



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BEBIDAS FERMENTADAS DE
ORIGEM LÁCTEA PREPARADAS COM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA**

ANDRESSA REGINA ANTUNES

Cascavel, PR
2017



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANDRESSA REGINA ANTUNES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BEBIDAS FERMENTADAS DE
ORIGEM LÁCTEA PREPARADAS COM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a Luciana Oliveira de Fariña

Co-orientador: Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos

Cascavel, PR
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A642a Antunes, Andressa Regina
Avaliação do potencial antioxidante de bebidas fermentadas de origem láctea preparadas com *Lactobacillus acidophilus*: uma revisão sistemática./ Andressa Regina Antunes. — Cascavel, 2017.
105 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Oliveira de Fariña
Coorientador: Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. Bactéria ácido-lática. 2. Probiótico. 3. Leite fermentado. 4. Iogurte. 5. Estresse oxidativo. 6. Saúde baseada em evidência. I. Fariña, Luciana Oliveira de. II. Vasconcelos, Helder Lopes. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed.615
CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

ANDRESSA REGINA ANTUNES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BEBIDAS
FERMENTADAS DE ORIGEM LÁCTEA PREPARADAS COM *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientador: Profª Drª Luciana Oliveira de Fariña.

BANCA EXAMINADORA:



Profª Drª Luciana Oliveira de Fariña
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná - UNIOESTE
Orientador



Profª Drª Darlila Aparecida Gallina
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(ITAL) – Campinas /SP



Profª Drª Mônica Lady Fiorese
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná - UNIOESTE

Cascavel, PR
2017

BIOGRAFIA

ANDRESSA REGINA ANTUNES

Nascida em Cascavel, Paraná, em 23 de março de 1991, possui graduação no curso de Farmácia (2013) pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. Atualmente (2013 - 2017) é Analista Sênior de Assuntos Regulatórios, na Indústria de Medicamentos Genéricos Prati Donaduzzi. Em paralelo cursa o Programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE (2015 - 2017), estando inserida na linha de pesquisa denominada: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde, com destaque para o estudo da atividade antioxidante de probióticos aplicados em bebidas fermentadas de origem láctea.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pelas conquistas maravilhosas que me permitiu alcançar até aqui, e pelas pessoas incríveis que colocou em meu caminho, as quais colaboraram de alguma forma com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha família, e em especial à minha mãe Tereza Alves Antunes, que com muito amor, carinho e compreensão, acompanhou meus passos, confiou em minhas escolhas e possibilitou a realização de tantos sonhos, mesmo com pequenas e humildes ações diárias.

À querida orientadora, da academia e da vida, Professora Luciana Oliveira de Fariña, que acompanhou meus passos desde o início da graduação, até a tão sonhada pós-graduação. Meu sincero agradecimento pelo incentivo constante, pela confiança depositada e pelo carinho com que conduziu a sua orientação e os seus conselhos, sempre muito sincera e fortalecedora em suas palavras.

Ao Professor co-orientador, Helder Lopes Vasconcelos, pela paciência, confiança e amizade, desde a graduação até a conclusão desta etapa.

À Professora e amiga, Luciana Bill Mikito Kottwitz, que atuou como revisora desta pesquisa, meu agradecimento pelo companheirismo, pelas doces palavras, e pelas orientações depositadas a mim e a este trabalho.

À UNIOESTE, por sua existência e pelo acolhimento como acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE (PCF), pela oportunidade da pós-graduação e por todo o apoio durante o curso.

**Avaliação do potencial antioxidante de bebidas fermentadas de origem láctea
preparadas com *Lactobacillus acidophilus*:
Uma revisão sistemática**

RESUMO:

Introdução: O dano causado pela formação de radicais livres no organismo de animais e humanos tem apresentado resultados significativos, uma vez que a fisiopatologia de diversos tipos de doenças, como diabetes, hipertensão, aterosclerose, câncer, entre outras, possui ligação com a ação destes compostos altamente reativos. Para a redução dos malefícios causados por eles, alternativas não medicamentosas estão sendo desenvolvidas, a fim de atuarem como adjuvantes terapêuticos ou profiláticos, como é o caso das bebidas lácteas fermentadas com microrganismos probióticos. Isso ocorre em função das vantagens obtidas tanto pelos nutrientes intrínsecos destas bebidas, bem como dos microrganismos que as constituem, além de seus produtos de fermentação. Uma espécie bacteriana com propriedade probiótica notadamente conhecida por seu potencial antioxidante é o *Lactobacillus acidophilus*, utilizado em processos fermentativos para a obtenção de leites fermentados, e preferencialmente com aspectos funcionais. **Objetivo:** Reunir evidências sobre o aspecto antioxidante apresentado por bebidas lácteas fermentadas em presença de *Lactobacillus acidophilus*, a partir de ensaios com desenhos experimentais “in vitro” e “in vivo”, além de avaliar as evidências a respeito das demais características vinculadas à fabricação destas bebidas, como os aspectos físico-químicos, microbiológicos, antioxidantes e metodológicos, com a intenção de esclarecer se o referido probiótico realmente interfere no aspecto antioxidante das amostras, bem como nos demais aspectos de interesse para a fabricação de leites fermentados. **Material e Métodos:** Foi realizada uma revisão sistemática nas bases de dados: Medline, Cochrane, Scopus, Science Direct, Scifinder, Web of Science, Scielo e Agrícola, considerando os seguintes termos de busca: “antioxidant activity”, “oxidative stress”, “*Lactobacillus acidophilus*”, “lactic beverage”, “fermented milk”, “yogurt”, “in vitro techniques” e “in vivo”, associados aos operadores booleanos “AND” e “OR”, além da busca manual por estudos na área que pudessem ser de interesse. Os artigos recuperados por meio de todas as fontes de busca tiveram os seus títulos e resumos avaliados de acordo com os critérios de inclusão preestabelecidos, sendo eles, basicamente, a presença de *Lactobacillus acidophilus* na constituição de leites fermentados, isolado ou em associação com outras bactérias, e que tiveram os seus conteúdos avaliados quanto ao aspecto antioxidante. Os estudos que atenderam a esses critérios tiveram os seus conteúdos lidos na íntegra. Na sequência, todos os dados de interesse foram extraídos dos artigos incluídos, avaliados e comparados com dados de literatura para amostras controle (leite puro) ou amostras de constituição microbiológica semelhante, e ainda, comparados com dados da legislação brasileira quando disponíveis. **Resultados e Discussão:** Por meio das bases de dados pesquisadas, 1751 artigos foram recuperados e lidos em termos de título e resumo. Desses, 36 artigos foram selecionados e tiveram seus conteúdos lidos na íntegra, e, a partir deles, oito artigos atenderam aos critérios de inclusão para estudos “in vitro”. Para estudos “in vivo”, seis artigos foram lidos na íntegra, sendo que apenas um deles atendeu aos critérios de inclusão, não sendo possível, portanto, o desenvolvimento de uma pesquisa comparativa para o referido desenho metodológico, considerando a estratégia de busca escolhida. Dessa forma, a partir dos oito artigos envolvendo experimentos “in

vitro”, um total de 17 amostras de interesse se enquadraram no requisito de constituição microbiológica, por apresentarem no mínimo a presença de *Lactobacillus acidophilus*, as quais incluíram três leites fermentados (Subgrupo A = 17,65%), oito leites acidófilos (Subgrupo B = 47,06%) e seis iogurtes (Subgrupo C = 35,29%). Do total de materiais celulares declarados, 66,67% deles foram caracterizados como conteúdo intracelular livre de células, sendo o restante, o conteúdo celular sem rompimento. Quanto à constituição microbiológica, foi possível verificar que, após a presença intencional de *Lactobacillus acidophilus*, o segundo microrganismo mais frequentemente utilizado foi *Streptococcus thermophilus*, seguido por *Lactobacillus bulgaricus*. No que se refere à avaliação da atividade antioxidante, a técnica analítica empregada com maior frequência foi aquela que avalia a capacidade eliminatória do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), seguida pelo método de eliminação do radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Com base no perfil de atividade antioxidante, o subgrupo B foi classificado como sendo o melhor caracterizado, em função de ter englobado, no geral, maior número de testes de atividade antioxidante em relação aos demais. Em adição, quando constituídas por *Lactobacillus acidophilus*, quase a totalidade das amostras avaliadas apresentaram resultados consistentes para a atividade antioxidante. **Conclusão:** Partindo dos resultados obtidos, enfatiza-se a importância da associação entre diferentes métodos analíticos para a avaliação da atividade antioxidante, devido à maior precisão dos resultados recuperados e consequente respaldo científico conferido ao estudo. Além disso, verifica-se que, quando a presença do probiótico de interesse se encontra na constituição do alimento estudado, a atividade antioxidante é exaltada, o que leva a entender que de fato o microrganismo apresenta tal característica. Por outro lado, quando em presença de outros microorganismos, probióticos ou não, a atividade antioxidante é ainda melhorada, mas não de forma proporcional, levando à compreensão de que apenas a presença de *Lactobacillus acidophilus* é capaz de fornecer proteção antioxidante suficiente ao alimento em que for acrescentado. Dessa forma, bebidas lácteas fermentadas em presença desse probiótico poderiam ser consumidas com a premissa de proteção antioxidante, principalmente por indivíduos acometidos por doenças com fisiopatologias envolvidas com o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Bactéria ácido-lática, probiótico, leite fermentado, iogurte, estresse oxidativo, saúde baseada em evidência.

