos rins dos animais dos grupos LC, CF e LCCF foram significativamente menores, indicando a ocorrência de estresse oxidativo naquele órgão.

A produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante os processos metabólicos desencadeia o desenvolvimento de mecanismos de

defesa antioxidantes capazes de controlar os níveis de ERO produzidos, evitando assim a indução de dano oxidativo (TRIPATHI; JENA, 2010).

Estudo realizado por El-Sheikh; Rifaai (2014), em ratos *Wistar* com hepatotoxicidade induzida por ciclofosfamida, observaram redução da atividade das enzimas SOD, CAT, GPX e glutathione-S-transferase (GST), aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), aumento do nível da citocina pró-inflamatória TNF- α , além de processos inflamatórios e necrose de hepatócitos no fígado, indicando um estado pró-oxidante nos animais. Resultados diferentes foram observados por Yadav *et al.* (2018), em estudo com ratos *Wistar*, onde foi verificado aumento significativo da atividade da enzima CAT nos rins e de CAT e SOD no fígado de animais tratados com dieta rica em lipídeos e *L. fermentum* MTCC. Portanto, diferentes causas podem desencadear o estresse oxidativo; no entanto, a terapia probiótica tornou-se um fator cada vez mais influente para ajudar a reduzi-lo (CHEN *et al.*, 2013).

O efeito dos microrganismos probióticos no restabelecimento do equilíbrio homeostático e na regulação da composição da microbiota intestinal tem sido relatado por pesquisadores como um mecanismo de ação essencial na modulação da saúde do hospedeiro em inúmeras situações clínicas, surgindo como complemento na elaboração e adoção de novas estratégias de promoção da saúde (DIDARI *et al.*, 2014; GEORGIEV; GEORGIEVA, 2015; MILANI *et al.*, 2016; BAJIC *et al.*, 2018; MARTÍN; LANGELLA, 2019; BUSTAMANTE *et al.*, 2020).

No entanto, a diversidade da microbiota pode estar associada a fatores como estilo de vida, dieta, idade, presença de doenças crônicas não transmissíveis e uso contínuo de medicamentos, por exemplo (MARION-LETELLIER *et al.*, 2016; BUSTAMANTE *et al.*, 2020).

Segundo dados obtidos por Viaud *et al.* (2013), a eficácia antineoplásica da ciclofosfamida está diretamente correlacionada com a composição da microbiota, pois, ao transferir as células pTh17 (patogênicas T helper), o efeito imunomodulador do fármaco foi restaurado. No presente estudo, as contagens bacterianas de BALRB nas amostras de fezes dos animais que foram tratados com CFF e receberam CSL3 (LCCF) foram, significativamente, maiores do que

as observadas nos outros grupos, o que pode estar relacionado à sua capacidade de adesão e, de atuarem como antagonistas contra microrganismos patógenos, resultados observados *in vitro* por Vitola *et al.* (2018). Corroborando com os resultados obtidos com *L. casei* CSL3 no presente estudo, Nambiar *et al.* (2018), também observaram um aumento de 1 ciclo logarítmico ao suplementar camundongos Swiss com *L. plantarum* HM47.

A avaliação dos aspectos histopatológicos do dano ou recuperação tecidual é essencial para a visualização da integridade das membranas (ARRIETA *et al.*, 2006). No presente estudo, a suplementação com *L. casei* CSL3 não desencadeou danos aos órgãos avaliados, indicando segurança em sua administração na dosagem de 10^{10} UFC.mL⁻¹. Da mesma forma, foram observadas alterações apenas no fígado dos animais dos grupos controle e CF, demonstrando que os grupos que receberam o microrganismo não apresentaram sinais de inflamação e lipidose hepática, sugerindo que a associação de CSL3 com a dieta fornecida *ad libitum* beneficiou os animais, pois os protegeu das alterações celulares observadas nos animais dos grupos que não foram suplementados com a bactéria.

Oliveira *et al.* (2018), em camundongos BALB/c tratados com *L. fermentum* TcUESC01 e *L. plantarum* TcUESC02 e desafiados com *S. Typhimurium*, encontraram redução dos focos inflamatórios no fígado e redução da altura das vilosidades no intestino dos animais desafiados com o patógeno após a administração dos microrganismos. Do mesmo modo, ao administrar diferentes concentrações da combinação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11, *Lactocaseibacillus casei* Zhang e *Lactiplantibacillus plantarum* P8, Ma *et al.* (2023), observaram que em comparação aos animais que receberam ciclofosfamida, o grupo suplementado com os probióticos apresentou aumento significativo na quantidade de células caliciformes e redução nas lesões das vilosidades intestinais por meio do aumento da relação altura das vilosidades/profundidade da cripta, sugerindo que o uso de probióticos pode melhorar a integridade intestinal.

7.5 Conclusão

A administração de *Lacticaseibacillus casei* CSL3 na dose de 10 log UFC.mL⁻¹, foi considerada segura para os animais saudáveis e em modelo de imunossupressão com ciclofosfamida, pois não houve mortalidade entre os grupos, mesmo com ocorrência dos efeitos deletérios desencadeados pelo fármaco, desempenhando assim, um fator de proteção nestes animais, indicando que é possível a administração dessa cepa nestas condições fisiológicas. Em relação ao efeito imunomodulador observado, a suplementação aumentou o leucograma e os níveis de expressão gênica das citocinas IL-23, TNF- α e NF- κ B além de demonstrarem um aumento na concentração de BAL e BALRB nas fezes em 1 ciclo logarítmico. Não houve alteração significativa nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados e os valores de colesterol total foram significativamente reduzidos ao longo do período do experimento assim como, o CLS3 protegeu os animais da ocorrência de alterações hepáticas (lipidose), em relação aos grupos não suplementados. Fica evidenciado que o microrganismo além de seguro, apresenta potencial probiótico devido seu efeito imunomodulador e influência no metabolismo lipídico. Ademais, recomendamos a prospecção de outros benefícios do *L. casei* CSL3, em protocolos que utilizem diferentes dosagens, períodos de administração e patologias.

7.6 Material complementar

Tabela S1. Primers utilizados na avaliação da expressão gênica de IL-4, IL-23, TNF- α e NF κ B, extraídos de esplenócitos de camundongos

Gene	Polaridade	Sequência dos primers (5'-3')	Referências
IL-4	Sense	CCAAGGTGCTTCGCATATT	Liu et al., 2009 Ávila et al., 2016
	Antisense	ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT	
IL-23	Sense	CCAGCAGTCCTCTCGGAATC	
	Antisense	GATTCATATGTCCCGCTGGTG	
TNF	Sense	TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA	
	Antisense	ACAGGGGAGAAATCGATGACA	
NF κ B	Sense	ATGTAGGGAACCTGCTCTG	

	Antisense	CTCAGAGCATCCCTACATC
GAPDH	Sense	AACGACCCCTTCTCATTGAC
	Antisense	TCCACGACATACTCAGCACT
B-actin	Sense	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
	Antisense	CAATAGTGATGACCTGGCCGT

556

557

558 **Tabela S2.** Concentração de catalase renal de animais tratados com *L. casei*
 559 CSL3 e ciclofosfamida.

Grupos	Catalase rim (UCAT.mg ⁻¹ de tecido)
Controle	1,59 ± 0,39 ^a
CF	0,26 ± 0,14 ^b
LC	0,31 ± 0,19 ^b
LCCF	0,52 ± 0,29 ^b

560 Média ± desvio padrão seguida de letras diferentes na mesma coluna, indicam
 561 diferença significativa pelo teste de Bonferroni (p < 0,05). CF: ciclofosfamida; CL:
 562 *L. casei* CSL3; LCCF: *L. casei* CSL3+ciclofosfamida.

563

564

565

566

567

568

569

570

571

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, através de uma investigação *online*, realizada em todas as regiões brasileiras, foi possível identificar a percepção e o perfil de consumo de sorvetes em uma parcela da população onde, a maioria dos participantes se enquadrava na faixa etária de 21 a 30 anos, a média de consumo é de 1 a 3 vezes/mês, sendo a região norte a que apresenta maior frequência de consumo e, os sabores chocolate e morango, os que apresentaram maior índice de preferência. Além disso, foi possível observar a intenção de compra dos consumidores tendo em vista vez que, mesmo considerando o sorvete uma guloseima, sendo um produto não saudável devido sua composição, houve interesse a respeito do consumo de sorvetes para dietas restritivas, sendo a opção sem lactose a resposta mais prevalente. Assim, foi evidenciado que, de uma forma geral, a população está preocupada com os benefícios à saúde que os alimentos consumidos podem proporcionar, sendo este um potencial foco para alavancar o consumo de sorvetes funcionais e, o desenvolvimento industrial do setor.

A respeito da elaboração do sorvete funcional, foi evidenciado que o sorvete é uma matriz alimentar adequada para a suplementação com o microrganismo *Lactocaseibacillus casei* CSL3, pois proporcionou a manutenção da viabilidade sob armazenamento e, teve efeito protetor para com o microrganismo, durante a simulação ao trato gastrointestinal. Além do mais, a formulação de sorvete potencialmente probiótico sem lactose com gengibre e mel, apresentou qualidade nutricional e valores elevados de compostos antioxidantes correspondendo a um produto funcional, outrossim pelo excelente índice de aceitabilidade (> 95%) e intenção de compra (> 96%) obtidos da avaliação sensorial, indica que o produto possui alto potencial de mercado.

Em relação ao estudo *in vivo*, foi observado que a suplementação dos animais com *Lactocaseibacillus casei* CSL3 foi segura, tanto para os animais saudáveis quanto para os imunossuprimidos, não havendo mortalidade entre os grupos e resposta imunológica negativa, indicando que esse microrganismo pode ser administrado nessas condições fisiológicas sem agravar o quadro desencadeado pelo fármaco. Ainda, a suplementação promoveu um aumento no

leucograma, nas concentrações de bactérias ácido-láticas resistente à bile presentes nas fezes e, protegeu o tecido hepático de lipidose. Porém, os parâmetros oxidativos e bioquímicos não foram influenciados, significativamente. Os resultados indicam que o *Lactocaseibacillus casei* CLS3 além de seguro, apresentou efeito imunomodulador e sobre o metabolismo de lipídeos.

Entretanto, sugere-se que mais estudos devam ser realizados com CSL3, com avaliação de outros índices metabólicos e fisiológicos, através da administração de diferentes doses, períodos de exposição e patologias, no intuito de melhor elucidar o potencial probiótico da bactéria, uma vez que, os efeitos e mecanismos de ação dos probióticos, por serem dose e cepa dependentes podem apresentar resultados distintos conforme o protocolo utilizado e, sua adequada avaliação, permitirá a prospecção de seus efeitos benéficos no hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121- 126. 1984.
- ABIS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE SORVETES. **Sorvete**. 2008. Disponível em: <[http:// www.abis.com.br/estat.asp](http://www.abis.com.br/estat.asp)>. Acesso em: 19 maio 2023.
- ABRAHAM, P., RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Redox report**, v.16, n.1, p.8-14, 2011.
- AKCA, S., AKPINAR, A. The Effects of Grape, pomegranate, Sesame Seed Powder and Their Oils on Probiotic Ice Cream: Total phenolic contents, antioxidant activity and probiotic viability, **Food Bioscience**, 42:101203. 2021.
- AKINTUNDE, T.Y., MUSA, T.H., MUSA, H.H., MUSA, I.H., CHEN, S., IBRAHIM, E. *et al*. Bibliometric analysis of global scientific literature on effects of COVID-19 pandemic on mental health. **Asian J Psych** 63: 102753. 2021.
- ALI L., BADRELDIN H. *et al*. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): A review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p.409-420, 2008.
- ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.D.C.B. MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 2005. v. 28(1), p. 118-29.
- ALVES, C.S.J., FLORIANO, S.A.M., VOLTARELLI, V.P., RENSIS, C.M.V.B., PIMENTE, T.C., COSTA, G.N., *et al*. Effect of carbonation and probiotic addition on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of whey dairy beverage. **Journal of Dairy Research**, DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029920000291> 2020.
- ALVES, A.B., SANTOS-JUNIOR, W.F., FARIA, W.C.S., NASCIMENTO, E., LANZARIN, M., SIQUEIRA, P.B., *et al*. Development, characterization, and shelf-life of lactose-free artisan ice cream produced with different bases, **Research, Society and Development**, v.10, n.9, e3210912712. 2021.
- AMARETTI, A., DI NUNZIO, M., POMPEI, A., RAIMONDI, S., ROSSI, M., BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities. **Applied microbiology Biotechnology**, v.97, p.809–817, 2013.
- AMES, C.W., da CUNHA, K.F., VITOLA, H.R.S., HACKBART, H.C.S., SANCHES-FILHO, P.J., CRUXEN, C.E.S. *et al*. Evaluation of potentially probiotic *Lactobacillus casei* CSL3 immobilized on oats and applied to yogurt production. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.00, e15803. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15803>. 2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 266, de 22 de setembro 2005. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de gelados comestíveis e, preparados para gelados comestíveis, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis**. Diário