Evaluation of antioxidant potential of lactic fermented beverages prepared with *Lactobacillus acidophilus*: A systematic review

ABSTRACT:

Introduction: The damage caused by the formation of free radicals in the body of animals and humans has presented significant results, once the physiopathology of different types of sickness, such as diabetes, hypertension, atherosclerosis, cancer, among others, follows the binding with the action of these highly reactive components. To reduce the effects caused by them, alternatives in medication are being developed, in order to act as therapeutic adjuvants or prophylactics, like in the case of lactic beverages fermented with probiotic microorganisms. This occurs due to the advantages obtained by both the intrinsic nutrients of these beverages, as well as the microorganisms that forms them, beyond the products of their fermentation. A bacteria species with probiotic properties well-known by their antioxidant potential is the *Lactobacillus acidophilus*, that is used in fermentation processes for the production of fermented milk, mainly with functional aspects. **Objective:** Gathering evidences about the antioxidant aspect shown in fermented lactic beverages that contain *Lactobacillus acidophilus*, by “in vitro” and “in vivo” experimental design tests, besides, evaluating the evidences regarding the other characteristics related to the manufacture of these beverages, like the physical-chemical, microbiologic, antioxidants and methodologic aspects, with the intention of clarifying if these probiotic properties really interfere with the antioxidant aspects of the samples, as well as with the other important aspects for the production of fermented lactic beverages. **Material and Methods:** A systematic review was done in the data bases: Medline, Cochrane, Scopus, Science Direct, Scifinder, Web of Science, Scielo and Agrícola, considering the following criteria: “antioxidant activity”, “oxidative stress”, “*Lactobacillus acidophilus*”, “lactic beverage”, “fermented milk”, “yogurt”, “in vitro techniques” and “in vivo”, related with the boolean operators “AND” and “OR”, moreover the manual search for studies on this area that could be of interest. The articles gathered through all the research sources had their titles and abstracts evaluated according to the pre-established inclusion criteria being, basically, the presence of *Lactobacillus acidophilus* in the constitution of fermented milks, whether isolated or in association with other bacteria, and that had their contents evaluated about their antioxidant aspect. The studies that followed these criteria had their contents fully read. Subsequently, all data of interest were extracted from the included articles, evaluated and compared with literature data for control samples (pure milk) or samples of similar microbiological composition, and also compared with data from brazilian legislation, when available. **Results and Discussion:** Through the entire data bases searched, 1751 articles were retrieved and read in terms of title and summary. Out of these, 36 articles were selected and fully read, and from them, eight articles followed the inclusion criteria for “in vitro” tests. For “in vivo” tests, six articles were fully read, and considering that only one of them followed the inclusion criteria, it was not possible, therefore, to develop a comparative research for this methodologic design, considering the selected search strategy. Thus, from these eight articles related to “in vitro” experiments, a total of 17 samples of interest were comprehended in the microbiologic constitution requirements, showing at least the presence of *Lactobacillus acidophilus*, which included three fermented milks (Subgroup A = 17.65%), eight acidophilic milks (Subgroup B = 47.06%) and three yogurts (Subgroup C = 35.29%). From the total declared cellular materials, 66.67% of

these were characterized as intracellular content free of cells, being the rest, cellular content without breaking. Regarding the microbiologic constitution, it was possible to verify that, after the intentional presence of *Lactobacillus acidophilus*, the second most frequent used microorganism was *Streptococcus thermophilus*, followed by *Lactobacillus bulgaricus*. Regarding the evaluation of antioxidant activity, the analytic technique used with more frequency was that which evaluates the eliminatory capacity of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, followed by the method of elimination of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical. Based on the profile of antioxidant activity, subgroup B was classified as being the best characterized, due to encompass, in general, greater number of tests of antioxidant activity in relation to the others. In addition, when constituted by *Lactobacillus acidophilus*, almost all of the samples evaluated presented consistent results for the antioxidant activity. **Conclusion:** Based on the obtained results, the importance of association between different analytical methods for evaluation of antioxidant activity is emphasized, due to the greater precision of the recovered results and consequent scientific support given to the study. Besides, it could be verified that, when there is presence of the probiotic of interest in the constitution of the studied food, the antioxidant activity is enhanced, which leads to understand that in fact the microorganism has that characteristic. On the other hand, when in presence of other microorganisms, whether they are probiotic or not, the antioxidant activity is still increased, although not in a proportional way, leading to the understanding that only the presence of *Lactobacillus acidophilus* is able to provide sufficient antioxidant protection to food in which it is added. Thus, lactic fermented beverages that contain this probiotic could be consumed with the premise of antioxidant protection, mainly by individuals that suffer from sicknesses with physiopathologies related to oxidative stress.

Key-words: Acid-lactic bacteria, probiotic, fermented milk, yogurt, oxidative stress, health based on evidence.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Probióticos	18
3.2 Frações celulares	19
3.3 <i>Lactobacillus acidophilus</i> – Características gerais	21
3.3.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> e o potencial antioxidante	21
3.3.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> e aplicações em saúde	23
3.4 Radicais livres e Estresse Oxidativo	23
3.5 Antioxidantes	25
3.6 Métodos de avaliação da atividade antioxidante “in vitro”	27
3.6.1 Captura do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	27
3.6.2 Captura do radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)	28
3.6.3 Atividade eliminatória do radical hidroxila	28
3.6.4 Poder redutor	29
3.6.5 Atividade eliminatória dos íons metálicos	29
3.6.6 Demais metodologias analíticas	30
3.7 Métodos de avaliação da atividade antioxidante “in vivo”	30
3.7.1 Doseamento da peroxidação lipídica (LPO)	31
3.7.2 Glutathione redutase (GR)	31
3.7.3 Glutathione peroxidase (GSHPx)	32
3.7.4 Glutathione-S-transferase (GSt)	32
3.7.5 Superoxido dismutase (SOD)	32
3.7.6 Catalase (CAT)	33
3.8 Alimentos de interesse no aspecto antioxidante	33
3.8.1 Iogurte e outras bebidas fermentadas de origem láctea	33
3.9 Saúde baseada em evidências	34
3.9.1 Revisão sistemática qualitativa	36
3.9.2 Revisão sistemática quantitativa (Meta-análise)	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Delineamento da pesquisa	38

4.2 Busca sistemática	38
4.3 Critérios de seleção	39
4.4 Triagem e extração dos dados.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Resultados direcionados aos artigos com desenho experimental “in vitro”	41
5.2 Caracterização do analito	45
5.3 Tempo de fermentação	48
5.4 Temperatura de fermentação.....	51
5.5 Caracterização química e físico-química	53
5.6 Caracterização microbiológica	57
5.6.1 Qualitativa	57
5.6.2 Quantitativa.....	58
5.7 Caracterização antioxidante.....	60
5.8 Resultados direcionados aos artigos com desenho experimental “in vivo”	70
5.9 Informações adicionais obtidas por meio do contato direto com os autores	72
6 CONCLUSÃO	74
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
8 REFERÊNCIAS.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies reativas de oxigênio de interesse no estresse oxidativo.....	25
Tabela 2	Informações gerais sobre os artigos selecionados e classificação das amostras de interesse.....	44
Tabela 3	Tipos de analitos recuperados a partir das amostras de interesse para a avaliação da atividade antioxidante, e seus métodos de obtenção.....	46
Tabela 4	Tempo de fermentação (horas) para cada amostra incluída na pesquisa, e valores médios para os subgrupos de interesse, comparado aos dados de literatura científica.....	49
Tabela 5	Temperatura de fermentação para cada amostra incluída na pesquisa, e valores médios para os subgrupos de interesse, comparado aos dados de literatura científica.....	51
Tabela 6	Valores médios de pH por subgrupo de interesse, comparados à literatura.....	54
Tabela 7	Testes adicionais de caracterização físico-química relativos ao subgrupo B, comparados aos dados da literatura.....	55
Tabela 8	Capacidade média de hidrólise proteica de amostras do subgrupo C, comparada com a literatura.....	56
Tabela 9	Caracterização antioxidante das amostras do subgrupo B, em comparação com dados da literatura científica.....	62
Tabela 10	Caracterização antioxidante para as amostras do subgrupo C, em comparação com dados da literatura científica.....	64
Tabela 11	Classificação dos métodos de avaliação da atividade antioxidante e número de eventos em que foram empregados, com base nos subgrupos de amostras estudadas.....	68
Tabela 12	Classificação dos artigos que requereram contato direto com os seus autores, e as taxas de retorno e efetividade obtidas para cada grupo de artigos considerado.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Contagem bacteriana média, em UFC/mL, para os três tipos de produtos lácteos fermentados em estudo, comparados com valores de referência.....	59
Quadro 2	Caracterização do perfil antioxidante para as amostras do subgrupo A..	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da parede celular de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	20
Figura 2	Hierarquia dos níveis de evidência de acordo com os tipos de estudo.....	36
Figura 3	Fluxograma da seleção de estudos com desenho experimental “in vitro”, adaptado de Liberati et al. (2009).....	42
Figura 4	Tipos de microrganismos empregados e número de eventos em que foram utilizados, considerando a fabricação de 16 amostras de leites fermentados, leites acidófilos e iogurtes, com base em oito artigos recuperados após o alcance dos critérios de inclusão da presente revisão.....	57
Figura 5	Tipo e número de eventos em que os métodos de atividade antioxidante foram empregados na avaliação de extratos celulares de leites fermentados, leites acidófilos e iogurtes, de 16 amostras provenientes de oito artigos recuperados, após o alcance dos critérios de inclusão da presente revisão.....	67
Figura 6	Fluxograma da seleção de estudos com desenho experimental “in vivo”, adaptado de Liberati et al. (2009).....	71

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Check list PRISMA.....	91
Anexo 2	Estratégias de busca.....	93
Anexo 3	Artigos excluídos após a leitura na íntegra devido ao não cumprimento dos critérios de inclusão, considerando estudos com desenho experimental “in vitro”.....	95
Anexo 4	Artigos excluídos após a leitura na íntegra devido ao não cumprimento dos critérios de inclusão, considerando estudos com desenho experimental “in vivo”.....	97
Anexo 5	Total de amostras contidas nos oito artigos incluídos na revisão sistemática: Classificação quanto ao atendimento dos critérios de inclusão, e os motivos pelos quais as amostras foram desconsideradas da pesquisa.....	98

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABTS	Radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
DPPH	Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FAO	Food and Agriculture Organization of the United States
HPLC	High performance liquid chromatography
L.A.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
L.B.	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
L.C.	<i>Lactobacillus casei</i>
L.F.	<i>Lactobacillus fermentum</i>
L.H.	<i>Lactobacillus helveticus</i>
L.P.	<i>Lactobacillus paracasei</i>
L.R.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
S.T.	<i>Streptococcus salivarius subs. thermophilus</i>

1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres são átomos ou moléculas constituídos por um ou mais elétrons desapareados, capazes de existir de forma independente, o que justifica o termo “livres”, por se tratar de compostos altamente reativos. A atuação dos radicais livres em organismos vivos ou mesmo nos alimentos, desencadeia uma sequência de reações químicas, originando novas espécies reativas. Isso porque, quando um radical livre reage com outra espécie radicalar, uma ligação estável é formada; no entanto, grande parte dos compostos no organismo animal e humano são moléculas estáveis, e, com isso, no momento da ligação, novas espécies reativas são formadas, aumentando a instabilidade do sistema.

Geralmente, o dano causado pelos radicais livres ocorre quando estes se acumulam, e a partir disso, causam injúria ou morte celular, influenciando na patogênese de uma gama de doenças, incluindo diabetes, hipertensão, aterosclerose, obesidade, câncer, entre outras.

Além dos compostos sintéticos, amplamente conhecidos e utilizados no combate ao acúmulo e aos danos oriundos dos radicais livres, as bactérias ácido-láticas também podem ser fortes aliadas para esta finalidade. Nesse sentido, muitas pesquisas já foram divulgadas comprovando a efetividade dessa classe de microrganismos, o que favorece a utilização deles como auxiliares na fabricação de alguns tipos de alimentos, em função de sua capacidade intrínseca de atuação antioxidante, e também de outras características específicas.

Um dos gêneros bacterianos mais utilizados por suas funcionalidades e ampla possibilidade de aplicações em saúde, é o *Lactobacillus*, e, em sua constituição, a espécie *Lactobacillus acidophilus* (L.A.) possui merecido destaque. Reconhecida por seu status de microrganismo probiótico, esta bactéria Gram-positiva pode ser utilizada na matriz de um alimento derivado do leite, por exemplo, em função de sua capacidade de utilização da lactose e da formação de componentes considerados fisiologicamente ativos, os quais também estão relacionados com o resultado do processo fermentativo como um todo, ou provenientes da fermentação associada por mais de uma espécie bacteriana.

As bebidas fermentadas de origem láctea se constituem importantes tipos de alimentos em que as bactérias do gênero *Lactobacillus* são amplamente empregadas, e por isso, podem ser consideradas fortes candidatas ao consumo em

paralelo ao tratamento medicamentoso de patologias que possuem sua origem baseada na ação dos radicais livres.

Levando em consideração a atividade antioxidante das culturas puras de bactérias lácticas ou em associação com outras espécies bacterianas, a pesquisa sobre o perfil antioxidante quando L.A. é incorporado no produto final se faz importante, pois é necessário averiguar se tal funcionalidade se mantém, mesmo após o processamento de um alimento.

Uma ramificação interessante da pesquisa científica que vem se desenvolvendo consideravelmente nas últimas décadas, em razão de seus inúmeros benefícios, é a saúde baseada em evidências, que se estrutura na seleção racional de evidências científicas de uma determinada área de interesse, como modo de favorecer o alcance de conclusões, e, conseqüentemente, embasar a tomada de decisão a respeito de um problema. Neste contexto, a revisão sistemática é um recurso a ser utilizado para sintetizar dados e informações resultantes de uma pesquisa direcionada, e com isso, auxiliar na interpretação dos dados obtidos como um todo.

Assim, o perfil antioxidante de bebidas fermentadas de origem láctea preparadas a partir da ação de L.A., um importante probiótico, foi avaliado por meio de uma revisão sistemática, como ferramenta para a integração das informações obtidas e para a melhor compreensão a respeito do uso deste microrganismo na obtenção de alimentos, visando o fornecimento de produtos com características funcionais intrínsecas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Reunir evidências sobre o potencial antioxidante de bebidas fermentadas de origem láctea, quando preparadas com o probiótico *Lactobacillus acidophilus*, de forma pura, ou em associação com outras bactérias lácticas.

2.2 Objetivos específicos

- Reunir evidências para a realização de uma revisão sistemática de estudos com desenhos experimentais “in vitro” e “in vivo”, que avaliaram a atividade antioxidante de bebidas fermentadas de origem láctea, e que tiveram o *Lactobacillus acidophilus* incluído na formulação, utilizando como base a estratégia “PICOS”.
- Avaliar os estudos incluídos e, conseqüentemente, as amostras selecionadas de acordo com os dados disponíveis para aspectos como:
 - Caracterização dos analitos obtidos para a avaliação da atividade antioxidante em termos de tendência do rompimento celular, de acordo com os processos utilizados no preparo das amostras,
 - Tempo e temperatura de fermentação para as amostras avaliadas,
 - Características físico-químicas das amostras em estudo,
 - Caracterização microbiológica, nos aspectos qualitativo e quantitativo,
 - Perfil de atividade antioxidante com base nos resultados obtidos de acordo com a constituição microbiológica a que cada amostra foi preparada,
 - Perfil de metodologias analíticas empregadas na determinação da atividade antioxidante.
- Avaliar a necessidade geral da realização de contatos diretos com os autores dos artigos selecionados, bem como a taxa e a efetividade dos retornos obtidos.
- E, por fim, utilizar as informações aqui reunidas com a finalidade de poupar tempo e recursos financeiros em futuras pesquisas laboratoriais que envolvem a mesma linha de pesquisa ou correlatas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Probióticos

Conhecido desde o início do século XX, o termo probiótico foi inicialmente empregado na área médica por meio de estudos desenvolvidos na década de 60, por Lilly & Stillwell (1965). Logo após o emprego deste termo, muitas definições foram apresentadas ao longo dos anos, até que em uma consulta de peritos conjunta entre a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (WHO) estabeleceu-se a definição atualmente mais aceita, a qual considera os probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde dos hospedeiros (FAO/WHO, 2001).

Além do que engloba a definição acima, o mesmo grupo de trabalho da FAO também estabeleceu, em 2002, outros aspectos mandatórios para que os microrganismos possam receber o título de probióticos. Para isso, devem ser empregados na constituição de um produto em um nível adequado, de modo que a quantidade mínima de células viáveis alcance o trato digestório, e sejam aptas a exercerem sua atividade. Além destas características, devem apresentar comprovação clínica, e não apenas “in vitro”, que, de fato, são capazes de exercerem efeitos fisiologicamente benéficos, conforme destacado por Vandenplas (2012).

Neste contexto, quando se trata da utilização de probióticos em alimentos, faz-se importante atentar para a questão do prazo de validade do produto, em que, para a alegação da propriedade probiótica, o produto deve manter o número de células bacterianas estáveis e viáveis durante o tempo de prateleira estabelecido, o que caracteriza um dos grandes desafios tecnológicos do preparo de um alimento com tal alegação (PUUPONEN-PIMIÑ et al., 2002; VANDENPLAS; HUYS & DAUBE, 2015).

Com relação à quantidade mínima de células microbianas que devem estar contidas em um alimento probiótico, ainda não há um consenso mundial, sendo que cada agência regulatória estabelece a sua própria característica. No caso da legislação brasileira, a faixa mínima recomendada para um alimento ser considerado probiótico é entre 10^8 e 10^9 UFC/porção, sendo que níveis inferiores podem ser

aceitos, desde que dados de eficácia sejam apresentados (BRASIL, 2008). Esta exigência se baseia na diminuição do número de bactérias ao longo da passagem pelo trato digestório. Portanto, há a necessidade de se partir de um nível maior de células viáveis, para que um número suficiente destas células alcance o alvo intestinal de forma a obter o benefício ou a ação desejada (VANDENPLAS; HUYS & DAUBE, 2015).

No que se refere à ação fisiológica dos probióticos, muitos benefícios já foram descritos, incluindo o metabolismo facilitado da lactose por indivíduos intolerantes aos produtos lácteos (LABAYEN et al., 2001; PINTO et al., 2015), o estímulo do sistema imunológico (PUUPONEN-PIMIÄ et al., 2002; URGELL et al., 2005), o favorecimento da absorção de minerais (SAAD, 2006) bem como o estímulo para a produção de vitaminas (GOMES & MALCATA, 2002; SAAD, 2006).

Outros pontos positivos, e não menos importantes, como a prevenção de doenças, tais como a diabetes, hipertensão, obesidade, diarreia, entre outras, além da redução de efeitos colaterais e de reações alérgicas também podem ser alcançados através da utilização e consumo regular de produtos contendo probióticos (CASTELLAZZI et al., 2013; MARTEAU & SEKSIK, 2004; SZAJEWSKA, 2013), sendo que os efeitos biológicos são específicos de acordo com cada cepa bacteriana (RIJKERS et al., 2011).

3.2 Frações celulares

Uma alternativa para a utilização de bactérias no preparo de alimentos, ou mesmo no preparo de amostras para ensaios “in vitro”, são os materiais obtidos a partir das células bacterianas, também conhecidos como as frações celulares, sendo determinantes de acordo com o que se pretende pesquisar. Tais afirmações se baseiam no fato de que diferentes compostos podem ser recuperados de diferentes compartimentos celulares bacterianos (JANKOVIC et al., 2010), o que determina o modo com que as células serão manipuladas.

Os componentes bacterianos utilizados com maior frequência, além da própria célula intacta (ZANONI et al., 2008), incluem o conteúdo intracelular (LI et al., 2012), o sobrenadante obtido do cultivo celular (BING et al., 1998; ZHANG et al., 2012) e o exopolissacarídeo (MAKINO et al., 2016). Assim, para que seja possível atingir tais materiais celulares, a primeira etapa é a promoção da desintegração das células (KULA & SCHÜTTE, 1987), que pode ocorrer por diferentes métodos,

incluindo físico, químico, microbiológico ou enzimático (BECERRA et al., 2000; CHISTI & MOO-YOUNG, 1986; GECIOVA; BURY; JELEN, 2002; KULA & SCHÜTTE, 1987; KWON & JEWETT, 2015). Eventualmente, a dificuldade no rompimento das células bacterianas se deve à complexidade de sua composição, como pode ser constatado por meio do exemplo da estrutura celular de L.A., a qual é constituída por uma membrana plasmática bilipídica incorporada de proteínas, envolvida por uma parede multicamadas de peptideoglicanos, com polissacarídeos, ácido teicóicos e lipoteicóicos, e por fim, um envelope de proteínas, representado pela camada S (S-layer), conforme ilustrado pela Figura 1.

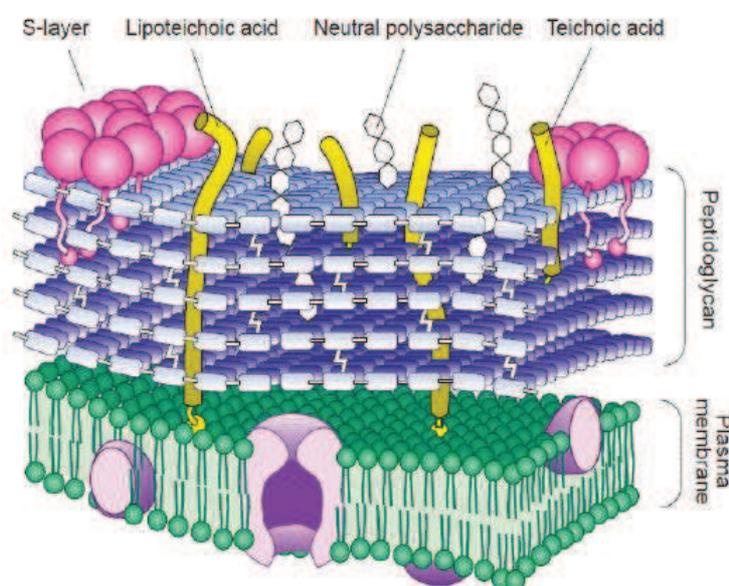


Figura 1 Estrutura da parede celular de *Lactobacillus acidophilus* (DELCOUR et al., 1999)

Com relação à aplicação das frações bacterianas em alimentos, um dos alvos de interesse é o alcance dos benefícios tecnológicos de fabricação, e neste contexto muitos relatos já foram descritos na literatura científica para os mais diversos propósitos, como o aprimoramento do conteúdo proteico de um alimento, a atividade antioxidante, o favorecimento da estabilidade e das características reológicas de um produto, entre outras finalidades (HUGENHOLTZ; ZOON, 2002; KIM et al., 2006; RUAS-MADIEDO; SAADATZADEH et al., 2013; XING et al., 2015). Além disso, a utilização de frações celulares bacterianas também visa o alcance de diversos benefícios à saúde (HOR & LIONG, 2014; RODRIGUÉZ, C. et al., 2009). No que se refere especialmente à atividade antioxidante, ambas as frações, como o conteúdo intracelular das células bacterianas e o exopolissacarídeo, por exemplo, além das células bacterianas intactas, parecem apresentar tal funcionalidade,

embora alguns autores destacam que o conteúdo intracelular é a fração que possui a melhor característica (OU et al., 2009; SAADATZADEH et al., 2013).