- 673 Oficial da União. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Agência Nacional de
674 Vigilância Sanitária, 2005.
- 675 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Para Instrução**
676 **Processual De Petição De Avaliação De Probióticos Para Uso Em**
677 **Alimentos**. ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 2, de 21 de maio de 2021.
678 Brasília, DF: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária,
679 2021.
- 680 AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of**
681 **analysis** (18th ed). Gaithersburg, M.D, USA 2006.
- 682 APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of**
683 **Foods** (4th ed.), Washington, DC, USA. American Public Health Association
684 (APHA) 2002.
- 685 ARAGÓN, F., CARINO, S., PERDIGÓN, G., DE LEBLANC, A.M. The
686 administration of milk fermented by the probiotic *Lactobacillus casei* CRL 431
687 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model.
688 **Immunobiology**, v.219, p.457–464. 2014.
- 689 ARAGON-ALEGRO, L.C., ALEGRO, J.H.A., CARDARELLI, H.R., CHIU, M.C.,
690 SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food**
691 **Science and technology**, v.40, p.669-675, 2007.
- 692 ARRIETA, M. C., BISTRITZ, L., MEDDINGS, J.B. Alterations in Intestinal
693 Permeability. **Gut**. V.55:1512-1520, 2006.
- 694 ARSEN'EVA, T.P., JAKOVLEVA, J.U.A., MAKSOVA, R.M., ORAZBEK, A.O.
695 Low lactose level creamy ice-cream for diabetics. Nauchnyj zhurnal NIU ITMO.
696 Serija **"Processy i apparaty pishhevyh proizvodstv"**, v.1, p.1–7 (in Russian)
697 2012.
- 698 ARSLANER, A., SALIK, M.A., ÖZDEMİR, S., AKKÖSE, A. Yogurt ice cream
699 sweetened with sucrose, stevia and honey: some quality and thermal
700 properties. **Czech Journal of Food Sciences**, v.37 n.6 p.446-455 ref.33. 2019.
- 701 ASHWIN, K., PATTANAIK, A.K., HOWARTH, G.S. Polyphenolic bioactives as
702 an emerging group of nutraceuticals for promotion of gut health: A review. **Food**
703 **Bioscience**, 44:101376. 2021.
- 704 ASIOLI, D., ASCHEMANN-WITZEL, J., CAPUTO, V., VECCHIO, R.,
705 ANNUNZIATA, A., NÆS, T., *et al.* Making sense of the "clean label" trends: A
706 review of consumer food choice behavior and discussion of industry
707 implications. **Food Research International**, v.99, p.58–71. 2017.
- 708 AVILA, L.F.D.C., DE LEON, P.M.M., DE MOURA, M.Q., BERNE, M.E.A.,
709 SCAINI, C.J. & LEIVAS LEITE, F.P. Modulation of IL-12 and IFN γ by probiotic
710 supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice.
711 **Parasite Immunology**, v.38, p.326–330. <https://doi.org/10.1111/pim.12314>
712 2016.
- 713 ÁVILA, B.P, ROSA, P.P., FERNANDES, T.A., CHESINI, R.G., SEDREZ, P.A.,
714 OLIVEIRA, A.P.T. *et al.* Analysis of the perception and behaviour of consumers
715 regarding probiotic dairy products. **Intern Dairy J**, 104703. 2020.
- 716 AYENI, F.A., SÁNCHEZ, B., ADENIYI, B.A., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G.,
717 MARGOLLES, A., RUAS-MADIEDO, P. Evaluation of the functional potential of

- 718 *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional
719 fermented foods and cow's intestine. **International Journal of Food**
720 **Microbiology**, v.147, n.2, p.97–104. 2001.
- 721 BABOOTA, R.K., BISHNOI, M., AMBALAM, P., KONDEPUDI, K.K., SARMA,
722 S.M., BOPARAI, R.K. *et al.* Functional food ingredients for the management of
723 obesity and associated comorbidities - A review. **J of Func Foods** 5: 997-1012.
724 2013.
- 725 BADARÓ, A.C.L., GUTTIERRES, A.P.M., REZENDE, A.C.V., STRINGHETA,
726 P.C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana –
727 parte 1. **Nutrir Gerais – Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga-MG, v.2, n.3,
728 p.1-20. 2008.
- 729 BADGELEY, A., ANWAR, H., MODI, K., MURPHY, P., LAKSHMIKUTTYAMMA,
730 A. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic
731 perspectives, **BBA - Reviews on Cancer**, v.1875, n.1,
732 <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188494>. 2021.
- 733 BAJIC, J.E., JOHNSTON, I.N., HOWARTH, G.S., HUTCHINSON, M.R. From
734 the Bottom-Up: Chemotherapy and Gut-Brain Axis Dysregulation. **Front. Behav.**
735 **Neurosci.** v.12, n.104. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00104 2018.
- 736 BALTHAZAR, C.F., SILVA, H.L.A., ESMERINO, E.A., ROCHA, R.S., MORAES,
737 J., CARMO, M.A.V. *et al.* The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in
738 sheep milk ice cream, **Food Chemistry**, DOI:
739 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.002>. 2018.
- 740 BAMESHKI, A., NAMAIEE, M.H., JANGJOO, A., DADGARMOGHADDAM, M.,
741 GHALIBAF, M.H.E., GHORBANZADEH, A. *et al.* Effect of oral ginger on
742 prevention of nausea and vomiting after laparoscopic cholecystectomy: a
743 double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Electron Physician**. v.25,
744 n.10(2), p.6354-6362. DOI: 10.19082/6354. 2018.
- 745 BAMPI, S.R. **Avaliação da Atividade Antioxidante dos Probióticos**
746 ***Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi***. 2015. Dissertação
747 (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em
748 Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas,
749 2015.
- 750 BANDYOPADHYAY M., CHAKRABORTY R., RAYCHAUDHURI, U. A process
751 for preparing a natural antioxidant enriched dairy products (Sandesh). **LWT -**
752 **Food Science and Technology**, v.40, p.842-851. 2007.
- 753 BARNETT, V., LEWIS, T. **Outliers in statistical data**. 3rd edition, John Wiley &
754 Sons, Chichester, 584 p., 1994.
- 755 BATISTA, R.A.B., ASSUNÇÃO, D.C.B., PENAFORTE, F.R.O., JAPUR, C.C.
756 Lactose em alimentos industrializados: avaliação da disponibilidade da
757 informação de quantidade. **Cien. Saude Colet.**, 23:4119-4128. 2018.
- 758 BEDADA, T.L., FETO, T.K., AWOKE, K.S., GAREDEW, A.D., IAFAT, F.T.,
759 BIRRI, D.J. Probiotics for cancer alternative prevention and treatment.
760 **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.129, 110409. 2020.
- 761 BELLINAZO, P.L., VITOLA, H.R.S., CRUXEN, C.E.S., BRAUN, C.L.K.,
762 HACKBART, H.C.S., SILVA, W.P., *et al.* Probiotic butter: Viability of

- 763 *Lactobacillus casei* strains and bixin antioxidant effect (*Bixa orellana* L.).
 764 **Journal of Food Processing and Preservation**, e14088. DOI:
 765 <https://doi.org/10.1111/jfpp.14088>. 2019.
- 766 BONOMO, M.G., RICCIARDI, A., SALZANO, G. Influence of autochthonous
 767 starter cultures on microbial dynamics and chemical-physical features of
 768 traditional fermented sausages of Basilicata region. **World Journal**
 769 **Microbiology Biotechnology**, v.27, p.137–146. 2011.
- 770 BORGONOV, T.F., CASAROTTI, S.N.; PENNA, A.L.B. *Lactocaseibacillus casei*
 771 SJRP38 and buriti pulp increased bioactive compounds and probiotic potential
 772 of fermented milk. **LWT – Food Science and Technology**, DOI:
 773 10.1016/j.lwt.2021.111124. 2021.
- 774 BOULAY, J.L., O'SHEA, J.J., PAUL, W.E. Molecular Phylogeny within Type I
 775 Cytokines and Their Cognate Receptors. **Immunity**, v.19, p.159-163. (2003).
- 776 BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a Free Radical
 777 method to evaluate antioxidant activity. **LWT**, v.28, p.25-30. 1995.
- 778 BRAZIL. Resolution nº 266, of 22 of september 2005. **Technical regulation for**
 779 **fixing the identity and quality of edible ice creams and, preparations for**
 780 **edible ice creams, powders for the preparation and bases for edible ice**
 781 **creams.** (Portuguese). In Official Diary of the Union, Brasília, DF: Ministry of
 782 Health, National Health Surveillance Agency 2005.
- 783 BRASIL. Ministério da Saúde. **Glossário temático controle de câncer:**
 784 **projeto de terminologia da saúde.** Brasília, 2013.
- 785 BRAZIL. Ministry of Health. Health Care Department. Department of Primary
 786 Care. **Brazilian regional foods** / Ministry of Health, Department of Health
 787 Care, Department of Primary Care. – 2. ed. – Brasília: Ministry of Health, 2015.
- 788 BRAZIL. Normative Instruction Nº 161, of 01 of July of 2022. **Establishes the**
 789 **microbiological standards for food** (Portuguese). In Official Diary of the
 790 Union, Brasília, DF: Ministry of Health, National Health Surveillance Agency
 791 2022.
- 792 BRAZILIAN ASSOCIATION OF INDUSTRIES AND THE ICE CREAM
 793 SECTOR. **Series on the Production and Consumption of Ice Cream in**
 794 **Brazil** (portuguese). Available in: <<https://www.abis.com.br/mercado/>> Acess
 795 in: Jan 2023. 2021.
- 796 BUBNOV, R.V., BABENKO, L.P., LAZARENKO, L.M., MOKROZUB, V.V.,
 797 DEMCHENKO, O.A., NECHYPURENKO, O.V., *et al.* Comparative study of
 798 probiotic effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* strains on cholesterol levels,
 799 liver morphology and the gut microbiota in obese mice. European Association
 800 for Predictive, **Preventive and Personalised Medicine (EPMA)** DOI
 801 10.1007/s13167-017-0117-3. 2017.
- 802 BUJALANCE, C., MORENO, E., JIMENEZ-VALERA, M., RUIZ-BRAVO, A. A
 803 probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in
 804 immunologically intact and immunocompromised mice. **International journal of**
 805 **food microbiology**, v. 13, p.28–34, 2007.
- 806 BULLOCK, K., LAHNE, J., POPE, L. Investigating the Role of Health Halos and
 807 Reactance in Ice Cream Choice. **Food Quality and Prefer**, 103826. 2019.

- BURGAIN, J., SCHER, J., FRANCIUS, G., BORGES, F., CORGNEAU, M., REVOL-JUNELLES, A.M., *et al.* Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.213, p.21–35. 2014.
- BUSSE, M., SIEBERT, R. The role of consumers in food innovation processes. **Eur J of Innovation Management**, v.21, p.20-43. 2018.
- BUSTAMANTE, M., OOMAH, B.D., OLIVEIRA, W.P., BURGOS-DÍAZ, C., RUBILAR, M., SHENE, C. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. **Folia microbiologica**. v.65, n.2, p.245–264. 2020.
- CHEN, L., LIU, W., LI, Y., LUO, S., LIU, Q., ZHONG, Y., *et al.* *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process. **International Immunopharmacology**, v.17, p.108-115, 2013.
- CALAÇA, P.R.A., BEZERRA, R.P., ALBUQUERQUE, W., PORTO, A., CAVALCANTI, M. Probiotics as a preventive strategy for surgical infection in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Translational gastroenterology and hepatology**, v.2, n.67. DOI: <https://doi.org/10.21037/tgh.2017.08.01> 2017.
- CALIXTO-LIMA, L., MARTINS, E.A., GOMES, A.P., GELLER, M., SIQUIERA-BATISTA, R. Dietetic management in gastrointestinal complications from antimalignant chemotherapy. **Nutrición y Hospitalaría**, v.27, n.1, p.65-75, 2012.
- CARREIRO, D.M. **Glúten, toxicidade, reações e sintomas**. 1. ed. São Paulo: Vida e consciência Ltda. 224 p. 2013.
- CASO, D., GUIDETTI, M., CAPASSO, M., CAVAZZA, N. Finally, the chance to eat healthily: Longitudinal study about food consumption during and after the first COVID-19 lockdown in Italy. **Food Quality and Prefer**, v.95, 104275. 2022.
- CASTRO, V.M.R., LUCHESE, R.H. Antidiabetogenic mechanisms of probiotic action in food matrices: A review. **PharmaNutrition**, 100302. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100302> 2022.
- CELI, P., COWIESON, A.J., FRU-NJI, F., STEINERT, R.E., KLUENTER, A.M., VERLHAC, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science Technology**, v.234, p.88-100. 2017.
- CHAMCHAN, R., SINCHAIPANIT, P., DISNIL, S., JITTINANDANA, S., NITITHAMYONG, A., ON-NOM, N. Formulation of reduced sugar herbal ice cream using lemongrass or ginger extract. **British Food Journal**, v.119 n.10. 2017.
- CHAMPAGNE, C.P., GARDNER, N.J., ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.61–84. 2005.
- CHAMPAGNE, C.P., CRUZ, A.G., DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v.22, p.160–166. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.008>. 2018.