3.3 *Lactobacillus acidophilus* – Características gerais

Pertencente ao gênero *Lactobacillus spp.*, o L.A. é uma das espécies bacterianas mais conhecidas e mundialmente mais estudada (ALTERMAN et al.; 2005; GILLILAND & RICH, 1990; LI et al., 2016), devido à gama de funcionalidades e aplicações que apresenta (VANDENPLAS; HUYS & DAUBE, 2015). Trata-se de um bacilo Gram-positivo, não formador de esporos, com preferência por ambiente microaerófilo (5-10% de CO₂), podendo também crescer e se desenvolver em ambientes de total anaerobiose, com uma temperatura ótima de crescimento na faixa de 37 a 41°C (GOMES & MALCATA, 1999; JAFAREI & EBRAHIMI, 2011). Além disso, essa espécie também faz parte da microbiota normal dos humanos (SLOVER & DANZIGER, 2008), o que, entre outros aspectos, caracteriza-na como uma bactéria probiótica (SANDERS & KLAENHAMMER, 2001).

Com relação ao metabolismo fermentativo dos açúcares, é considerada prioritariamente homofermentativa, tendo como principal produto da fermentação das hexoses, o ácido lático, considerando a via de Embden-Meyerhof-Parnas. Eventualmente pode também apresentar um metabolismo heterofermentativo, em que além do ácido lático, o CO₂, o etanol e/ou o ácido acético podem ser obtidos na mesma proporção (GOMES & MALCATA, 1999; HAMMES & VOGEL, 1995).

Devido às suas propriedades intrínsecas e por ser considerado uma bactéria probiótica, o L.A. possui ampla versatilidade de aplicações, podendo ser utilizado desde a fabricação de diferentes tipos de alimentos, suplementos alimentares, medicamentos e até cosméticos (IRAVANI; KORBKANDIH & MORMOHAMMADI, 2015; SAITO, 2004). Estas aplicações se aprimoraram nos últimos anos e atualmente muitos grupos de pesquisa se dedicam a elucidar os mecanismos de ação deste microrganismo, bem como isolar constituintes celulares, ou mesmo aplicar o microrganismo frente a condições específicas, para avaliação de seu comportamento.

3.3.1 *Lactobacillus acidophilus* e o potencial antioxidante

A capacidade antioxidante de bactérias lácticas tem sido reportada desde décadas passadas (LIN & YEN, 1999), sendo que o L.A. é notadamente conhecido

por apresentar esta característica (AMARETTI et al., 2013; EJTAHED et al., 2014; KIM et al., 2006). Tal funcionalidade favorece o uso dessa bactéria láctica frente aos mais diversos quadros clínicos relacionados com desordens provocadas por radicais livres e/ou o seu desequilíbrio. Para essa finalidade, ensaios “in vitro” e “in vivo” são extensamente aplicados de modo a melhor esclarecer o mecanismo de ação dos probióticos, bem como estabelecer as maneiras mais adequadas de consumo, para que a terapia conjunta entre medicamentos e probióticos seja aliada, e resultados de melhor qualidade sejam alcançados (SAIDE & GILLILAND, 2005; XIE et al., 2015).

Da mesma forma como o que ocorre no organismo humano, as bactérias também são capazes de minimizar a geração de radicais livres, por meio de mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos (ZHANG et al., 2011), embora não atuem com total eficiência, o que faz com que os danos causados pelas espécies instáveis devam ser constantemente reparados (HALLIWELL et al., 1995a).

Em um estudo promovido por Wang et al. (2006), ao avaliarem a atividade antioxidante de leite fermentado com bactérias ácido-lácticas (L.A. ou S.T.) e também com bifidobactérias (*Bifidobacterium infantis* ou *Bifidobacterium longun* B6), observaram que os efeitos antioxidantes estão diretamente relacionados com a cultura inicial escolhida para a fermentação do produto e, a partir disso, foi ressaltada a importância tanto da escolha correta dos ingredientes a constituírem um alimento funcional, como da cultura fermentadora (JIMÉNEZ et al., 2008).

Com relação ao número de células bacterianas probióticas a ser utilizado em uma preparação a fim de se obter o efeito desejado, Amaretti et al. (2013) em suas determinações verificaram que um produto, quando consumido em quantidade mínima de 10^8 UFC/dia, consegue combater o estresse oxidativo e limitar a formação de grande quantidade de compostos reativos.

Tais informações reforçam o entendimento de que o uso de bactérias lácticas probióticas, em especial, de L.A., apresenta efeito positivo quando utilizado no combate de quadros clínicos relacionados ao estresse oxidativo, com destaque para pesquisas voltadas ao combate ao câncer (ALMEIDA et al., 2015; DESROUILLÈRES et al., 2015; GHANY et al., 2014). Nesse sentido, os estudos estão alinhados com o objetivo de incorporar probióticos na alimentação humana, com a finalidade de evitar a auto-oxidação dos alimentos, e, além disso, como profilaxia ou mesmo adjuvante em tratamentos medicamentosos de doenças interligadas ao estresse oxidativo.

3.3.2 *Lactobacillus acidophilus* e aplicações em saúde

Nos últimos anos, uma ampla quantidade de estudos foram publicados tendo o L.A. como agente promotor de saúde. Essa espécie bacteriana parece promover resultados benéficos não apenas em aspectos gerais, mas também quando utilizadas em tratamentos das mais variadas doenças, como por exemplo: diabetes (ANDREASEN et al., 2010; ANKOLEKAR et al., 2012; EJTAHED et al., 2012; YADAV et al., 2007; YADAV; JAIN; SINHA, 2008), hipertensão (APOSTOLIDIS et al., 2007; HATA et al., 1996), obesidade (KADOOKA et al., 2010; LUOTO et al., 2010; OGAWA et al., 2015), diarreia (DE VRESE et al., 2010; MARTEAU & SEKSIK, 2004; VANDERHOOF et al., 1999), alergias de origem alimentar ou não (CASTELLAZZI et al., 2013; SZAJEWSKA, 2012), câncer (CHOI et al., 2006), entre outros quadros clínicos.

Tais constatações favorecem o uso do referido probiótico tanto no desenvolvimento de novos alimentos, bem como de produtos alternativos. Com isso, os alimentos com propriedades funcionais podem ser utilizados em associação aos medicamentos de escolha para os referidos tratamentos, na condição de que, visando a obtenção dos benefícios declarados, o consumo dos probióticos seja mantido regularmente (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

3.4 Radicais livres e Estresse Oxidativo

De acordo com Cheeseman & Slater (1993), radicais livres são espécies químicas constituídas por um elétron não pareado, que podem ser consideradas como fragmentos de moléculas e geralmente são muito reativas. No momento do estresse oxidativo, os radicais são formados em células e tecidos, produzindo uma cascata de radicais secundários reativos, capazes de atacar eficientemente as biomoléculas (GEBICKI, 2016). Para Slater (1984), proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos são os alvos que mais sofrem modificações químicas e danos causados pela alta reatividade dos radicais livres, danos estes que caracterizam o estresse oxidativo. Além disso, se os radicais livres forem produzidos (“in vivo” ou “in vitro”) na quantidade que possa superar os mecanismos naturais de defesa, certamente distúrbios metabólicos e celulares ocorrerão por diferentes modos.

Um dos mais graves danos oriundos da alta reatividade dos radicais livres são aqueles que acometem o DNA e o RNA celular, podendo afetar seriamente a saúde

humana, já que as quebras em cadeias de DNA e o acúmulo de bases danificadas podem dar origem ao processo oncológico (BARREIROS & DAVI, 2006).

No caso dos alimentos, a atuação dos radicais livres inicia a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, decompondo os hidroperóxidos lipídicos para radicais livres (AIKENS & DIX, 1991; AYALA; MUÑOZ & ARGÜELLES, 2014). Os compostos instáveis são capazes também de decompor vitaminas e outros componentes orgânicos, o que afeta diretamente as características sensoriais e a aceitabilidade dos alimentos (HALLIWELL et al., 1995b). Além disso, atuam favorecendo a ocorrência das reações de Maillard, tanto mais intensa quanto maior for o processamento térmico, o que confere, dessa forma, aspectos desejáveis à alguns alimentos, como é o caso da coloração diferenciada do doce de leite, por exemplo (FEIHRMANN, 2004).

Os radicais livres, por sua vez, são constantemente formados por meio de diversos tipos de reações orgânicas, e à medida que se acumulam no corpo, os danos são evidenciados (LOBO et al., 2010). Alguns dos exemplos mais comuns de radicais livres bem como as suas descrições são apresentados na Tabela 1.

Para combater a ação destes compostos, substâncias antioxidantes dos próprios metabolismos, humano e microbiológico, são constantemente formadas. Além dessas, algumas substâncias funcionais contra radicais livres também são obtidas a partir dos alimentos, ou ainda, sintetizadas (PIETTA, 2000; RAMALHO & JORGE, 2006).

Tabela 1 Espécies reativas de oxigênio de interesse no estresse oxidativo

Espécies derivadas do oxigênio	
Ânion-radical superóxido O_2^-	Gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, através de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de O_2 . Rapidamente desaparece em solução aquosa por reação de dismutação: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ Em solução aquosa é um forte agente redutor. Sua habilidade em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} pode acelerar a reação de Fenton: $O_2^- + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ Em solução aquosa é um oxidante fraco, porém pode formar ERN: $O_2 + NO^- \rightarrow ONOO^-$ É permeável a membranas. Em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, é um dos microbicidas mais importantes.
Peróxido de hidrogênio H_2O_2	Intermediário formado pela reação de dismutação de O_2^- catalisada pela enzima SOD, pela redução de $2e^-$ na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases "in vivo", localizadas nos peroxissomas. É muito difusível dentro e entre as células in "vivo". É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera OH^- , através da reação de Fenton: $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \cdot OH + \cdot OH$
Radial hidroxila $\cdot OH$	É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas e inativação enzimática, peroxidação lipídica. Âmbito limitado de ação (poucos diâmetros moleculares).
Radicais peroxila (RO_2^-) e alcóxila (RO^-)	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica.
Oxigênio singlete $^1O_2^*$	Estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação. $^1O_2^*$ pode ser gerado, entre outras reações, por transferência de energia a partir de um sensibilizador S, no estado excitado tripleto ($^3S^*$) (porfirinas, clorofila e riboflavina) para o oxigênio. O sensibilizador S absorve energia e deixa o estado fundamental singlete (S), passando para o estado excitado singlete ($^1S^*$), a partir do qual é convertido, por cruzamento intersistema, para o estado excitado tripleto. ($^3S^*$): $S \rightarrow ^1S^* \rightarrow ^3S^*$; $^3S^* + ^3S^* \rightarrow S + ^1O_2^*$
Ozônio O_3	Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos.

Fonte: VASCONCELOS et al., 2007

3.5 Antioxidantes

De acordo com a definição apresentada por Halliwell et al. (1995), um composto pode exercer ações antioxidantes "in vivo" ou em alimentos por inibição da

geração de radicais livres, ou pela eliminação direta destes radicais, sendo que, quando presente em menor concentração em relação ao composto oxidável, os antioxidantes retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato.

Para que esta atuação seja possível, as células desenvolveram um conjunto de defesas antioxidantes para prevenir a formação de radicais livres ou limitar os seus efeitos danosos (CHEESEMAN & SLATER, 1993). Já no caso dos alimentos, a atuação dos antioxidantes ocorre com a finalidade de evitar o processo de rancificação e manutenção da qualidade nutricional (HALLIWELL, 1995).

Com relação à origem e aos mecanismos de ação dos compostos antioxidantes, estes podem ser de origem endógena, dietética ou sintética, e atuar de forma enzimática ou não enzimática (BARBOSA et al., 2010; RAMALHO & JORGE, 2006; SOUSA et al., 2007).

No que se refere aos mecanismos enzimáticos, vários são os exemplos possíveis de serem citados, os quais incluem destacadamente os compostos endógenos, como a glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase, catalase, entre outros, capazes de prevenir a formação de radicais tóxicos (HALLIWELL et al., 1995a; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; ZHANG et al., 2011).

Quanto aos mecanismos não enzimáticos, trata-se de compostos como a glutathione, peptídeos da histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), entre outros. Além desses, outros compostos também atuam de forma não enzimática, embora sejam provenientes da alimentação, como o alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides, entre outros, importantes na defesa contra os danos cumulativos de espécies oxidativas (BARREIROS & DAVID, 2006; HALLIWELL et al., 1995a; PIETTA, 2000). E no que se refere aos antioxidantes sintéticos, utilizados na produção de alimentos, medicamentos e cosméticos, é possível mencionar como exemplos principais, o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG) (NAMIKI, 1990).

Nesse sentido, a importância dos compostos com atividade antioxidante se dá em diversos âmbitos, o que engloba a ação anti-envelhecimento (PALIDORI & SCHOLTES, 2016), a prevenção e o combate de vários tipos de doenças que possuem relação com a atividade dos radicais livres (HEYLAND et al., 2005), a prevenção da oxidação dos alimentos, bem como a manutenção da viabilidade e de suas propriedades funcionais (LIN & YEN, 1999). A importância destes compostos,

ainda, é baseada na eficiência da atividade antioxidante que possuem, a qual pode ser mensurada de diversas maneiras (SONGISEPP et al., 2005; THAIPONG et al., 2006), o que possibilita classificar substâncias, produtos, alimentos, medicamentos e microrganismos de acordo com a potencialidade antioxidante.

3.6 Métodos de avaliação da atividade antioxidante “in vitro”

Com o objetivo de estudar o potencial antioxidante “in vitro”, uma considerável variabilidade de metodologias analíticas são disponíveis, as quais, atuando por meio de diferentes mecanismos, auxiliam na estimativa e na caracterização do perfil antioxidativo das entidades químicas ou microbiológicas em estudo. Dentre estes métodos, alguns podem ser destacados em função de sua alta aplicabilidade na prática laboratorial, como os exemplos descritos a seguir.

3.6.1 Captura do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

O radical DPPH é um radical livre de intensa coloração púrpura, preparado em meio alcoólico (geralmente metanol), em que, ao interagir com compostos capazes de estabilizar o radical livre, promove a redução da coloração do meio, transformando-o em amarelo ou amarelo claro, com conseqüente redução da absorvância do meio, dependendo da capacidade antioxidante do composto testado, caracterizando com isso, reações de transferência de elétrons (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Quanto aos parâmetros do método, a reação pode ser lida em diversos comprimentos de onda que permeiam a faixa de 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), 517 nm (WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011), 523 nm (KUMAR & KUMAR, 2016), 540 nm (MÜLLER; FRÖHLIC; BÖHM, 2011) ou outros, de acordo com as condições escolhidas. Além disso, o padrão utilizado para as comparações também pode variar, sendo que os mais utilizados são o BHT (FARVIN et al., 2010), trolox (UNAL et al., 2013), ácido ascórbico (WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011), carotenóides (MÜLLER; FRÖHLIC; BÖHM, 2011), entre outros.

No entanto, mesmo sendo um método popular, possui como desvantagem o fato de não favorecer a análise de compostos hidrofílicos, uma vez que possui melhor solubilidade em meio orgânico, em especial os meios alcoólicos (SAH et al., 2014).

3.6.2 Captura do radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

Também caracterizado por reações de descoloração e de transferência de elétrons, o método de captura do radical ABTS tem a sua ação baseada na atividade antioxidante dos compostos avaliados, na concentração, bem como na duração das reações químicas a que é submetido. Como resultante, maior ou menor é a extensão dos radicais ABTS estabilizados, o que pode resultar na redução da absorvância do sistema, em função da mudança na coloração, de verde intenso para tons mais claros, em caso de resultado positivo para atividade antioxidante (RE et al., 1999; RUFINO et al., 2007). Quanto ao comprimento de onda, pode haver variações conforme a metodologia empregada, porém a faixa de 734 nm parece ser uma das mais utilizadas (ALOGLU & ÖNER, 2013; AMARETTI et al., 2013; MORAN; RYAN, 2011; MÜLLER; FRÖHLIC; BÖHM, 2011; WOOTTON-BEARD). Nesse método ainda, o trolox geralmente é o padrão empregado como comparativo (RE et al., 1999).

Além disso, diferentemente do que ocorre com o método de captura do radical DPPH, o radical ABTS é solúvel em ambos os meios, aquoso e orgânico, e, assim, a atividade de compostos hidrofílicos ou lipofílicos pode ser avaliada por meio desse método (TANG et al., 2010).

3.6.3 Atividade eliminatória do radical hidroxila

Os radicais hidroxila são conhecidos por serem os mais reativos radicais de oxigênio, capazes de reagir com todas as biomacromoléculas funcionais das células vivas, podendo induzir a severos danos celulares. Por isso, a atividade eliminatória desses radicais configura um papel importante na redução do dano oxidativo das células (AGUIAR et al., 2007; ZHANG et al., 2011). Outro importante ponto relacionado aos radicais hidroxila, é que acaso forem formados próximos ao DNA, é possível que ataquem as bases purinas e pirimidinas, causando mutações (HALLIWELL, 1994), daí a necessidade de serem eliminados.

O método se baseia na reação de Fenton, em que o peróxido de hidrogênio é utilizado como um iniciador da reação, juntamente com sais de Fe^{+3} . O peróxido de hidrogênio atua como um potencial doador de radicais hidroxilas para a reação, e a espécie química, vegetal ou microbiológica, é avaliada com base em sua habilidade

eliminatória dos radicais hidroxila formados em função da referida reação, ou mesmo em permanecer em um ambiente contendo tais espécies (VANNUCCHI et al., 1998).

A reação é lida pela mudança na absorbância e consequente redução do valor lido em espectrofotômetro quanto maior for a capacidade do composto estudado em eliminar este tipo de radical livre, o que representa a característica típica de compostos que de fato apresentam atividade antioxidante. A faixa de absorbância também varia de acordo com o método utilizado, geralmente incluindo valores entre 312-426 nm (KIM et al., 2006), 510 nm (SUN et al., 2009), ou outros.

3.6.4 Poder redutor

Esta metodologia é empregada para avaliar o potencial antioxidante de compostos químicos, por meio de sua capacidade em reduzir, ou doar elétrons, para substâncias instáveis e altamente reativas. Os compostos que possuem capacidade de redução reagem com ferricianeto de potássio (Fe^{+3}) para formar ferrocianeto de potássio (Fe^{+2}), o qual reage com o cloreto férrico para formar um complexo de ferro, com máxima absorção em 700 nm (SINGHAL; PAUL; SINGH, 2014). Para este método, além do ácido ascórbico, o BHT, BHA, trolox, entre outros compostos, são considerados potenciais padrões, sendo que, quanto maior a absorbância da mistura, maior a atividade antioxidante do meio, bem como o poder redutor (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; JAYAPRAKASH; SINGH; SAKARIAH, 2011).

Apesar de ser amplamente utilizada, a empregabilidade deste método tem sido discutida, e alguns autores como Cheng & Li (2004) sugerem que, apesar de contribuir para a estimativa do potencial antioxidante, o ideal é que o método do poder redutor seja sempre utilizado em conjunto com outras técnicas analíticas, pois de forma isolada não apresenta resultados suficientemente aceitáveis.

3.6.5 Atividade eliminatória dos íons metálicos

Também baseado na formação de um complexo colorido, o método que avalia a atividade eliminatória dos íons metálicos em um sistema orgânico é capaz de promover a redução da coloração do complexo vermelho formado, de acordo com o potencial antioxidante das substâncias avaliadas (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013), o que, conseqüentemente, reflete o potencial redox dos compostos estudados (MÜLLER; FRÖHLIC; BÖHM, 2011).

Dos metais de transição, o ferro é um dos mais importantes devido à sua biodisponibilidade. No entanto, por existir em diversos tipos de estados de oxidação, participa ativamente de reações de oxidação, favorecendo a formação de radicais livres (BARREIROS & DAVI, 2006).

A necessidade da eliminação dos íons metálicos se dá, portanto, em função do papel catalítico que possuem, levando à geração de espécies muito reativas a partir de espécies pouco reativas, e com isso, desencadeando danos oxidativos. Por isso, a capacidade antioxidante pode ser avaliada de acordo com o grau de eliminação de íons metálicos, pois na medida em que são eliminados, menor a possibilidade da ocorrência de reações de oxidação (LEE et al., 2005).

3.6.6 Demais metodologias analíticas

Outros métodos para avaliação da atividade antioxidante também podem ser empregados, na maioria das vezes em associação a esses já mencionados. Dentre estes métodos, é possível citar aqueles envolvidos com a inibição da auto-oxidação do ascorbato, capacidade de absorção do radical oxigênio, doseamento de fenóis totais, inibição da peroxidação lipídica, glutathione, íon superóxido, íon superóxido dismutase, íon peróxido, ácido tiobarbitúrico, tiocianato férrico, entre outros (ALAM; BRISTI; KIM et al., 2006; RAFIQUZZAMAN, 2013; VIRTANEN et al., 2006).

Além desses, ainda é possível estimar a atividade antioxidante indiretamente por meio do método de hidrólise proteica, uma vez que muitos autores se baseiam no princípio de que, quanto maior a capacidade promotora da hidrólise de proteínas, maior a tendência em se elevar a capacidade antioxidante, em função da atividade funcional dos peptídeos bioativos gerados a partir da hidrólise das proteínas (FARVIN et al., 2010; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2014; RAMESH et al., 2012).