- 853 CHAPLIN, D.D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and**
 854 **Clinical Immunology**, v.125, S3–S23.
 855 <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980> 2010.
- 856 CHAVES, G., ANHESINI, C. **Ingredients from Brazil** (portuguese). Academia
 857 Brasileira de Arte, Cultura e História, São Paulo, 2014.
- 858 CHEN, C.C., LIN, W.C., KONG, M.S., SHI, H.N., WALKER, W.A., LIN, C.Y., et
 859 al. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses
 860 tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal
 861 tissue, **Brazilian Journal of Nutrition**, v.107, p.1623–1634. 2012.
- 862 CHEN, Y., PEREZ-CUETO, J.A.F., GIBOREAU, A., MAVRIDIS, I., HARTWELL,
 863 H. Consumer preferences for the use of an innovative digital menu solution in
 864 public food service settings in four European countries. **Food Quality and**
 865 **Prefer**, v.94, 104324. 2021.
- 866 CHOI, D., JUNG, S.Y., KANG, J., YOUNG-DO N.A.M., LIM, S., KIM, K.T.,
 867 Immune-Enhancing Effect of Nanometric *Lactobacillus plantarum* nF1 (nLp-
 868 nF1) in a Mouse Model of Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression. **J.**
 869 **Microbiol. Biotechnol.** v.28, n.2, p.218–226,
 870 <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09024> 2018.
- 871 CIAPPINI, M.C., GATTI, M.B., DI VITO, M.V. El color como indicador de
 872 contenido de flavonoides en miel. **Revista De Ciencia Y Tecnología**. v.19, n.1,
 873 p.59–63. 2013.
- 874 CIE. Commission International De L'eclairage. **Colorimetry – Part 4**. In
 875 International Standards. ISO/CIE 11664-4: 2019(E) 2019 Available in:
 876 <<https://cie.co.at/publications/international-standards>>. Access in: 04 set. 2022.
- 877 COOK, A.D., et al. Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain.
 878 **Trends in immunology**, Oxford, v.39, n.3, p.240-255, 2018.
- 879 COSTA, A.I.A., JONGEN, W.M.F. New insights into consumer-led food product
 880 development. **Trends in Food Sci & Tech**, v.17, p.457-465. 2006.
- 881 COSTA, E.S., VARAVALLA, M.A. Probióticos e prebióticos: relações com a
 882 imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC**. v.4, n.2, 2011.
- 883 COSTA, G.M., PAULA, M.M., BARÃO, C.E., KLOSOSKI, S.J., BONAFÉ, E.G.,
 884 VISENTAINER, J.V., et al. Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and
 885 sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality
 886 parameters and probiotic survival. **International Dairy Journal**, v.97, p.139-
 887 148. 2019
- 888 COUSIN, F.J., LYNCH, S.M., HARRIS, H.M., MCCANN, A., LYNCH, D.B.,
 889 NEVILLE, B.A., et al. Detection and Genomic Characterization of Motility in
 890 *Lactobacillus curvatus*: Confirmation of Motility in a Species outside the
 891 *Lactobacillus salivarius* Clade. **Applied and Environmental Microbiology**,
 892 v.81, n.4, p.1297–1308. 2015.
- 893 CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by
 894 probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens.
 895 **FEMS Immunol. Medical Microbiol.** v.34, p.245-253. DOI: 10.1111/j.1574-
 896 695X.2002.tb00632.x 2002.

- 897 CRUXEN, C.E.S., HOFFMANN, J.F., ZANDONÁ, G.P., FIORENTINI, A.M.,
898 ROMBALDI, C.V., CHAVES, F.C. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream:
899 Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of
900 *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT – Food Science and Technology**,
901 DOI: 10.1016/j.lwt.2016.09.011. 2016.
- 902 CRUZ, A.G., ANTUNES, A.E.C., SOUSA, A.L.O.P., FARIA, J.A.F., SAAD,
903 S.M.I. Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Research International**,
904 v.42, p.1233-1238. 2009.
- 905 CUNHA, L.R. **Efeito da levedura *Pichia pastoris* sobre parâmetros**
906 **imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos Swiss**
907 **submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida**. 2016. 99 p. Dissertação
908 (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós-graduação em
909 Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas,
910 Pelotas, 2016.
- 911 CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214–220.
912 2011.
- 913 D'ACQUISTO, M., MAY, M.J., GHOSH, S. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B
914 (NF- κ B): An emerging theme in anti-inflammatory therapies. **Mol Interv**, v.2,
915 n.1, p.22-35. 2002.
- 916 DABAGHZADEH, F., KHALILI, H., DASHTI-KHAVIDAKI, S. Ginger for
917 prevention or treatment of drug-induced nausea and vomiting. **Curr Clin**
918 **Pharmacol**. v.9, n.4, p.387-94. DOI: 10.2174/1574884708666131111205736.
919 2014.
- 920 DANTAS, A.B., JESUS, V.F., SILVA, S., ALMADA, C.N., ESMERINO, E.A.,
921 CAPPATO, L.P., *et al.* Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with
922 *Lactobacillus casei* Zhang. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.1, p.1-13. DOI:
923 10.3168/jds.2015-9880. 2016.
- 924 DAE-WOON, C., SUN, Y.J., JISU, K., YOUNG-DO, N., SEONG-IL, L., KI, T.K.,
925 *et al.* Immune-Enhancing Effect of Nanometric *Lactobacillus plantarum* nF1
926 (nLp-nF1) in a Mouse Model of Cyclophosphamide-Induced
927 Immunosuppression. **Journal of Microbiological and Biotechnology**, v.28,
928 n.2, p.218–226. 2018.
- 929 DAVIDSON, R.H., DUNCAN, S.E., HACKNEY, C.R., EIGEL, W.N., BOLING,
930 J.W. Probiotic culture survival and implication in fermented frozen yogurt
931 characteristic. **Journal of dairy Science**, v.83, p.666-673. 2000.
- 932 DAS, P., KHOWALA, S., BISWAS, S. “*In vitro* probiotic characterization of
933 *Lactobacillus casei* isolated from marine samples.” **LWT – Food Science and**
934 **Technology**, v.73, p.383-390. 2016.
- 935 DAW, E., HARTEL, R.W. Fat destabilization and melt-down of ice creams with
936 increased protein content. **International Dairy Journal**, v.43, p.33-41. 2015.
- 937 DEMIRCI, T., AKTAS, K., SOZERI, D., OZTURK, H.I., AKIN, N. Rice bran
938 improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits.
939 **Journal of Functional Foods**, v.36, p. 396-403. DOI: 10.1016/j.jff.2017.07.019.
940 2017.

- 941 DERTLI, E., TOKER, O.S., DURAK, M.Z., YILMAZ, M.T., TATLISU, N.B.,
 942 SAGDIC, O., *et al.* Development of a fermented ice-cream as influenced by in
 943 situ exopolysaccharide production: Rheological, molecular, microstructural and
 944 sensory characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.136, p.427-440. 2016.
- 945 DI CERBO, A., PALMIERI, B., APONTE, M., MORALES-MEDINA, J.C.,
 946 LANNITTI, T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. **J Clin**
 947 **Pathol**, v.69, p.187–203. 2016.
- 948 DI CRISCIO, T., FRATIANNI, A., MIGNOGNA, R., CINQUANTA, L., COPPOLA,
 949 R., SORRENTINO, E., *et al.* Production of functional probiotic, prebiotic, and
 950 synbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.10, p.4555-4564. 2010.
- 951 DIDARI, T., SOLKI, S., MOZAFFARI, S., NIKFAR, S., ABDOLLAHI, M. A
 952 systematic review of the safety of probiotics. **Expert Opin Drug Saf.** v.13,
 953 p.227–239. 2014.
- 954 DIMITRELLOU, D., KANDYLIS, P., PETROVIĆ, T., DIMITRIJEVIĆ-
 955 BRANKOVIĆ, S., LEVIĆ, S., *et al.* Survival of spray dried microencapsulated
 956 *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and
 957 fermented milk, **LWT - Food Science and Technology**, v.71, p.169-174,
 958 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.007>. 2016.
- 959 DINIZ, C.G., ARANTES, R.M., CARA, D.C., LIMA, F.L., NICOLI, J.R.,
 960 CARVALHO, M.A.R., *et al.* Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the
 961 *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes**
 962 **Infect**, v.5, p.19–26. 2003.
- 963 DIVYASHREE, S., ANJALI, P.G., SOMASHEKARAI, R., SREENIVASA,
 964 M.Y. Probiotic properties of *Lactobacillus casei*-MYSRD 108 and *Lactobacillus*
 965 *plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella*
 966 *paratyphi*. **Biotechnology Reports**, v.32, e00672.2021.
- 967 DORON, S., SNYDMAN, D.R. Risk and safety of probiotics. **Clinical Infectious**
 968 **Diseases**, v.60, S129–S134. <https://doi.org/10.1093/cid/civ085> 2015.
- 969 DOU. Diário Oficial da União. **Resolução Normativa nº 33, de 18 de**
 970 **novembro de 2016.** "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em
 971 instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro
 972 de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino
 973 ou Pesquisa Científica. Conselho Nacional de Controle de Experimentação
 974 Animal. Brasil, 2016.
- 975 EL-AZIZ, M.A., MOHAMED, S.H.S., SELEET, F.L. Production and evaluation of
 976 soft cheese fortified with ginger extract as a functional dairy food. **Polish**
 977 **Journal of Food and Nutrition Sciences**. v.62, n.2, p.77-83. 2012.
- 978 EL-SALAM, M.H.A., EL-SHIBINY, S. Preparation and properties of milk
 979 proteins-based encapsulated probiotics: a review. **Dairy Science &**
 980 **Technology**, v.95, p.393-412. DOI: 10.1007/s13594-015-0223-8. 2015.
- 981 EL-SHEIKH, A.A.K., RIFAAI, R.A. Peroxisome Proliferator Activator Receptor
 982 (PPAR)-gamma Ligand, but Not PPAR-alpha, Ameliorates Cyclophosphamide-
 983 Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver. **PPAR Research**, DOI:
 984 10.1155/2014/626319. 2014.

- 985 ELPO, E.R.S. **Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*)**
 986 **no Estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da**
 987 **qualidade**. 2004. 179p. Dissertação (Mestrado-Área de concentração em
 988 Produção Vegetal) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo,
 989 Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- 990 ELPO, E.R.S., NEGRELLE, R.R.B., *Zingiber officinale Roscoe*: Aspectos
 991 bptânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1. p.27-32. 2004.
- 992 EMADI, A., JONES, R.J., BRODSKY, R.A. Cyclophosphamide and cancer:
 993 golden anniversary. **Nature reviews clinical oncology**, v.6, p.638-647. 2009.
- 994 EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Gengibre**. Série
 995 Plantas Medicinais. Folder 12. Embrapa Rondônia, 2001.
- 996 EMBRAPA. **Dairy consumption in the pandemic. Main changes in the**
 997 **behavior of Brazilian consumers of milk and dairy products during the**
 998 **Covid-19 pandemic** (portuguese). Siqueira, KB, Rocha, DT, Diniz, FH,
 999 Carvalho, GR, Chaves, DO. Embrapa Dairy Cattle. Technical circular 126. 1^a
 1000 ed. On-line, 2021.
- 1001 EZZAT, S.M., EZZAT, M.I., OKBA, M.M., MENZE, E.T., ABDEL-NAIM, A.B. The
 1002 hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale Rosc.*) potent *in vivo* and
 1003 *in vitro* anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.214,
 1004 p.113–123. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.019> 2018.
- 1005 FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health
 1006 Organization FAO/ WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of**
 1007 **probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**.
 1008 2001, p. 34. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>
 1009 Acesso em: 7 outubro 2021.
- 1010 FABER, J., VAN LIMPT, K., KEGLER, D., LUIKING, Y., GARSSSEN, J., VAN
 1011 HELVOORT, A., *et al.* Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific
 1012 Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia.
 1013 **Nutrition and Disease**, p.1292-1298. 2011.
- 1014 FDA. US Food and Drug Administration. **Generally Recognized as Safe**
 1015 **(GRAS)**. [online]. Disponível em: [https://www.fda.gov/food/food-ingredients-](https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras)
 1016 [packaging/generally-recognized-safe-gras](https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras) Acesso em: July, 2023. 2023.
- 1017 FANG, Z., HONGFEI, Z., JUNYU, Z., DZIUGAN, P., SHANSHAN, L., BOLIN, Z.
 1018 Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from
 1019 traditional Chinese cheese. **Annals of Microbiology**, v.65, p.1419-1426. 2014.
- 1020 FARIAS, T.G.S., LADISLAU, H.F.L., STAMFORD, T.C.M., MEDEIROS, J.A.C.,
 1021 SOARES, B.L.M., ARNAUD, T.M.S., *et al.* Viabilities of *Lactobacillus*
 1022 *rhannosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or
 1023 encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. **LWT**
 1024 **– Food Science and Technology**, v.100, p.391–396. 2019.
- 1025 FAVARIN, L., LAUREANO-MELO, R., LUCHESE, R.H. Survival of free and
 1026 microencapsulated *Bifidobacterium*: effect of honey addition. **Journal of**
 1027 **Microencapsulation**, v.32, n.4, p.329-335. 2015.
- 1028 FAZILAH, N.F., ARIFF, A.B., KHAYAT, M.E., RIOS-SOLIS, L., HALIM, M.
 1029 Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on