3.7 Métodos de avaliação da atividade antioxidante “in vivo”

Para avaliação da atividade antioxidante “in vivo” também existem várias metodologias analíticas, as quais, atuando por meio de diferentes mecanismos, auxiliam na determinação do efeito antioxidante de alimentos, medicamentos, substâncias químicas ou microbiológicas em estudo, por meio da coleta de sangue ou tecidos. Dentre esses métodos, alguns podem ser destacados em função de sua alta aplicabilidade na prática laboratorial, como os exemplos descritos a seguir.

3.7.1 Doseamento da peroxidação lipídica (LPO)

Trata-se de uma das metodologias utilizadas com maior frequência para amostras biológicas provenientes de testes “in vivo”, de acordo com a revisão divulgada por Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013). Estes autores descrevem que a peroxidação lipídica é um processo autocatalítico, sendo uma consequência comum da morte celular, e tende a ocorrer em processos de inflamação tecidual, câncer, toxicidade pelo uso de xenobióticos, bem como do processo natural de envelhecimento. Além disso, este processo de oxidação tem como alvo os lipídeos que contém ligações duplas entre carbonos, em especial, ácido graxos poli-insaturados, os quais originam como um dos produtos principais, o malondialdeído, que nos testes analíticos, é considerado como um indicador da peroxidação lipídica (AYALA, MUÑOZ E ARGÜELLES, 2014).

No geral a reação ocorre entre o resíduo de malonaldeído, se presente na amostra, em meio ácido em que o reagente ácido tiobarbitúrico se faz presente, levando à formação de compostos de coloração rosada, podendo ser mensurados por métodos colorimétricos ou fluorimétricos. O resultado é expresso em número de mols de substâncias relacionadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) / miligrama de proteína (NIKI, 2014).

3.7.2 Glutathione redutase (GR)

Tendo um importante papel na eliminação celular de radicais livres, que por sua vez comprometem e danificam o funcionamento das células, a glutathione redutase confere tolerância ao estresse e possui a habilidade de alterar o estado de redução de componentes importantes da cadeia de transporte de elétrons, por meio da catálise reacional (GILL et al., 2013). A principal reação envolvida por essa enzima é a redução da glutathione oxidada favorecendo a formação de glutathione reduzida, o que ocorre em paralelo com a oxidação do NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). Dessa forma, a atividade da glutathione redutase é acompanhada pela reação de oxidação de $1\mu\text{M}$ de NADPH/min, com base nas condições preestabelecidas pelo método de escolha (ALAM; BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013).

3.7.3 Glutationa peroxidase (GSHPx)

É uma enzima intracelular presente nos tecidos de todas as espécies animais, responsável pela catálise da reação dos hidroperóxidos com a glutatona reduzida, favorecendo a formação principalmente da glutatona dissulfeto. A metodologia empregada para a avaliação da atividade dessa enzima acompanha a conversão de NADPH em NADP, com resultado expresso em termos de miligrama de proteínas (ALAM; BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013), ou em mili Unidade de NADPH convertido em NADP+, por miligrama de proteína (um/mg) (MASEKO et al., 2014), dependendo da metodologia empregada.

3.7.4 Glutationa-S-transferase (GSt)

Esta enzima também atua na defesa do organismo contra a toxicidade de compostos eletrófilos, contra o estresse oxidativo, assim como na detoxificação celular, daí a importância de se avaliar a sua atividade como um modo de verificação da proteção celular, ou do início de um processo patológico diretamente relacionado ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio no organismo vivo (PERPOROPOULOU et al., 2016).

De acordo com a revisão bibliográfica apresentada por Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013), o método de avaliação é espectrofotométrico, por meio do acompanhamento da redução da absorbância. Ainda nesse aspecto, Némethi, Poór e Gregus (2015) publicaram recentemente um estudo comparativo entre um método espectrofotométrico para a avaliação da atividade da glutatona-s-transferase, e um método desenvolvido empregando-se HPLC (high performance liquid chromatography), acompanhando da mesma forma a atividade enzimática por meio da leitura em absorbância ao final da técnica, porém, demonstrando a maior especificidade e sensibilidade deste método.

3.7.5 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase está relacionada com a conversão do radical superóxido, um radical livre danoso ao ambiente celular, em peróxido de hidrogênio, com a finalidade de combater a ação das espécies reativas presentes no meio celular. Dessa forma, a avaliação da atividade da referida enzima atua como uma estimativa da atividade antioxidante de uma amostra, uma vez que a sua ação

regula o ciclo de redução celular (SARSOUR et al., 2014). Além disso, a remoção dos radicais livres por esta ação enzimática pode configurar uma importante estratégia preventiva contra o desenvolvimento de várias doenças (CARILLON et al., 2013).

A medida da atividade enzimática é feita pela alteração na absorvância após as reações químicas, e a unidade de expressão afere-se em unidades de enzima por miligrama de proteína (u/mg de proteína) (ALAM; BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013).

3.7.6 Catalase (CAT)

A catalase tem a sua ação relacionada com a degradação do peróxido de hidrogênio, e conseqüente obtenção de água e oxigênio molecular. Isto ocorre em função da ação oxidante conferida pelo peróxido de hidrogênio, por isso, quanto maior a capacidade de eliminação do peróxido de hidrogênio acumulado nas células, mais protegido estará o sistema contra a oxidação (HUANG; OU & PRIOR, 2005).

Com relação ao método analítico, utiliza-se como material base, o lisado eritrocitário, o qual, após a reação química em presença de peróxido de hidrogênio, terá a atividade da enzima mensurada espectrofotometricamente (240 nm), como sugerido por Srikanta; Siddaraju & Dharmesh (2007).

3.8 Alimentos de interesse no aspecto antioxidante

3.8.1 Iogurte e outras bebidas fermentadas de origem láctea

De origem Turca, o termo “iogurte” representa um alimento que faz parte da dieta humana há milhares de anos, sendo conhecido, no passado, como um alimento coagulado ou engrossado. Os primeiros relatos disponíveis sobre iogurtes, datam de aproximadamente 6000 anos a.C., sendo que no século XX, um estudante búlgaro atribuiu os benefícios do iogurte às bactérias ácido-láticas (McGEE, 2004).

Em nível mundial, o iogurte é amplamente conhecido como um alimento altamente nutritivo e saudável, em função dos benefícios gerados pela fermentação bacteriana do leite, benefícios estes que podem variar de acordo com a cepa ou mesmo com a combinação de cepas bacterianas utilizadas no processamento (FISBERG & MACHADO, 2015; NIKKHAH, 2014).

No Brasil, o consumo de iogurte praticamente triplicou nos últimos 15 anos, o que resulta em uma grande oportunidade de expansão de negócios e exportações no que se refere ao ramo do agronegócio, com constante potencial de ampliação, dadas as propriedades funcionais a que o iogurte se relaciona. Em termos quantitativos, as notícias do mercado brasileiro indicam que o consumo aumenta em torno de 5% ao ano, em função principalmente do aumento do poder aquisitivo da população (NUVLAC, 2015; SBA, 2015). No entanto, o atual cenário econômico do Brasil deverá refletir negativamente nestes números para as próximas estimativas, uma vez que em 2016 a produção de leite parece ter recuado em 3%, resultando em preços mais altos que podem afetar, por consequência, o consumo de queijo e iogurtes, como relatado por Zoccal (2016).

Em adição ao iogurte, outros leites fermentados com aspectos semelhantes estão incluídos na atual legislação brasileira, os quais, por sua vez, também possuem importância nutricional e fisiológica, representando uma considerável parcela do consumo dos derivados lácteos no Brasil e no mundo, e, portanto, com potencial interesse comercial, sendo eles, o leite acidófilo, o kefir, o koumys e a coalhada (BRASIL, 2007). Adicionalmente, a inserção de probióticos no preparo destes tipos de alimentos vem representado uma importante aposta das indústrias e dos grandes centros de pesquisa, por aprimorarem as características físicas, químicas, sensoriais e funcionais dos alimentos (JANKOVIC et al., 2010; RIJKERS et al., 2011; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

Em suma, devido aos possíveis benefícios relacionados aos iogurtes e demais bebidas fermentadas de origem láctea, bem como da possibilidade de modulação das propriedades funcionais na medida com que se definem as culturas fermentadoras, essa classe de alimentos foi eleita como um dos objetos de estudo da presente revisão.

3.9 Saúde baseada em evidências

A saúde baseada em evidências representa um elo entre a boa pesquisa científica e a prática clínica. Embora essa vertente do conhecimento científico possa ser empregada nas mais diversas áreas, a medicina ainda é a que mais se apodera desta prática e de seus resultados, utilizando ferramentas da epidemiologia clínica, da estatística, da metodologia científica e da informática para debater a informação

existente, criar a pesquisa e gerar conhecimento útil na atuação em saúde (EL DIB & ATALLAH, 2006).

Os princípios da saúde baseada em evidências, por sua vez, envolvem as provas científicas existentes e disponíveis no momento da pesquisa, com boa validade interna e externa, para que seja possível aplicar os resultados obtidos nas decisões da prática clínica (EL DIB, 2007). Neste contexto, o conceito de validade interna envolve a extensão em que o desenho e a condução do estudo previnem a ocorrência de vieses (KHORSAN & CRAWFORD, 2014). Já a validade externa, é entendida como a extensão em que os resultados alcançados podem ser generalizados (PERSUAD & MAMDANI, 2006; STECKLER & McLEROY, 2008).

Para a aplicação desse tipo de pesquisa, duas classificações de estudos são possíveis, as quais incluem as revisões sistemáticas quantitativas e qualitativas. As revisões quantitativas sumarizam os resultados dos estudos que originaram a pesquisa por meio de métodos estatísticos, resultando em um estudo de meta-análise. Por outro lado, as revisões qualitativas agrupam os resultados e os apresentam de forma conjunta, sem sumariá-los, caracterizando a revisão sistemática. Seguindo esse raciocínio, Berwanger et al. (2007) relatam que, quando aliadas, a revisão sistemática com a meta-análise fornecem a maior relevância clínico-epidemiológica, na escala das evidências clínicas. A representação dos tipos de estudos são demonstrados pela pirâmide na Figura 2, em que o nível de evidência gerado por cada um aumenta em direção ao topo da pirâmide.