- 1030 the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v.48, p.387–
1031 399. 2018.
- 1032 FERDINANDI, D.M., FERREIRA, A.A. Agentes alquilantes: reações adversas e
1033 complicações hematológicas. **AC & Científica**, v.1, p.1-12, 2009.
- 1034 FERREIRA, A.L., ROCHA, C.P.R., VIEIRA, L.M., DUSSE, L.M.S.,
1035 JUNQUEIRA, D.R.G., CARVALHO, M.G.C. Alterações hematológicas induzidas
1036 por medicamentos convencionais e alternativos. **Rev. Bras. Farm.** v.94, n.2,
1037 p.94-101, 2013.
- 1038 FERNANDES, M.V., SILVA, D.S., CASTRO, C.C., CORRÊA, R.A., VARGAS,
1039 G.A., FISCHER, G., *et al.* Avaliação da citotoxicidade do peptídeo
1040 antimicrobiano P34. **Science and Animal Health**, v.1, n.1, p.2-10. 2013.
- 1041 FIGUEROA-GONZALEZ, I., QUIJANO, G., RAMIREZ, G., CRUZ-GUERRERO,
1042 A. Probiotics And Prebiotics – Perspectives And Challenges. **Journal of the**
1043 **Science of Food and Agriculture**, v.91, p.1341-1348. 2011.
- 1044 FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021a. **Food & Beverages / Ice cream**
1045 **Market. Ice cream Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, By**
1046 **Type, Flavor, Packaging, Distribution Channel and Regional Forecast,**
1047 **2020-2027.** p. 200. 2021. Disponível em:
1048 <<https://www.fortunebusinessinsights.com/ice-cream-market-104847>> Acesso
1049 em: 05 set. 2021.
- 1050 FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Ice cream Market Size, Share & COVID-19**
1051 **Impact Analysis, By Type, Flavor, Packaging, By Distribution Channel and**
1052 **Regional Forecast, 2020-2027.** In Food & Beverages/Ice cream Market 200p.
1053 2021b Available in: <[https://www.fortunebusinessinsights.com/ice-cream-](https://www.fortunebusinessinsights.com/ice-cream-market-104847)
1054 [market-104847](https://www.fortunebusinessinsights.com/ice-cream-market-104847)> Access in: 05 sep. 2022.
- 1055 FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Food & Beverages / Ice cream Market. Ice**
1056 **cream Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, By Type, (Impulse**
1057 **ice cream and take home), Flavor (Vanilla, chocolate, fruit and others),**
1058 **Packaging (Cup, cone, stick, brick, tub and others), Distribution Channel**
1059 **(Hypermarket/supermarket, ice cream parlor, online retailer and others)**
1060 **and Regional Forecast, 2021-2028.** Market research report p. 200. 2022.
1061 Available in: <[https://www.fortunebusinessinsights.com/ice-cream-market-](https://www.fortunebusinessinsights.com/ice-cream-market-104847)
1062 [104847](https://www.fortunebusinessinsights.com/ice-cream-market-104847)> Access in: March, 2023.
- 1063 FREITAS, M.C., CESCHINI, F.L., RAMALLO, B.T. Insulin resistance associated
1064 with obesity: anti-inflammatory effects of physical exercise. **R Bras Ci Mov**,
1065 v.22, n.3, p.139-47. 2014.
- 1066 FUGELSANG, K., EDWARDS, C.G. **Wine microbiology: practical**
1067 **applications and procedures.** 2.ed. Nova Iorque: Springer, 394p. 2007.
- 1068 FURMAN, D., DAVIS, M.M. New approaches to understanding the immune
1069 response to vaccination and infection. **Vaccine**, Guildford, v.33, n.40, p.5271–
1070 5281, 2015.
- 1071 GABBI, D.K., BAJWA, U., GORAYA, R.K. Physicochemical, melting and
1072 sensory properties of ice cream incorporating processed ginger (*Zingiber*
1073 *officinale*). **International Journal of Dairy Technology**. v.71, n.1, p.190-197.
1074 2018.

- 1075 GADANI, S.P., CRONK, J.C., NORRIS, G.T., KIPNIS, J. Interleukin-4: A
1076 Cytokine to Remember. **The Journal of Immunology**, v.189, n.9, p.4213–
1077 4219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>. Interleukin-4 2013.
- 1078 GÄNZLE, M.G., HAASE, G., JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and
1079 value-added derivatives, **International Dairy Journal**, v.18, p.685-694. 2008
- 1080 GARCIA, M.T., CANAMERO, M.M., LUCAS, R., OMAR, N.B., PULIDO, R.P.,
1081 GÁLVEZ, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced
1082 by *Enterococcus faecalis* EJ97. **International Journal Food Microbiology**,
1083 v.90, n.2, p.161-170. 2004.
- 1084 GENEROSO, S.V., RODRIGUES, N.M., TRINDADE, L.M., PAIVA, N.C.,
1085 CARDOSO, V.N., CARNEIRO, C.M., *et al.* Dietary supplementation with
1086 omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids**
1087 **Health Dis.** v.14, n.54. doi:10.1186/s12944-015-0052-z. 2015.
- 1088 GEORGIEV, K., GEORGIEVA, M. Antiproliferative effect of bulgarian spring
1089 water probiotics (laktera nature probiotic®) against human colon carcinoma cell
1090 line. **World J Pharm Pharm Sci.** v.4, p.130–136. 2015.
- 1091 GOFF, H.D. HARTEL, R.W. **Ice Cream and Frozen Desserts**. In: HUI, Y. H.
1092 Handbook of Food Science, Technology, and Engineering. New York: Taylor &
1093 Francis Group, cap. 154. 2006.
- 1094 GOMES, D.E., MENDES, L.T., BASTOS, K.P.L., POVOA, H.C.C., ARÊDES,
1095 E.M. Detecção de microrganismos em sorvetes fabricados e comercializados
1096 no município de Muriaé-Mg e região. **Revista Científica da FAMINAS –**
1097 **Muriaé**, v.2, n.1, sup.1, p.35. 2006.
- 1098 GONÇALVES, V.S., SANTOS, F.D.S., SANTOS JUNIOR, A.G., PIRAINÉ,
1099 R.E.A., RODRIGUES, P.R.C., BRASIL, C.L., *et al.* Recombinant bovine IL17A
1100 acts as an adjuvant for bovine herpesvirus vaccine. **Research in Veterinary**
1101 **Science**, v.136, p.185-191. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.02.014> 2021.
- 1102 GÓRSKA, A., PRZYSTUPSKI, D., NIEMCZURA, M.J., KULBACKA, J. Probiotic
1103 Bacteria: A Promising Tool in Cancer Prevention and Therapy. **Curr. Microbiol.**
1104 v.76, p.939-949. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01679-8>. 2019.
- 1105 GOUDA, A.S., ADBELRUHMAN, F.G., ALENEZI, H.S., MÉGARBANE, B.
1106 Theoretical benefits of yogurt-derived bioactive peptides and probiotics in
1107 COVID-19 patients – A narrative review and hypotheses, **Saudi Journal**
1108 **Biological Sciences**, Article 06046. 2021.
- 1109 GRANATO, D., NAZZARO, F., PIMENTEL, T.C., ESMERINO, E.A., da CRUZ,
1110 A.G. Probiotic food development: An updated review based on technological
1111 advancement. **Reference Module in Food Science**. DOI:
1112 <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22271-3>. 2018.
- 1113 GREMBECKA, M. Sugar alcohols—their role in the modern world of
1114 sweeteners: a review. **European Food Research and Technology**, v.241,
1115 p.1–14. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2437-7> 2015.
- 1116 GRÜTZMANN, L.S. **Efeito do probiótico *Saccharomyces boulardii* sobre**
1117 **parâmetros imunológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em um**
1118 **modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com**
1119 **ciclofosfamida em camundongos Swiss**. 2017, 63p. Dissertação (Mestrado

- em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1145 p. 2017.
- HAAN, J.M.M., ARENS, R., ZELM, M.C. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells, **Immunology Letters**, v.162, n.2, Part B, p.103-112, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.011>. 2014.
- HAMMES, W.P. HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. **The Prokaryotes**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, p.320–406. 2006.
- HAN, S.K., SHIN, Y.J., LEE, D.Y., KIM, K.M., YANG, S.J., KIM, D.S., *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* HDB1258 modulates gut microbiota-mediated immune response in mice with or without lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. **BMC Microbiology**, v.21, n.1, p.1–15. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02192-4> 2021.
- HANAFI, F.N.A., KAMARUDIN, N.A., SHAHARUDDIN, S. Influence of coconut residue dietary fiber on physicochemical, probiotic (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) survivability and sensory attributes of probiotic ice cream, **LWT**, v.154, 112725. 2022.
- HE, X.G., BERNART, M.W., LIAN, L.Z., LIN, L.Z. High performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of pungent constituents of ginger. **J. Chromatography**, v.796, p.327-334.1998.
- HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G.R., MERENSTEIN, D.J., POT, B., *et al.* 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**, v.11, n.8, p.506, 2014.
- HOMAYOUNI, A., AZIZI, A., JAVADI, M., MAHDIPOUR, S., EJTAHED, H. Factors influencing probiotic survival in ice cream: a review. **International Journal of Dairy Science**, v.7, n.1, p.1-10. 2012.
- HUANG, Y., ADAMS, M.C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n.3, p.253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>. 2004.
- HUE, S., AHERN, P., BUONOCORE, S., KULLBERG, M.C., CUA, D.J., MCKENZIE, B.S., *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. **Journal of Experimental Medicine**. v.203, n.11, p.2473–83. doi:10.1084/jem.20061099 2006.
- INABA, J., PRADO, F.C., THOMAZ-SOCCOL, V., SOCCOL, C.R., KAUR BRAR, S., DE DEA LINDNER, J. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v.12, p.489–497. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.020> 2014.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Manual de boas práticas: exposição ao risco químico na central de quimioterapia:**

- 1165 **conceitos e deveres**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da
1166 Silva; Rio de Janeiro, 2015.
- 1167 INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Tratamento**
1168 **do câncer**. Disponível em:
1169 <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso
1170 em: 19 de maio de 2023.
- 1171 ISO. International Organization for Standardization. **Sensory analysis —**
1172 **methodology—general guidance for conducting hedonic tests with**
1173 **consumers in a controlled area**. ISO 11136. 2014 Technical Committee:
1174 ISO/TC 34/SC 12 Sensory analysis. ISO Editorial Manager: Perou, N. Argentine
1175 Institute of Normalización y Certificación – IRAM.
- 1176 IWASAKI, A., MEDZHITOV, R. Review: Regulation of adaptative immunity by
1177 the innate immune system. **Science**, v.327, p.291-295. 2010.
- 1178 JANSSEN, K.L., DANKBAAR, B. Proactive involvement of consumers in
1179 innovation: selecting appropriate techniques. **Intern J of Innovation**
1180 **Management**, v.12, p.511-541. 2008.
- 1181 JASKULKA, F., SMITH, D., LARNTZ, K., Comparison of the predictive ability of
1182 ice cream freezing point depression equations. **Milchwissenschaft**, v.48, p.671–
1183 675. 1993.
- 1184 JONES, R.M. **Chapter 9 - The Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus***
1185 ***paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health**. Editor(s):
1186 Martin H. Floch, Yehuda Ringel, W. Allan Walker, The Microbiota in
1187 Gastrointestinal Pathophysiology, Academic Press, p.99-108, DOI:
1188 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00009-4>. 2017.
- 1189 JUSTINO, P.F.C., MELO, L.F.M., NOGUEIRA, A.F., COSTA, J.V.G. Treatment
1190 with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the
1191 gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice.
1192 **British Journal of Nutrition**, v.111, p.1611–21. 2014.
- 1193 KANG, Y., KANG, X., YANG, H., LIU, H., YANG, X., LIU, Q., *et al.* *Lactobacillus*
1194 *acidophilus* ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota
1195 dysbiosis and intestinal permeability. **Pharmacological Research**, v.175,
1196 106020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106020> 2022.
- 1197 KANNO, T.Y.N., SENSIAE, L.A., PAULA, N.A., SALLES, M.J.S. Toxic effects
1198 of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male
1199 mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.2. 2009.
- 1200 KARAFFOVÁ, V., MUDROŇOVÁ, D., MAD'AR, M., HRČKOVÁ, G., FAIXOVÁ,
1201 D., GANCARČÍKOVÁ, S., *et al.* Differences in immune response and
1202 biochemical parameters of mice fed by kefir milk and *Lactobacillus*
1203 *paracasei* isolated from the kefir grains. **Microorganisms**, v.9, n.4.
1204 <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040831> 2021.
- 1205 KAREEM, K.Y., LING, F.H., CHWEN, L.T., FOONG, O.M., ANJAS ASMARA, S.
1206 Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum*
1207 using reconstituted media supplemented with inulin. **Gut Pathogens**, v.6, n.1,
1208 p.1–7. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-23>. 2014.

- 1209 KEMGANG, T.S., KAPILA, S., SHANMUGAM, V.P., KAPILA, R. Cross-talk
1210 between probiotic lactobacilli and host immune system. **Journal of Applied**
1211 **Microbiology**, v.117, n.2, p.303–319. <https://doi.org/10.1111/jam.12521> 2014.
- 1212 KING, S.C., MEISELMAN, H.L., CARR, T.B. Measuring emotions associated
1213 with foods: Important elements of questionnaire and test design. **Food Quality**
1214 **and Prefer**, v.28, p.8-16. 2013.
- 1215 KLAJN, V.M., AMES, C.W., da CUNHA, K.F., LORINI, A., HACBART, H.C.S.,
1216 SANCHES-FILHO, P.J., *et al.* Probiotic fermented oat dairy beverage: viability
1217 of *Lactobacillus casei*, fatty acid profile, phenolic compound content and
1218 acceptability. **Journal of Food Science and Technology**, DOI:
1219 <https://doi.org/10.1007/s13197-021-04973-1>. 2021.
- 1220 KLU, Y.A.K., CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics
1221 during simulated gastrointestinal passage. **LWT – Food Science and**
1222 **Technology**, v.62, p.983–988. 2015.
- 1223 KOEFERLI, C.R.S., PICCINALI, P., SIGRIST, S., The influence of fat sugar and
1224 non-fat milk solids on selected taste, flavor and texture parameters of a vanilla
1225 ice cream. **Food Qual. Prefer.** v.7, p.69–79. 1996.
- 1226 KOENDERMAN, L., BUURMAN, W., DAHA, M.R. The innate immune
1227 response, **Immunology Letters**, v.162, n.2, Part B, p.95-102,
1228 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.010>. 2014.
- 1229 KORCZ, E., KERÉNYI, Z., VARGA, L. Dietary fibers, prebiotics, and
1230 exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits
1231 with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food Functional**, v.20, n.9,
1232 p.3057-3068. DOI: 10.1039/c8fo00118a. 2018.
- 1233 KOTHARI, D., PATEL, S., KIM, S. Probiotic supplements might not be
1234 universally effective and safe: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**,
1235 v.111, p.537-547, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.104>. 2019.
- 1236 KOZŁOWICZ, K., GÓRAL, M., GÓRAL, D., PANKIEWICZ, U., BRONOWICKA-
1237 MIELNICZUK, U. Effect of ice cream storage on the physicochemical properties
1238 and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions, **LWT**,
1239 116:108562. 2019.
- 1240 KRAUS, A. Development of functional food with the participation of the
1241 consumer. Motivators for consumption of functional products. **Intern J Consum**
1242 **Stud**, v.39, p.2-11. 2014.
- 1243 KRUMREICH, F.D., SEIFERT, M., SANTOS, R.B., GULARTE, M.A.
1244 Consumers' Impression of Minimally Processed Gala Apples Using Word
1245 Association. **J of Food Sci** v.84, p.2955-2960. 2019.
- 1246 KÜSTER-BOLUDAA, I., VIDAL-CAPILLA, I. Consumer attitudes in the election
1247 of functional foods. **Spanish J of Marketing**, v.21, p.65-79. 2017.
- 1248 KYUNGWHA, L., AZLIN, M. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria*
1249 *monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by
1250 cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. **Food Microbiology**,
1251 v.24, n.1, p.89- 94. 2007.
- 1252 LAMOUNIER, M.L., ARAÚJO, R.A.B.M., LAMOUNIER, M.L., MORZELLE, M.C.
1253 Desenvolvimento de sorvete enriquecido com fibras de linhaça e Lactobacilos

- 1254 vivos e sua viabilidade. **Revista Instituto Laticínios “Cândido Tostes”**, v.387,
1255 n.67, p.57-63. 2012.
- 1256 LE, B., YANG, S.H. Identification of a Novel Potential Probiotic *Lactobacillus*
1257 *plantarum* FB003 Isolated from Salted-Fermented Shrimp and its Effect on
1258 Cholesterol Absorption by Regulation of NPC1L1 and PPAR α . **Probiotics and**
1259 **Antimicrobial Proteins**, v.11, n.3, p.785–793. [https://doi.org/10.1007/s12602-](https://doi.org/10.1007/s12602-018-9469-9)
1260 018-9469-9 2019.
- 1261 LENOIR, M., DEL CARMEN, S., CORTES-PEREZ, N.G., LOZANO-OJALVO,
1262 D., MUÑOZ-PROVENCIO, D., CHAIN, F. *et al.* *Lactobacillus casei* BL23
1263 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated
1264 colorectal cancer, **Journal of Gastroenterology**, v.51. p.862–873. 2016.
- 1265 LEVIN, A., DJURDJEV, O. On being better kidney doctors: understanding
1266 trajectories, probabilities, predictability, and people. **Am J Kidney Dis.** v.59,
1267 n.4, p.475-477. 2012.
- 1268 LIANG, X., LV, Y., ZHANG, Z., YI, H., LIU, T., LI, R., YU, Z., & ZHANG, L.
1269 Study on intestinal survival and cholesterol metabolism of probiotics. **LWT Food**
1270 **Science and Technology**, v.124, 109132.
1271 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109132> 2020.
- 1272 LIN, W.Y., LIN, J.H., KUO, Y.W., CHIANG, P.F.R., HO, H.H. Probiotics and
1273 their Metabolites Reduce Oxidative Stress in Middle-Aged Mice. **Current**
1274 **Microbiology**, v.79, n.4, p.1–12. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02783-y>
1275 2022.
- 1276 LINN, Y.H., THU, K.K., WIN, N. Effect of Probiotics for the Prevention of Acute
1277 Radiation-Induced Diarrhoea Among Cervical Cancer Patients: a Randomized
1278 Double-Blind Placebo-Controlled Study. **Probiotics Antimicrob. Proteins.**
1279 v.11, p.638–647. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9408-9>. 2019.
- 1280 LIU, W., OUYANG, X., YANG, J., LIU, J., LI, Q., GU, Y., *et al.* AP-1 Activated by
1281 Toll-like Receptors Regulates Expression of IL-23 p19. **Journal of Biological**
1282 **Chemistry**, v.284(36), p. 24006-24016 2009.
- 1283 LOLLO, P.C.B., CRUZ, A.G., MORATO, P.N., MOURA, C.S., CARVALHO-
1284 SILVA, L.B., OLIVEIRA, C.A.F., *et al.* Probiotic cheese attenuates exercise-
1285 induced immune suppression in Wistar rats. **J. Dairy Sci**, v.95, p.3549–3558.
1286 2012.
- 1287 MA, W., LI, W., YU, S., BIAN, H., WANG, Y., JIN, Y., ZHANG, Z., MA, Q.,
1288 HUANG, L. Immunomodulatory effects of complex probiotics on the immuno-
1289 suppressed mice induced by cyclophosphamide. **Front. Microbiol.** v.14,
1290 1055197. doi: 10.3389/fmicb.2023.1055197 2023.
- 1291 MAASSEN, C.B., VAN HOLTEN-NEELEN, C., BALK, F., DEN BAK-
1292 GLASHOUWER, M.J., LEER, R.J., LAMAN, J.D., *et al.* Strain-dependent
1293 induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus*
1294 strains. **Vaccine**. v.18, p.2613-2623. Doi: 10.1016/s0264410x(99)00378-3
1295 2000.
- 1296 MACHADO, T.A.D.G., OLIVEIRA, M.E.G., CAMPOS, M.I.F., ASSIS, P.O.A.,
1297 SOUZA, E.L., MADRUGA, M.S., *et al.* Impact of honey on quality characteristics

- 1298 of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*, **LWT**, v.80, p.221-
1299 229. 2017.
- 1300 MACHADO, M.R., SOCCOL, C.R. Current Developments in Probiotics. **Journal**
1301 **of Microbial & Biochemical Technology**, v.07, n.01, p.11–20.
1302 <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000175> 2015.
- 1303 MADUREIRA, A.R., AMORIM, M., GOMES, A.M., PINTADO, M.E., MALCATA,
1304 F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to
1305 simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44,
1306 p.465-470. 2011.
- 1307 MAJAMAA, H., ISOLAURI, E. Probiotics: A novel approach in the management
1308 of food allergy, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.99, n.2, p.179-
1309 185, [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70093-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70093-9). 1997.
- 1310 MAJID, I., NAYIK, G.A., DAR, S.M., Nanda, V. Novel food packaging
1311 technologies: Innovations and future prospective. **Journal of the Saudi**
1312 **Society of Agricultural Sciences**, v.17, n.4, p.454–462.
1313 <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.003> 2018.
- 1314 MANI-LÓPEZ, E., PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage
1315 stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic
1316 acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.2578-2590. 2014.
- 1317 MARCIANA, M.V., MARCIANO, M.V., RAUECKER, U.N., COELHO, K.O.
1318 Consumo e acesso de produtos lácteos sem lactose. **Rev Uningá**, v.56, p.58-
1319 65. 2019.
- 1320 MARINELLI, L., TENORE, G.C., NOVELLINO, E. Probiotic species in the
1321 modulation of the anticancer immune response. **Seminars in Cancer Biology**,
1322 v.46, p.182–190. 2017.
- 1323 MARION-LETELLIER, R., SAVOYE, G., GHOSH, S. IBD: In Food We Trust.
1324 **Journal of Crohn's and Colitis**. v.10, n.11, p.1351–1361. 2016.
- 1325 MARKS, B.R. *et al.* Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-
1326 producing T cells that can regulate peripheral inflammation. **Nature**
1327 **immunology**, New York, v.10, n.10, p.1125–1132, 2019.
- 1328 MAROOF, H., HASSAN, Z.M., MOBAREZ, A.M., MOHAMADABADI, M.A.
1329 *Lactobacillus acidophilus* could modulate the immune response against breast
1330 cancer in murine model, **J. Clin. Immunol.** v.32, p.1353–1359. 2012.
- 1331 MARSHALL, R.T. **Frozen Desserts**. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. Applied
1332 Dairy Microbiology. 2nd. New York: Marcel Dekker, cap. 4. p.93-125. 2001.
- 1333 MARSHALL, R.T. GOFF, H.D. HARTEL, R.W. **Ice cream**. 6th ed. New York:
1334 Kluwer Academic/Plenum Publ., 366p. 2003.
- 1335 MARSHALL, J.S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology.
1336 **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, Hamilton, v.14, n. 49, p.1-10, 2018.
- 1337 MARTÍN, R., LANGELLA, P. Emerging Health Concepts in the Probiotics Field:
1338 Streamlining the Definitions. **Frontiers and Microbiology**, v.10, 1047. 2019.
- 1339 MARTINEZ, R.C.R., AYNAOU, A.E., ALBRECHT, S., SCHOLS, H.A.,
1340 MARTINIS, E.C.P., ZOETENDAL, E.G., *et al.* *In vitro* evaluation of
1341 gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and

- combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.152–158. 2011.
- MERIKA, M., WILLIAMS, A.J., CHEN, G., COLLINS, T., THANOS, D. Recruitment of CBP/p300 by the INFB enhance some is required for synergistic activation of transcription. **Mol Cell**, v.1, n.2, p.277-287. 1988.
- MITROPOULOU, G., NEDOVIC, V., GOYAL, A., KOURKOUTAS, Y. Immobilization technologies in probiotic food production. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p.1–15. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/716861>. 2013.
- MIZOCK, A.B. Probiotics. **Disease a month**. v.61, p.259-290. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.03.011> 2015.
- MOGENSEN, G., SALMINEN, S., O'BRIEN, J., OUWEHAND, A., HOLZAPFEL, W.H., SHORTT, C., *et al.* Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Montreal, v.377, p.4-9. 2003.
- MOHANIA, D., NAGPAL, R., KUMAR, M., BHARDWAJ, A., YADAV, M., JAIN, S., *et al.* Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v.9, n.4, p.190-198. 2008.
- MOJGANI, N., HUSSAINI, F., VASEJI, N. Characterization of indigenous lactobacillus strains for probiotic properties. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.8, p.17523. 2015.
- MOORE, L.E., STEWART, P.H., SHAZO, R.D. Food allergy: What we know now. **Amer J of the Med Sci**, v.353, p.353-366. 2017.
- MORIANO, M.E., ALAMPRESE, C. Honey, trehalose and erythritol as sucrose-alternative sweeteners for artisanal ice cream. A pilot study. **LWT – Food Science and Technology**. v.75, p.329-334. 2017.
- MOSER, M., MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. **Nature Immunology**, v.1, p.199-205, 2000.
- MOZAFFARI-KHOSRAVI, H., NADERI, Z., DEHGHAN, A., NADJARZADEH, A., HUSEINI, H.F. Effect of Ginger Supplementation on Proinflammatory Cytokines in Older Patients with Osteoarthritis: Outcomes of a Randomized Controlled Clinical Trial, **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, v.35:3, p.209-218, DOI: 10.1080/21551197.2016.1206762 2016.
- MCCUNE, W.J., MACR, M.D., CLOWSE, M.B. General principles of the use of cyclophosphamide in rheumatic diseases. **UpToDate**. Disponível em: https://www.uptodate.com/contents/general-principles-of-the-use-of-cyclophosphamide-in-rheumatic-diseases?source=search_result&search=ciclofosf amida&selectedTitle=5~150. Acesso em: 7 outubro de 2022.
- MENG, Y., WANG, J., WANG, Z., ZHANG, G., LIU, L., HUO, G., LI, C. *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0318 Ameliorates Impaired Intestinal Immunity and Metabolic Disorders in Cyclophosphamide-Treated Mice. **Frontiers of Microbiology**, v.10, p.731. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00731 2019.
- MILANI, C., FERRARIO, C., TURRONI, F., DURANTI, S., MANGIFESTA, M., VAN SINDEREN, D., *et al.* The human gut microbiota and its interactive