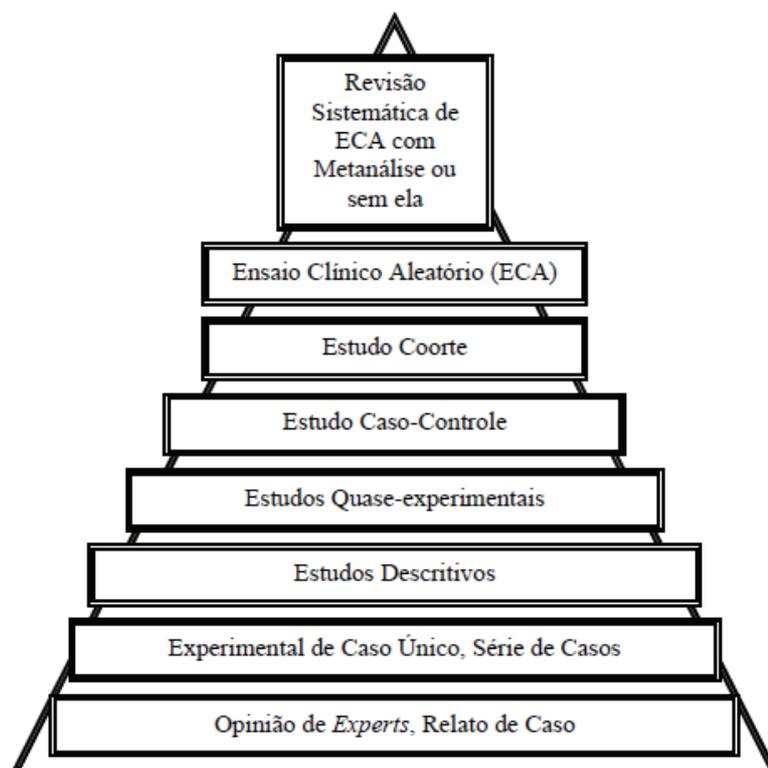


Figura 2 Hierarquia dos níveis de evidência de acordo com os tipos de estudo (SAMPAIO & MANCINI, 2007).

3.9.1 Revisão sistemática qualitativa

Considerada como um estudo secundário, a revisão sistemática atua como um novo delineamento de pesquisa, a qual se trata de um tipo de investigação focada em uma questão bem definida, visando identificar, selecionar, avaliar e sintetizar as evidências relevantes disponíveis. Além disso, quando representa boa qualidade, a revisão sistemática é considerada o melhor nível de evidência para tomadas de decisão (GALVÃO & PEREIRA, 2014), apresentando, dessa forma, vantagem sobre as revisões bibliográficas tradicionais (EL DIB, 2007).

No que se refere à construção desse tipo de revisão, é válido destacar que ela se baseia em métodos sistemáticos, selecionados em busca da redução do risco de viés metodológico, em que, por meio da avaliação da qualidade dos estudos incluídos, resultados mais confiáveis devem ser providos à uma pesquisa (HIGGINS & GREEN, 2011; SOUSA & RIBEIRO, 2008).

Entretanto, para que seja possível alcançar tais resultados, algumas etapas iniciais precisam ser consideradas, incluindo a definição do objetivo da revisão, a identificação da literatura e a seleção dos estudos a serem incluídos. Nesse sentido, a formulação da pergunta tem uma importância preponderante, já que representa o

ponto inicial do desenvolvimento da revisão (SAMPAIO & MANCINI, 2007). Por isso, para uma maior especificidade da pergunta, esta deve ser baseada no que dispõe o acrônimo PICOS, envolvendo a descrição da população (P), intervenção (I), controle (C), desfecho (O) e tipo de estudo (S), quando aplicáveis (GALVÃO & PEREIRA, 2014; HIGGINS & GREEN, 2011).

Destarte, considerando a relevância dada aos resultados obtidos e a possibilidade da combinação destes com o restante da literatura científica, visando obter um direcionamento embasado para a pergunta central que motivou o desenvolvimento de um estudo, são as razões que caracterizaram a escolha da revisão sistemática qualitativa como ferramenta inicial para o desenvolvimento da pesquisa.

3.9.2 Revisão sistemática quantitativa (Meta-análise)

De acordo com as diretrizes apresentadas pelo Ministério da Saúde sobre a elaboração de pesquisas neste âmbito da ciência (BRASIL, 2014), o estudo de meta-análise é entendido como uma ferramenta que sumariza em uma única medida de associação, os resultados de diferentes estudos, por meio de uma síntese quantitativa de dados, de modo a elevar a precisão das estimativas já determinadas em estudos qualitativos.

Em suma, a realização de uma meta-análise acompanha o mesmo protocolo de uma revisão sistemática, no entanto, com etapas adicionais que incluem a avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos, a heterogeneidade entre os artigos (SOUSA & RIBEIRO, 2009) e a etapa estatística (PEREIRA & GALVÃO, 2014), responsável, entre outros motivos, por combinar resultados de estudos individuais e controlar a influência de possíveis fatores de confusão que podem interferir no resultado global da pesquisa (BRASIL, 2014; EL DIB, 2009; RODRIGUES & ZIEGELMANN, 2010).

Em adição ao exposto, vale ressaltar que para o desenvolvimento tanto de estudos de revisão sistemática quanto de meta-análise, se faz necessário que os artigos incluídos estejam em quantidade suficiente para que seja possível proceder com as devidas comparações. Isso porque as respostas de interesse que nortearam a pesquisa devem ser alcançadas apenas após a sequência metodológica do estudo, que envolve a extração, compilação e a avaliação das informações recuperadas, com posterior comparação dos dados obtidos a partir dos artigos que

atenderam aos critérios de inclusão, como prevê o Manual Cochrane de revisões sistemáticas e intervenções (HIGGINS & GREEN, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento da pesquisa

O delineamento da pesquisa foi realizado com base nas recomendações do “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis” (PRISMA), cujo conteúdo descritivo é apresentado no Anexo 1.

Nesse sentido, o delineamento levou em conta a estratégia PICOS, em que: a população considerada foram as amostras obtidas a partir de leites fermentados com *Lactobacillus acidophilus*; a intervenção considerando a utilização de L.A. na fermentação dos leites; o controle baseado nos resultados obtidos a partir da literatura científica para leites não fermentados ou fermentados com semelhante constituição microbiológica; o desfecho definido pelo potencial antioxidante das amostras preparadas pela fermentação em presença de L.A., e por fim, o tipo de estudo, incluindo aqueles com desenho analítico “in vitro” e “in vivo”, e consequentemente retrospectivos.

4.2 Busca sistemática

A busca sistemática foi realizada nas bases de dados “Medline”, “Cochrane Central Register of Controlled Trials”, “Scopus”, “Science Direct”, “Scifinder”, “Web of Science”, “Scielo” e “Agrícola”, em fevereiro de 2016, e atualizada em setembro de 2016, sem restrições quanto ao idioma ou período de tempo. As estratégias de busca (Anexo 2), foram compostas dos termos “antioxidant activity”, “oxidative stress”, “*Lactobacillus acidophilus*”, “fermented milk”, “lactic beverage”, “yogurt”, “in vitro techniques” e “in vivo”, associados aos operadores booleanos “AND” e “OR”, com combinações conforme a necessidade de cada base de dados.

Além das bases escolhidas, a busca também foi realizada por meio da triagem manual nas referências bibliográficas disponíveis nos artigos que atenderam aos critérios de inclusão, com vistas a detectar um maior número de artigos capazes de atender aos requisitos da pesquisa.

4.3 Critérios de seleção

Os estudos recuperados na literatura científica, conforme as estratégias de busca indicadas, tiveram os seus títulos e resumos avaliados com base em alguns critérios de elegibilidade, sendo eles:

- Bebidas de origem láctea que empregaram o probiótico *Lactobacillus acidophilus* de forma exclusiva na fermentação do leite, ou ainda, associado a outras espécies de bactérias lácticas.
- Estudos que apresentaram a avaliação da atividade antioxidante em bebidas fermentadas de origem láctea, obtidas pela ação de *Lactobacillus acidophilus*, considerando ensaios “in vitro” e “in vivo”.

Do mesmo modo, alguns critérios de exclusão foram estabelecidos, envolvendo:

- Estudos que avaliaram amostras com o probiótico associado a leveduras.
- Amostras que tiveram a atividade antioxidante avaliada apenas na cultura bacteriana, e não no produto obtido após a fermentação.
- Revisões bibliográficas, sistemáticas, meta-análises, capítulos de livros, resumos ou resumos expandidos.

4.4 Triagem e extração dos dados

A seleção inicial dos estudos com base na avaliação de títulos e resumos foi realizada por dois revisores independentes (A.R.A. e L.B.M.K.), em que as discrepâncias foram resolvidas em reuniões de consenso, e quando necessário, a opinião de um terceiro revisor (L.O.F.) foi requisitada. Posteriormente, os artigos selecionados na triagem inicial foram cuidadosamente avaliados na íntegra em seus conteúdos, e, dessa forma, sendo excluídos ou mantidos permanentemente na revisão de acordo com o julgamento dos dois primeiros revisores. Nesse sentido, a relação dos artigos descartados da pesquisa com base nos motivos de exclusão após a leitura na íntegra é apresentada nos Anexos 3, 4 e 5. Adicionalmente, como ferramenta de gerenciamento de dados, o programa “EndNote” versão 6.0, foi utilizado.

A extração dos dados a partir dos estudos selecionados foi realizada pelo revisor principal, com utilização das ferramentas do Programa Excel 2013

(Microsoft®), para o manuseio dos dados. Os dados coletados englobaram desde as características gerais dos estudos, características detalhadas das amostras, preparo das amostras, tempo e temperatura de fermentação, constituição microbiológica das amostras, metodologias analíticas gerais e específicas para a avaliação da atividade antioxidante e os resultados obtidos, entre outros itens. Quando necessário, alguns autores principais dos estudos selecionados foram contatados, tanto para esclarecimentos gerais ou disponibilização dos trabalhos na íntegra, quanto para o compartilhamento de resultados não apresentados nos artigos.

Os resultados das avaliações químicas, físico-químicas, microbiológicas e de atividade antioxidante foram quantificados com base no número de vezes em que foram utilizados nas análises de cada subgrupo de amostras, no que se refere tanto à frequência de utilização, quanto aos resultados médios, na condição de haver resultados suficientes para comparações. De forma complementar, foi verificado quais testes gerais e específicos foram realizados com maior frequência, e ainda, o perfil dos microrganismos empregados no preparo das amostras de interesse foi mapeado. Em paralelo, os resultados obtidos foram comparados com as informações descritas em literatura científica, tanto para leites não fermentados (em caso de disponibilidade da informação), quanto para aqueles leites fermentados com outros tipos de bactérias lácticas, além de amostras aleatórias também fermentadas com L.A.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados direcionados aos artigos com desenho experimental “in vitro”

No total, uma quantidade de 1751 artigos foi recuperada a partir das bases de dados: Medline (n=534), Cochrane (n=3), Scopus (n=780), Science Direct (n=329), Scifinder (n=64), Web of Science (n=9), Scielo (n=0) e Agrícola (n=32), não tendo sido incluído nenhum artigo por meio da busca manual. Desses artigos, 624 foram excluídos com o auxílio da ferramenta do programa “EndNote”, devido à duplicação, e com isso, 1127 estudos tiveram títulos e resumos avaliados conforme os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para a pesquisa. Nessa etapa, 1091 estudos foram excluídos, e com isso, 36 artigos foram selecionados para a leitura de seus conteúdos na íntegra, considerando estudos com desenho experimental “in vitro”, resultando em um total de 8 artigos incluídos para o desenvolvimento da revisão sistemática, conforme a estrutura apresentada na Figura 3.