- connections to diet. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. v.29, n.5, p.539-546. 2016.
- MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Function**, v.5, p.1113-1124. 2014
- MIYAMOTO, M., MATSUZAKI, K., KATAKURA, M., HARA, T., TANABE, Y., SHIDO, O. Oral intake of encapsulated dried ginger root powder hardly affects human thermoregulatory function but appears to facilitate fat utilization. **Int. J. Biometeorol.** v.59, p.1461–1474. DOI: 10.1007/s00484-015-0957-2 2015.
- MORIANO, M.E., ALAMPRESE, C. Honey, trehalose and erythritol as sucrose-alternative sweeteners for artisanal ice cream. A pilot study, **LWT**, v.75, p.329-334. 2017
- MOURA, C.S., LOLLO, P.C.B., MORATO, P.N., ESMERINO, E.A., MARGALHO, L.P., SANTOS-JUNIOR, V.A., *et al.* Assessment of antioxidant activity, lipid profile, general biochemical and immune system responses of Wistar rats fed with dairy dessert containing *Lactobacillus acidophilus* La-5, **Food Research International**, v.90, p.275-280, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.042>. 2016.
- MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol** v.7, p.145–173. 1989.
- MUÑOZ, O., COPAJA, S., SPELSKY, H., PENÃ, R., MONTENEGRO, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Química Nova**, v.30, n.4, p.848-851, 2007.
- MUSE, M.R., HARTEL, R.W. Ice cream structural elements that affect melting rate and firmness. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.1, p.1-10. 2004.
- NAKAMURA, T., KAMOGAWA, Y., BOTTOMLY, K., FLAVELL, R.A. Polarization of IL-4 and IFN-gama producing CD4+ T cell. **Journal Immunology**, v.158, p.1085-1094, 1997.
- NAMBIAR, R.B., SELLAMUTHU, P.S., PERUMAL, A.B. Development of milk chocolate supplemented with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* HM47 and to determine the safety in a Swiss albino mice model. **Food Control**, v.94, p.300–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.024> 2018.
- NARCIZO, J., XIMENEZ, L., SUMITA, T., SANTOS, S., SILVIA, C., LEAO, M. Influência do consumo de *Lactobacillus rhamnosus* nos níveis séricos de IgG e contagem de leucócitos de ratos SPF recém desmamados. **Revista Biociências**, v.20, n.1. 2014.
- NASCIMENTO, M.S., MORENO, I., KUAYE, A.Y. Bacteriocins in food: a review. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.120–127. 2008.
- NAZIR, Y., HUSSAIN, S.A., ABDUL HAMID, A., SONG, Y. Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, High serum cholesterol, and allergic and HIV diseases. **Biomed Res. Int.** p.1–17. 2018.
- NELSON, D.L., MCEVOY, C.L., DENNIS, S. What is free association and what does it measure? **Memory and Cognition** v.28, p.887-899. 2018

- 1430 NEURATH, M.F. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer,
1431 **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.45, p.1-8,
1432 <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.12.002>. 2019.
- 1433 NIKHAT, S., FAZIL, M. History, phytochemistry, experimental pharmacology
1434 and clinical uses of honey: A comprehensive review with special reference to
1435 Unani medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.282, n.10, 114614. 2022.
- 1436 NIVETHA, A., MOHANASRINIVASAN, V. Mini review on role of β -galactosidase
1437 in lactose intolerance. IOP Conference Series: **Materials Science and**
1438 **Engineering**, 263, 022046. doi: 10.1088/1757-899x/263/2/022046 2017.
- 1439 NOUSIA, F.G., ANDROULAKIS, P.I., FLETOURIS, D.J. Survival of
1440 *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence
1441 on sensory acceptability. **International Journal of Dairy Technology**, v.63,
1442 n.1, p.1-7. 2001.
- 1443 NUNES, C.P., RODRIGUES, C.C., CARDOSO, C.A.F., CYTRYNBAUM, N.,
1444 KAUFMAN, R., RZETELNA, H., *et al.* Clinical Evaluation of the Use of Ginger
1445 Extract in the Preventive Management of Motion Sickness. **Current**
1446 **Therapeutic Research**. v.92. 100591. 2020.
- 1447 NÚÑEZ, I.N., GALDEANO, C.M., MORENO, L.B.A., PERDIGÓN, G. Evaluation
1448 of immune response, microbiota and blood markers after probiotic bacteria
1449 administration in obese mice induced by a high fat diet. **Nutrition**, DOI:
1450 10.1016/j.nut.2014.03.025. 2014.
- 1451 OKAWA, H., NOBUKO, A., YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal
1452 tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analitical Biochemistry**, v.95, p.351-
1453 358. 1979.
- 1454 OKKELS, S.L., BREDIE, W.L.P., KLAUSEN, T.W., BECK, A.M. An investigation
1455 into between-meal food desires among hospitalized haematological cancer
1456 patients. **Clinical Nutrition**, v.35, n.2, p.440–445. DOI:
1457 10.1016/j.clnu.2015.03.010 2016.
- 1458 OLIVEIRA, J.S., COSTAB, K., ACURCIOB, L.B., SANDESB, S.H.C.,
1459 CASSALIC, G.D., UETANABAROD, A.P.T., *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation
1460 of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation
1461 (*Theobroma cacao* L.) **Journal of Functional Foods**, v.47, p.184-191.
1462 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.055> 2018.
- 1463 ORDÓÑEZ, J.A., RODRÍGUEZ, M.I.C., ÁLVAREZ, L.F., SANZ, M.L.G.,
1464 MINGUILLÓN, G.D.G.F., PERALEZ, L.H., *et al.* **Tecnología de alimentos**.
1465 Porto Alegre: Artmed, v.2, 2009.
- 1466 ORTIZ, Y., GARCÍA-AMÉZQUITA, E., ACOSTA, C.H., SEPÚLVEDA, D.R.
1467 **Functional dairy products**. In G. Barbosa-Cánovas (Ed.). Global food security
1468 and wellness (pp. 67–103). New York: Springer 2017.
- 1469 OU, C.C., CHIU, Y.H., LIN, S.L., CHANG, Y.J., HUANG, H.Y., LIN, M.Y.
1470 Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative
1471 Stress from tert-Butyl Hydroperoxide. **Journal of food and drug analysis**,
1472 v.20, n.1, p.101-110, 2012.
- 1473 OZTURK, H.I., DEMIRCI, T., AKIN, N. Production of functional probiotic ice
1474 creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: The comparison of

- 1475 the prebiotic potentials on *Lactobacillus casei* 431 and functional
1476 characteristics. **LWT – Food Science and Technology**, v.90, p.339-345. 2018.
- 1477 PALMIERI, B.N., MOULATLET, E.M., BUSCHINELLI, L.K.O., PINTO-E-SILVA,
1478 M.E.M. Food acceptance and its association with cancer treatments symptoms
1479 in patients of a specialized clinic. **Cadernos De Saúde Coletiva**, v.21, n.1, p.2–
1480 9. DOI:10.1590/S1414-462X2013000100002 2013.
- 1481 PANDIYAN, C., ANNAL-VILLI, R., KUMARESAN, G., MURUGAN, B.,
1482 RAJARAJAN, G. Effect of incorporation of inulin on the survivability of
1483 *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic ice cream. **International Food Research**
1484 **Journal**, v.19, n.4, p.1729-1732. 2012.
- 1485 PAPADOPOULOU, O.S., ARGYRI, A.A., VARZAKIS, E.E., TASSOU, C.C.,
1486 CHORIANOPOULOS, N.G. Greek functional Feta cheese: Enhancing quality
1487 and safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential, **Food**
1488 **Microbiology**, v.74, p.21-33. 2018.
- 1489 PATRA, K., BOSE, S., SARKAR, S., RAKSHIT, J., JANA, S., MUKHERJEE, A.,
1490 *et al.* Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and
1491 oxidative stress by cinnamic acid. **Chemico-biological interactions**, v.195,
1492 p.231–239. 2012.
- 1493 PAUL W.E., ZHU J. How are T(H)2-type immune responses initiated and
1494 amplified? **Nat Rev Immunol**, v.10, p.225-235. <https://doi.org/10.1038/nri2735>
1495 2010.
- 1496 PERCIE DU SERT, N., AHLUWALIA, A., ALAM, S., AVEY, M.T., BAKER, M.,
1497 BROWNE, W.J., *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration
1498 for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLoS Biol**, v.18, n.7, e3000411.
1499 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411> 2020.
- 1500 PERDIGÓN, G., VINTIÑI, E. O., ALVAREZ, S., MEDINA, M. B-A., MÉDICI, M.
1501 Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system
1502 activation by lactic acid bacteria. **J. Dairy Sci.** v.82, p.1108-1114. Doi:
1503 10.3168/jds.S0022-0302(99)75333-6 (1999).
- 1504 PEREIRA, G.V.M., COELHO, B.O., MAGALHÃES-JÚNIOR, A.I., THOMAZ-
1505 SOCCOL, V., SOCCOL, C.R. How to select a probiotic? A review and update of
1506 methods and criteria. **Biotechnological Advances**, v.36, p.2060-2076, 2018.
- 1507 PERNA, A., SIMONETTI, A., GAMBACORTA, E. Phenolic content and
1508 antioxidant activity of donkey milk kefir fortified with sulla honey and rosemary
1509 essential oil during refrigerated storage. **International Journal of Dairy**
1510 **Technology**, v.72, n.1, p.74-81. 2019.
- 1511 PETERSON, L.W., ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier
1512 function and immune homeostasis. **Nat. Rev. Immunol.** v.14, p.141–53.
1513 DOI:10.1038/nri3608. 2014.
- 1514 PFEILER, E.A., KLAENHAMMER, T.R. The genomics of lactic acid bacteria.
1515 **Trends in Microbiology**, v.15, p.546-553. 2007.
- 1516 PINTOR, A., SEVERIANO-PÉREZ, P., TOTOSAUS, A. Optimization of fat-
1517 reduced ice cream formulation employing inulin as fat replacer via response
1518 surface methodology. **Food Science and Technology International**, v.0, n.0,
1519 p.1-12. 2013.

- 1520 PIQUERAS-FISZMAN, B., JAEGER, S.R. The effect of product–context
1521 appropriateness on emotion associations in evoked eating occasions. **Food**
1522 **Quality and Prefer** v.40, p.49-60. 2015.
- 1523 PLAZA-DIAZ, J., RUIZ-OJEDA, F. J., GIL-CAMPOS, M., & GIL, A. Mechanisms
1524 of Action of Probiotics. **Advances in nutrition** (Bethesda, Md.). v.10, S49–S66.
1525 2019.
- 1526 PRAKASH, U.N.S., SRINIVASAN, K. Fat digestion and absorption in spice
1527 pretreated rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.503–
1528 510. 2012.
- 1529 PULEO, S., VALENTINO, M., MAIS, P., MONACO, R. Hardness sensitivity: Are
1530 old, young, female and male subjects all equally sensitive? **Food Quality and**
1531 **Prefer** v.90, 104118. 2021.
- 1532 RAHIM, N.A., SARBON, N.M. Acacia honey lime ice cream: physicochemical
1533 and sensory characterization as effected by different hydrocolloids.
1534 **International Food Research Journal**, v.26, n.3, p.883-891. 2019.
- 1535 RAIZEL, R., SANTINI, E., KOPPER, A.M., REIS FILHO, A.D. Efeitos do
1536 consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano.
1537 **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre – RS, v.4, p.66-74. 2011.
- 1538 RANADHEERA, R.D.C.S., BAINES, S.K., ADAMS, M.C. Importance of food in
1539 probiotic efficacy. **Food Research International**, v.43, n.1, p.1–7. 2010.
- 1540 REHMAN, M.U., TAHIR, M., ALI, F., QAMAR, W., LATEEF, A., KHAN, R., *et al.*
1541 Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney
1542 genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid.
1543 **Molecular and cellular biochemistry**, v.365, p.119–127. 2012.
- 1544 REIS, J.A., PAULA, A.T., CASAROTTI, S.N., PENNA, A.L.B. Lactic Acid
1545 Bacteria Antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food**
1546 **Engineering Reviews**, v.4, n.2, p.124–140. 2012.
- 1547 RENHE, I.R.T., WEISBERG, E., PEREIRA, D.B.C. Indústria de gelados
1548 comestíveis no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.36, n.284,
1549 p.81-86. 2015.
- 1550 RIQUELME, N., ROBERT, P., ARANCIBIA, C. Undertanding older peolple
1551 perceptions about desserts using word association and sorting methodologies.
1552 **Food Quality and Prefer** v.96, 104423. 2022.
- 1553 RODRIGUES, F.S.S., POLIDORI, M.M. Enfrentamento e resiliência de
1554 pacientes em tratamento quimioterápico e seus familiares. **Revista Brasileira**
1555 **de Cancerologia**, v.54, n.4, p.619-627, 2012.
- 1556 ROSS, R.P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past,
1557 present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.3–16.
1558 2002.
- 1559 RONTETAP, A., SIJTSEMA, S.J., DAGEVOS, H., WINTER, M. Construal
1560 levels of healthy eating. Exploring consumers'interpretation of health in the food
1561 context. **Appetite** v.59, p.333-340. 2012.
- 1562 ROUSSEEUW, P.J., LEROY, A.M. **Robust regression and outlier detection**.
1563 John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/047172538> 1987.

- 1564 SAAD, S.M.I., CRUZ, A.G., FARIA, J.A.F. **Probióticos e prebióticos em**
 1565 **alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo:
 1566 Varela, 699p. 2011.
- 1567 SAINTE-MARIE, G. A paraffin embedding technique for studies employing
 1568 immunofluorescence. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.10, n.3,
 1569 p.250–256. 1962.
- 1570 SANDERS, M.E., AKKERMANS, L.M.A., HALLER, D., HAMMERMAN, C.,
 1571 HEIMBACH, J., HÖRMANNSPERGER, G. et al. Safety assessment of
 1572 probiotics for human use. **Gut Microb**, v.1, p.164–185, 2010.
- 1573 SANDERS, M.E., MERENSTEIN, D.J., OUWEHAND, A.C., REID, G.
 1574 SALMINEN, S., CABANA, M.D. et al. Probiotic use in at-risk populations. **J.**
 1575 **Am. Pharm. Assoc.** v.56, p.680–686, 2016.
- 1576 SALVA, S., MARRANZINO, G., VILENA, J., AGÜERO, G., ALVAREZ, S.
 1577 Probiotic Lactobacillus strains protect against myelosuppression and
 1578 immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. **International**
 1579 **Immunopharmacology**, v. 22, p.209–221, 2014.
- 1580 SALVO-ROMERO, E., ALONSO COTONER, C., PARDO CAMACHO, C.,
 1581 CASADO BEDMAR, M., VICARIO, M. The intestinal barrier function and its
 1582 involvement in digestive disease. **Rev. Española Enfermedades Dig.** v.108.
 1583 doi:10.17235/reed.2015.3846/2015 2015.
- 1584 SANDERS, M.E., BENSON, A., LEBEER, S., MERENSTEIN, D.J.,
 1585 KLAENHAMMER, T.R. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications
 1586 for general probiotic claims. **Curr Opinion Biotechnol** v.49, p.207-216. 2018.
- 1587 SANTAJOJA, M., JALLINOJA, P. Food out of its usual rut. Carnavalesque online
 1588 veganism as political consumerism, **Geoforum** v.126, p.59-67. 2021.
- 1589 SANTOS, V.M.R., DONNICI, C.L., DACOSTA, J.B.N., CAIXEIRO, J.M.R.
 1590 Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de
 1591 preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química**
 1592 **Nova**, v.30, n.1, p.159-170. 2007.
- 1593 SARESHKEH, E.S.E., NOURI, M. Improving Stability of Bioactive Components
 1594 and Folate and Survival of *Bifidobacterium Bifidum* and *Bifidobacterium Lactis*
 1595 in Probiotic Ice Creams Containing Japanese Loquat Pulps. **Nutrition and**
 1596 **Food Sciences Research**, v.77, n.1, p.49-56. 2022.
- 1597 SCHNEIDER, C.D.E., OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício:
 1598 mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista**
 1599 **Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10. p.87-90. 2004.
- 1600 SCHNEIDER-KAMP, A. Inclusion of the excluded: Consumers' quest for
 1601 hedonism in food consumption. **Intern J Consum Stud** v.45, p.320-334. 2020.
- 1602 SEDER, R.A., PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine producing phenotype by
 1603 CD4+ T cells. **Annu. Rev. Immunology**, v.12, p.635-673, 1994.
- 1604 SEM, R., BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the
 1605 immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v.46, n.5, p.706-716. 1986.

- 1606 SETTANNI, L., MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to
1607 improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v.27,
1608 n.6, p.691–697. 2010.
- 1609 SHARMA, R., PADWAD, Y. Plant Polyphenols Based Second Generation
1610 Synbiotics: Emerging Concepts, Challenges and Opportunities. **Nutrition**,
1611 77:110785. 2020.
- 1612 SHORI, A.B. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy
1613 foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural**
1614 **Biotechnology**, v.4, p.423–431. 2016.
- 1615 SICHERER, S.H., SAMPSON, H.A. Food allergy: A review and update on
1616 epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. **J of**
1617 **Allergy and Clinic Immu** v.141, p.41-58. 2018.
- 1618 SILANIKOVE, N., LEITNER, G., MERIN, U. The interrelationships between
1619 lactose intolerance and the modern dairy industry: global perspectives in
1620 evolutionary and historical backgrounds, **Nutrients** v.7, p.7312–7331. 2015.
- 1621 SILVA, J.R.E., LANNES, S.C.S. Effect of different sweetener blends and fat
1622 types on ice cream properties. **Food Science and Technology**, v.31, n.1,
1623 p.217–220. 2001.
- 1624 SILVA, V.M., MINIM, V.P.R., FERREIRA, M.A.M., SOUZA, P.H.P., MORAES,
1625 L.E.S., MINIM, L.A. Study of the perception of consumers in relation to different
1626 ice cream concepts. **Food Quality and Prefer** v.36, p.161-168. 2014.
- 1627 SILVA, A., MARTINS, H., SILVA, M.V.S., ANDRADE, M.A., MAUES, C.,
1628 ABREU, E., *et al.* **Propriedades Terapêuticas (*Zingiber officinale* R.)**. Portal
1629 de Plantas Medicinais e Fitoterápicas - Boletim Fitoterápico Gengibre (*Zingiber*
1630 *officinale* R.), Pará, v.1, ed.1, 2017.
- 1631 SINGH, B., MAL, G., SHARMA, D., SHARMA, R., ANTONY, C.P., KALRA, R.S.
1632 Gastrointestinal biotransformation of phytochemicals: Towards futuristic dietary
1633 therapeutics and functional foods. **Trends in Food Science & Technology**,
1634 v.106, p.64-77. 2020.
- 1635 SIPPLE, L.R., RACETTE, C.M., SCHIANO, A.N., DRAKE, M.A. Consumer
1636 perception of ice cream and frozen desserts in the “better-for-you” category. **J**
1637 **of Dairy Sci** v.105, p.154-169. 2022.
- 1638 SKRYPLONEK, K., HENRIQUES, M., GOMES, D., VIEGAS, J., FONSECA, C.,
1639 PEREIRA, C., *et al.* Characteristics of lactose-free frozen yogurt with κ-
1640 carrageenan and corn starch as stabilizers, **Journal of Dairy Science**, v.102,
1641 n.9, p.7838-7848. 2019.
- 1642 SONG, D., IBRAHIM, S., HAYEK, S. **Recent Application of Probiotics in**
1643 **Food and Agricultural Science**. In: RIGOBELLO, Everlon Cid. (Org.).
1644 Probiotics: InTech. cap. 1. 2012.
- 1645 SOUZA, J.C.B., COSTA, M.R., DE RENSIS, C.M.V.B., SIVIERI, K. Ice cream:
1646 composition, processing and addition of probiotic. **Alimentos e Nutrição**,
1647 Araraquara, v.21, n.1, p.155-165. 2010.
- 1648 SPANGLER, J. B. *et al.* Insights into Cytokine–Receptor Interactions from
1649 Cytokine Engineering. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 33, n. 1, p.
1650 139–167, 2015.

- 1651 SRIVIDHYA, R., SAVITHRI, R. Consumer perception as regards ice-creams a
1652 study with special reference to Chennai city. **Intern J of Transdisciplinary Res**
1653 **and Development** v.1, p.9-15. 2021.
- 1654 STEFANOVIC, E., FITZGERALD, G., MCAULIFFE, O. Advances in the
1655 genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**.
1656 v.61, p.33-49. 2017.
- 1657 SUBBARAMAIAH, K.; HOWE, L. R.; BHARDWAJ, P.; DU, B.; GRAVAGHI, C.;
1658 YANTISS, R. K.; ZHOU, X. K.; BLAHO, V. A.; HLA, T.; YANG, P.;
1659 KOPELOVICH, L.; HUDIS, C. A.; DANNENBERG, A. J. Obesity is associated
1660 with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary
1661 gland. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2011, Mar;4(3):329-46.
- 1662 SUEBSIRI, N., KOKILAKANISTHA, P., LAOJARUWAT, T., TUMPANUVATR,
1663 T., JITTANIT, W. The application of ohmic heating in lactose-free milk
1664 pasteurization in comparison with conventional heating, the metal contamination
1665 and the ice cream products, **Journal of Food Engineering**, v.262, p.39-48.
1666 2019.
- 1667 SURI, S., KUMAR, V., PRASAD, R., TANWAR, B., GOYAL, A., KAUR, S., et al.
1668 Considerations for development of lactose free food. **J. Nutr. Metab**, v.15, p.27-
1669 34. 2018.
- 1670 SWAIN, T., HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. The
1671 quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science Food**
1672 **Agriculture**, v.10, n.1, p.63-68. 1959.
- 1673 TADHANI, M.B., SAH, S.P., KARIA, P.M. Consumer's perceptions and
1674 awareness towards ice cream as functional food with respect to Ahmedabad
1675 city, India. **Tourism and Hospitality Management**, p.17-23. 2010.
- 1676 TAKEDA, K., AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin. Immunol**, v.16, p.3-9.
1677 2004.
- 1678 TERPOU, A., PAPADAKI, A., LAPPA, I.K., KACHRIMANIDOU, V., BOSNEA, L.
1679 A., KOPSAHELIS, N. Probiotics in food systems: Significance and emerging
1680 strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value.
1681 **Nutrients**, v.11, n.7, p.1–32. 2019.
- 1682 TERRAB, A., DIEZ, M.J., HEREDIA, F.J. Chromatic characterisation of
1683 Moroccan honeys by diffuse reflectance and tridstimulus colorimetry – Non
1684 uniform and uniform colour spaces. **Food Science Technology International**,
1685 v.8, n.4, p.189-195, 2002.
- 1686 TOMAR, B.S. Lactose intolerance and other disaccharidase deficiency, **Indian**
1687 **J. Pediatr**. v.81, p.876–880. 2014.
- 1688 TOUKAM, L.L., FOSSI, B.T., TAIWE, G.S., BILA, R.B., SOFEU, D.D.F., IVO,
1689 E.P., et al. *In vivo* antimalarial activity of a probiotic bacterium *Lactobacillus*
1690 *sakei* isolated from traditionally fermented milk in BALB/c mice infected with
1691 *Plasmodium berghei* ANKA. **Journal of Ethnopharmacology**, v.280, 114448.
1692 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114448> 2021.
- 1693 TRACEY, K.J., CERAMI, F. A tumor necrosis factor: an update review of its
1694 biology. **Crit Care Med**. v.21, S415-422. 1993.

- 1695 TRIPATHI, M.K., GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics
1696 during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v.9, p.225–241.
1697 2014.
- 1698 TRIPATHI, D.N., JENA, G.B. Astaxanthin intervention ameliorates
1699 cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early
1700 hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes.
1701 **Mutation Research**, v.696, p.69–80. 2010.
- 1702 TRUBINIKOVA, A., CHABANOVA, O., SHARAHMATOVA, T., BONDAR, S.,
1703 VIKUL, S. Grounding and development of low-lactose biologically active milk ice
1704 cream formula. (Ukraine). **Traektoriâ Nauki – Path of Science**, v.4, n.9, p.3001-
1705 3021. 2018.
- 1706 TURKMEN, N., AKAL, C., ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review,
1707 **Journal of Functional Foods**, v.53, p.62-75,
1708 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.004>. 2019.
- 1709 ULLOA, J.A., MONDRAGÓN, C.P.M., RODRÍGUEZ, R.R., RESÉNDIZ, V.J.A.,
1710 ROSAS, U.P. La miel de abeja y su importância. **Fuente**, v.2, p.11-18, 2010.
- 1711 VALÉRIO, G.D. **Desenvolvimento de sorvete funcional: avaliação de suas**
1712 **características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. In: Geisa
1713 Demele Valério. Londrina: [s.n], 65f. 2014.
- 1714 VANDERHOOF, J.A. Probiotics in Allergy Management. **Journal of Pediatric**
1715 **Gastroenterology and Nutrition**, v.47, n.2, p.38-40. 2008.
- 1716 VARDHANABHUTI, B., WANG, Y. **Low lactose milk products**. Encyclopedia
1717 of Dairy Sciences (3th ed), p. 423-429. Academic Press, Cambridge,
1718 Massachusetts, USA, Elsevier DOI: [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00345-7)
1719 [1.00345-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00345-7). 2022.
- 1720 VERÓN, H. E., DI RISIO, H. D., ISLA, M. I., TORRES, S. Isolation and selection
1721 of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that
1722 grow in Northwest Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v.84,
1723 p.231–240. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.058> 2017.
- 1724 VIAUD, S., SACCHERI, F., MIGNOT, G., YAMAZAKI, T., DAILLÈRE, R.,
1725 HANNANI, D., *et al.* The intestinal microbiota modulates the anticancer immune
1726 effects of cyclophosphamide. **Science**, v.342. p.971–976. 2013.
- 1727 VIDAL, L., ARES, G., GIMENEZ, A. Projective techniques to uncover consumer
1728 perception: Application of three methodologies to ready-to-eat salads. **Food**
1729 **Quality and Prefer** v.28, p.1-7. 2017.
- 1730 VINCENZI, A., GOETTERT, M.I., SOUZA, C.F.V. An evaluation of the effects of
1731 probiotics on tumoral necrosis factor (TNF- α) signaling and gene expression.
1732 **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.57, p.27–38.
1733 <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.10.004> 2021.
- 1734 VIEIRA, M.M., MACEDO, F.Y., FILHO, J.N., COSTA, A.C., CUNHA, A.N.,
1735 SILVEIRA, E.R., BRITO, G.A., *et al.* Ternatin, a flavonoid, prevents
1736 cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats.
1737 **Phytotherapy Research**, v.18, p.135-141. 2004.
- 1738 VIEIRA, F.G.K., DE SALLES, R.K., MANNES, P., KAMI, A.A., BÚRIGO, T.,
1739 GERALDO, A.P.G., *et al.* Development and Acceptance of an Ice Cream as

- 1740 Food Alternative for Cancer Patients, **Journal of Culinary Science &**
1741 **Technology**, DOI: 10.1080/15428052.2018.1509752 2018.
- 1742 VITOLA, H.R.S., DANNENBERG, G.S., MARQUES, J.L., LOPES, G.V., SILVA,
1743 W.P., FIORENTINI, A.M. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3
1744 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in
1745 soybean. **Process Biochemistry**, v.73, p.1-7. 2018.
- 1746 VITOLA, H.R.S., CRUXEN, C.E.S., SILVA, F.T., THIEL, P.R., MARQUES, J.L.,
1747 da SILVA, W.P., *et al.* *Lactobacillus casei* CSL3: Evaluation of supports for cell
1748 immobilization, viability during storage in *Petit Suisse* cheese and passage
1749 through gastrointestinal transit *in vitro*. **LWT– Food Science and Technology**,
1750 127, 109381. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109381>. 2020.
- 1751 VIVARELLI, S., SALEMI, R., CANDIDO, S., FALZONE, L., SANTAGATI, M.,
1752 STEFANI, S., *et al.* Gut microbiota and cancer: from pathogenesis to therapy,
1753 **Cancer**. v.11, p.1–26. 2019.
- 1754 WADA, J., MAKINO, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic
1755 nephropathy. **Clin Sci**. v.124, n.3, p.139-152. 2013.
- 1756 WAITZBERG, D.L. **Dieta, nutrição e câncer**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 783 p.
1757 2006.
- 1758 WANG, X., KEH, H.T., CHAO, C. Nostalgia and consumer preference for
1759 indulgent foods: The role of social connectedness. **Intern J Consum Stud** v.42,
1760 p.316-326. 2018.
- 1761 WANG, Y., JIANG, Y., DENG, Y., YI, C., WANG, Y., DING, M., *et al.* Probiotic
1762 Supplements: Hope or Hype? **Front. Microbiol.** v.11, n.160. DOI:
1763 10.3389/fmicb.2020.00160 2020.
- 1764 WANG, X., ZHANG, D., JIANG, H., ZHANG, S., PANG, X., GAO, S., *et al.* Gut
1765 Microbiota Variation With Short-Term Intake of Ginger Juice on Human **Health**.
1766 **Front. Microbiol.** v.11, 576061. DOI: 10.3389/fmicb.2020.576061 2021.
- 1767 WATFORD, W.T., HISSONG, B.D., BREAN, J.H., *et al.* Signaling by IL-12 and
1768 IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. **Immunol Rev**, v.202, p.139–
1769 156. 2004.
- 1770 WEI, H., JIANG, L., XUE, Y., FANG, D., GUO, H. Secreted expression of
1771 Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *P. pastoris*. **Journal of**
1772 **Virological Methods**. v 109, p.17-23, 2007.
- 1773 WEISS, G.A., HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal
1774 dysbiosis. **Cell. Mol. Life Sci.** v.74, p.2959–2977. doi:10.1007/s00018-017-
1775 2509-x. 2017.
- 1776 WHO/FAO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Report of**
1777 **a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation**
1778 **of probiotics in food**. London, Ontario. Food and Agriculture Organization of
1779 the United Nations, World Health Organization FAO/WHO. 2002 Available in:
1780 <https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>
1781 Acess in: 7 oct 2022.
- 1782 WOOTEN, W.J. **Lactose Intolerance and Ethnic Prevalence**, National
1783 Institutes of Health. Lactose Intolerance and Health. (p. 49-52). Kensington:
1784 National Institutes of Health. 2010.

- 1785 WU, D., CAO, M., ZHOU, J., YAN, S., PENG, J., YU, Z., *et al.* *Lactobacillus*
1786 *casei* T1 from kurut against *Helicobacter pylori*-induced inflammation and the
1787 gut microbial disorder. **Journal of Functional Foods**. v.85, 104611. 2021.
- 1788 WUYTS, S., WITTOUCK, S., BOECK, I., ALLONSIUS, C.N., PASOLLI, E.
1789 Large-scale phylogenomics of the *Lactobacillus casei* group highlights
1790 taxonomic inconsistencies and reveals novel clade-associated features.
1791 **Msystems**, v.2, e00061–17. 2017.
- 1792 XIAOJING, M.A. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning.
1793 **Microbes and Infection**, v.3, p.121-129. 2001.
- 1794 XU, F., LI, Q., WANG, S., BAI, J., DONG, M., XIAO, G., *et al.* *Lactobacillus*
1795 *casei* JY300-8 generated by 12C6+ beams mutagenesis inhibits tumor
1796 progression by modulating the gut microbiota in mice. **Journal of Functional**
1797 **Foods**, v.87, 104779. 2021.
- 1798 YADAV, R., KHAN, S.H., MADA, S.B., MEENA, S., KAPILA, R., KAPILA, S.
1799 Consumption of Probiotic *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898-Fermented
1800 Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats
1801 Fed on Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**,
1802 <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9429-4> 2018.
- 1803 YAHFOUFI, N., MALLET, J.F., GRAHAN, E., MATAR, C. Role of Probiotics and
1804 Prebiotics in Immunomodulation. **Current Opinion in Food Science**, v.20,
1805 p.82-91, 2018.
- 1806 YAZDI, M.H., MAHDAVI, M., KHERADMAND, E., SHAHVERDI, A.R. The
1807 preventive oral supplementation of a selenium nanoparticle-enriched probiotic
1808 increases the immune response and lifespan of 4T1 breast cancer bearing
1809 mice, **Arzneimittelforsch**, v.62, p.525–531. 2012.
- 1810 YAZDI, M.H., MAHDAVI, M., SETAYESH, N., ESFANDYAR, M., SHAHVERDI,
1811 A. R. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient
1812 immune responses *in vivo* and reduces the liver metastasis in metastatic
1813 form of mouse breast cancer. **Daru**, v.21, p.33. 2013.
- 1814 ZANCAM, K.C., MARQUES, M.O.M., PETENATE, A.J., MEIRELES, M.A.A.
1815 Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-
1816 solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of**
1817 **Supercritical Fluids**. v.24, p.57-76, 2002.
- 1818 ZHAO, Z.W., PAN, D.D., WU, Z., SUN, Y.Y., GUO, Y.X., ZENG, X.Q.
1819 Antialcoholic liver activity of whey fermented by *Lactobacillus casei* isolated
1820 from Koumiss. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.7, p.4062-4071. 2014.
- 1821 ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C.M.A.P., HARRIS,
1822 H.M.B., MATTARELLI, P., *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*:
1823 Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus*
1824 *Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*.
1825 **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.70,
1826 p.2782–2858, DOI 10.1099/ijsem.0.004107 2020.
- 1827 ZULUAGA, A.F., SALAZAR, B.E., RODRIGUEZ, C.A., ZAPATA, A.X.,
1828 AGUDELO, M., VESGA, O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified
1829 low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to

1830 diverse experimental models of infectious diseases. **BMC Infectious**
1831 **Diseases**v. v.55, p.1-10, 2006.

1832

1833

1834

1835

1836

1837

1838

1839

1840

1841

1842

1843

1844

1845

1846

1847

1848

1849

1850

1851

1852

1853

APÊNDICES

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- TCLE

Pelo presente consentimento livre e esclarecido, eu _____, CPF _____ declaro que fui informado(a), de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa e da forma de trabalho desta pesquisa, através de encontro individual e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção.

PROJETO: Desenvolvimento de sorvete probiótico, sem lactose, sabor gengibre e mel.

OBJETIVOS: Fui informado(a) de que o objetivo desta pesquisa é avaliar a aceitação do sorvete sem lactose de gengibre e mel suplementado com bactérias benéficas (probióticas).

PROCEDIMENTOS: Fui informado(a) de que receberei uma amostra do sorvete, para que eu avalie as características sensoriais do produto.

INGREDIENTES DO PRODUTO: Leite sem lactose, leite em pó sem lactose, creme de leite sem lactose, açúcar, mel, gengibre, emustab (emulsificante), liga neutra, pectina e bactérias benéficas (probióticas).

RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES: Fui informado(a) de que não existe riscos em consumir o produto. O mesmo não contém glúten nem lactose. Declaro que não possuo nenhum tipo de alergia e/ou reação adversa a este produto.

BENEFÍCIOS: O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato que os resultados irão contribuir para diversificação de produtos lácteos para o mercado consumidor e, em especial, para pessoas intolerantes à lactose. Alimentos lácteos são importantes fontes de proteínas e cálcio e as bactérias probióticas fazem bem à saúde.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA: A minha adesão à pesquisa ocorrerá de forma voluntária e nenhum tipo de penalidade será aplicado caso não seja do meu interesse participar. Ciente de que não terei custos nem receberei pagamento ou recursos financeiros por participar desta pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE: Estou ciente que a minha identidade permanecerá confidencial durante o estudo e que os dados coletados só serão utilizados para fins de pesquisa.

CONSENTIMENTO: Ciente das informações citadas anteriormente, eu concordo em participar da avaliação sensorial de sorvete sem lactose probiótico.

ASSINATURA: _____ DATA: ____ / ____ / ____

ASSINATURA DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Pesquisador: Khadija Bezerra Massaut

E-mail: khadijamassaut@gmail.com Tel: (54) 98424-2161

Orientadora: Dra. Ângela Maria Fiorentini

E-mail: angefiore@gmail.com Tel: (53) 99138-7367

ANEXOS

Anexo A – Ficha de análise sensorial

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PPG EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

NOME: _____ DATA: _____

Teste de escala hedônica – Instruções: Avalie cuidadosamente cada amostra e utilize a escala para descrever o quanto você gostou ou desgostou da amostra em relação aos atributos informados no quadro abaixo:

1 = desgostei muitíssimo

2 = desgostei muito

3 = desgostei regularmente

4 = desgostei ligeiramente

5 = indiferente

6 = gostei ligeiramente

7 = gostei regularmente

8 = gostei muito

9 = gostei muitíssimo

Comentário adicional: _____

Cor: _____

Aroma: _____

Sabor: _____

Textura: _____

Aspecto global: _____

Teste de intenção de compra – Instruções: Avalie a amostra segundo a sua intenção de consumo, utilizando a escala abaixo. Marque com um X sua avaliação.

7 = Compraria sempre

6 = Compraria muito frequentemente

5 = Compraria frequentemente

4 = Compraria ocasionalmente

3 = Compraria raramente

2 = Compraria muito raramente

1 = Nunca compraria

Comentário adicional: _____

Anexo B – Parecer do comitê de ética em experimentação animal

16/01/2020

SEI/UFPEL - 0845611 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
5/2020/CEEA/REITORIA
23110.040985/2019-82

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Influência de *Lactobacillus casei* CSL3 e de *Pediococcus pentosaceus* P97 *in vivo*, em modelo de imunossupressão induzida por ciclofosfamida**”, registrada com o nº 23110.040985/2019-82, sob a responsabilidade de **Ângela Maria Fiorentini** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **17 de dezembro de 2019**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	13/01/2020 a 31/12/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss
Nº de animais	60
Idade	21 a 26 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 40985-2019

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=970626&infra_sistema=1000... 1/2

16/01/2020

SEI/UFPEL - 0845611 - Parecer

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário, em 13/01/2020, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_documento=970626&infra_sistema=1000..., informando o código verificador 0845611 e o código CRC 4C65CE5A.

Referência: Processo nº 23110.040985/2019-82

SEI nº 0845611