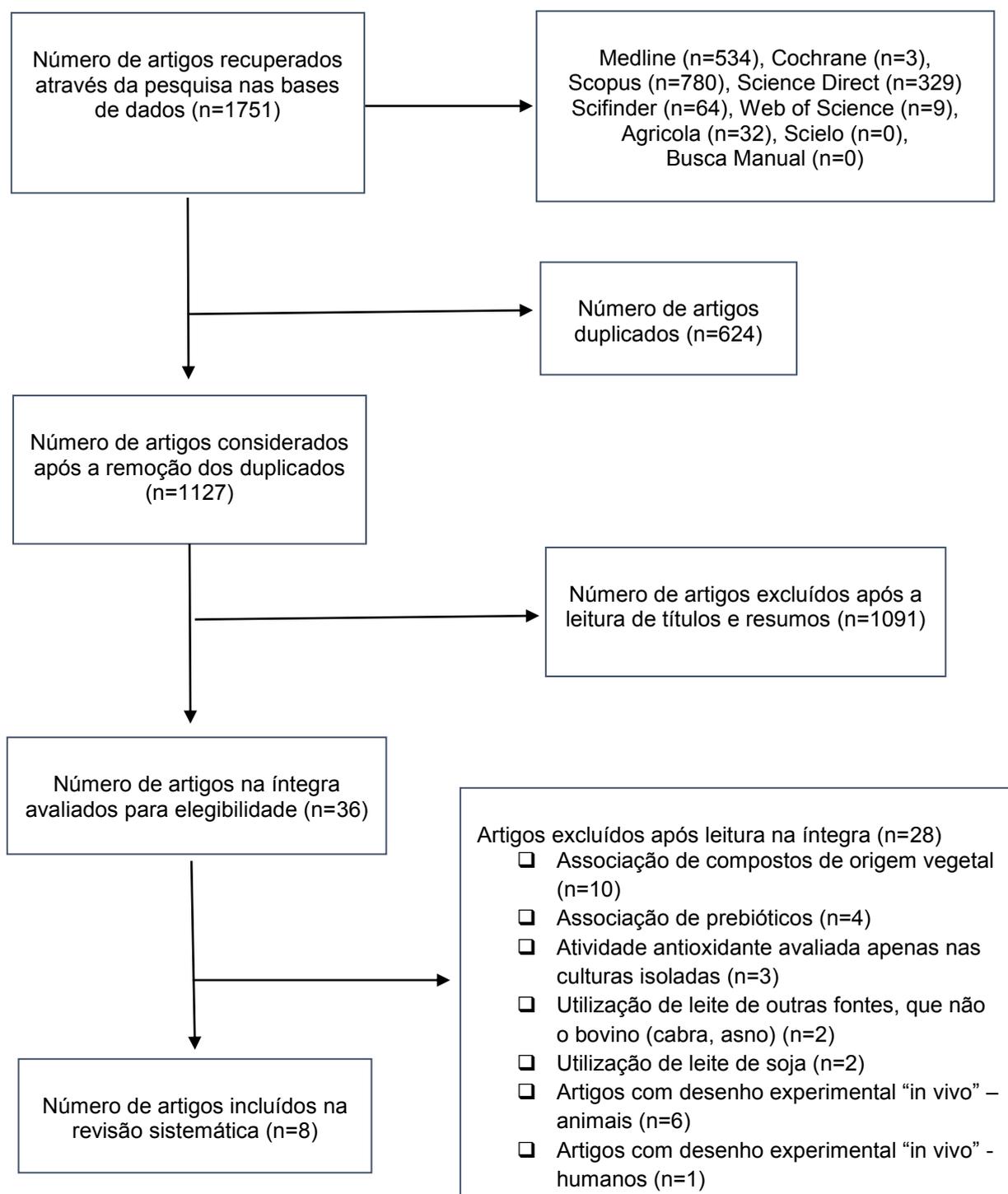


Figura 3 Fluxograma da seleção de estudos com desenho experimental "in vitro", adaptado de Liberati et al. (2009).

Considerando os artigos com desenho experimental "in vitro" selecionados para a pesquisa, o intervalo temporal de publicação ocorreu entre os anos de 2007 a 2015, e os locais de realização dos estudos se distribuíram entre a Finlândia (VIRTANEN et al., 2007), Bulgária (IVANOV, 2007a & IVANOV, 2007b), Estados

Unidos (APOSTOLIDIS et al., 2007), Itália (PARRELA et al., 2012), Austrália (SAH et al., 2014) e China (LI; LIU; HE, 2015; ZHANG et al., 2015).

No total, 83 amostras constituíram os oito estudos selecionados, das quais aproximadamente 80% delas (79,52%) foram desconsideradas da pesquisa (n=66), devido ao não cumprimento das condições estabelecidas, entre elas, não terem sido preparadas com o probiótico de interesse, estarem associadas a compostos de origem vegetal, leveduras ou a prebióticos. Com isso, apenas 20,48% do total de amostras disponíveis (n=17) cumpriram com os requisitos necessários, e, portanto, essa foi a quantidade de amostras englobadas pela pesquisa. Os detalhes sobre o conjunto de amostras contidas nos oito artigos selecionados, suas constituições microbiológicas e os motivos pelos quais uma grande parcela foi desconsiderada da pesquisa podem ser consultados por meio do Anexo 6.

Ainda, as amostras de interesse foram numeradas de 1 a 17, conforme a Tabela 2 aqui apresentada, e os artigos de origem, numerados de 1 a 8. Com isso, quatro amostras provenientes do artigo 1 (VIRTANEN et al., 2007), uma amostra do artigo 2 (IVANOV, 2007a), duas amostras a partir do artigo 3 (IVANOV, 2007b), uma amostra originada do artigo 4 (APOSTOLIDIS et al., 2007), uma amostra considerada no artigo 5 (PARRELA et al., 2012), quatro amostras do artigo 6 (SAH et al., 2014), uma amostra do artigo 7 (LI et al., 2015) e três amostras do artigo 8 (ZHANG et al., 2015), foram selecionadas para integrarem a presente pesquisa.

Com base na análise descritiva das amostras selecionadas, obteve-se diferentes produtos finais de acordo com o perfil das bactérias lácticas utilizadas para a fermentação de cada um deles. No geral, amostras contendo em sua constituição cepas como *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (L.B.) e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (S.T.), além do microrganismo alvo desta pesquisa, L.A., aos quais poderiam ser acompanhadas, de forma complementar, de outras bactérias ácido-láticas, estas foram classificadas como “iogurtes”. Por outro lado, amostras contendo L.A. associado, no mínimo, à uma bactéria ácido-lática, diferente da cultura mista padrão para a obtenção de iogurte, foram consideradas “leites fermentados”. E ainda, as amostras obtidas da ação fermentativa da cultura pura de L.A., foram consideradas “leites acidófilos”, conforme definido em legislação (BRASIL, 2007).

Dessa forma, como ambas as amostras atenderam aos requisitos prévios da pesquisa, embora com características intrínsecas diferentes, foi necessário separá-las em subgrupos conforme a classificação do produto a que se enquadraram, de

modo a comparar com maior precisão os aspectos de cada tipo de amostra, com base nos mesmos requisitos de obtenção dos produtos. As características de interesse das amostras selecionadas, bem como a classificação dos produtos e suas subdivisões, podem ser verificadas na Tabela 2.

Tabela 2 Informações gerais sobre os artigos selecionados e classificação das amostras de interesse

Amostra	Autor	Nº do artigo	Microrganismos constituintes	Tipo de produto	Classificação em subgrupos
1	Virtanen et al., 2007	1	<i>Lactococcus lactis</i> , e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite fermentado	A* (17,65%)
2	Virtanen et al., 2007	1	<i>Leuconostoc cremoris</i> b, <i>Lactococcus lactis</i> , e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite fermentado	
3	Ivanov, 2007b	3	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>subsp. thermophilus</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite fermentado	
4	Virtanen et al., 2007	1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite acidófilo	B* (47,06%)
5	Virtanen et al., 2007	1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> F	Leite acidófilo	
6	Ivanov, 2007a	2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite acidófilo	
7	Ivanov, 2007b	3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite acidófilo	
8	Apostolidis et al., 2007	4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite acidófilo	
9	Parrela et al., 2012	5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite acidófilo	
10	Li et al., 2015	7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite acidófilo	
11	Zhang et al., 2015	8	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite acidófilo	

12	Sah et al., 2014	6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	logurte	
13	Sah et al., 2014	6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophiles</i> ,, <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , e <i>Lactobacillus casei</i>	logurte	
14	Sah et al., 2014	6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , e <i>Lactobacillus paracasei</i>	logurte	
15	Sah et al., 2014	6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , e <i>Lactobacillus paracasei</i>	logurte	C* (35,29%)
16	Zhang et al., 2015	8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , e <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	logurte	
17	Zhang et al., 2015	8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , e <i>Bifidobacterium</i>	logurte	

*Subgrupos: A (Leite fermentado), B (Leite acidófilo) e C (logurte)

Assim, do total de amostras disponíveis, 17,65% delas (n=3) foram classificadas como leites fermentados (subgrupo A), 47,06% delas (n=8), leites acidófilos (subgrupo B), e 35,29% (n=6), iogurtes (subgrupo C).

5.2 Caracterização do analito

Com o objetivo de conhecer o modo de preparo das amostras estudadas e as demais condições experimentais empregadas nos estudos incluídos, todas as informações relacionadas ao método de obtenção do analito foram extraídas dos

artigos de interesse. Dessa forma, com relação à unidade experimental obtida a partir de cada amostra de interesse, conforme descrito nos estudos, é possível afirmar que em 100% dos casos, os extratos celulares obtidos após o preparo do produto final foram utilizados como analitos. No entanto, a correta denominação e o modo de obtenção dos referidos materiais celulares, podem ser observados por meio da Tabela 3.

Tabela 3 Tipos de analitos recuperados a partir das amostras de interesse para a avaliação da atividade antioxidante, e seus métodos de obtenção.

Autor	Tipo de amostra	Analito	Método de obtenção do analito
Virtanen et al., 2007	Leite fermentado e Leite acidófilo	Extrato intracelular livre de células (1)	Centrifugação (1000 rpm, 20 min, 5°C), e filtração (45µ)
Ivanov, 2007 ^a	Leite acidófilo	Extrato celular (2)	Reação com metanol (30 min), e filtração
Ivanov, 2007b	Leite fermentado e Leite acidófilo	Extrato celular (3)	Reação com metanol (30 min), e filtração
Apostolidis et al., 2007	Leite acidófilo	Extrato intracelular livre de células (4)	Dupla centrifugação (1000 rpm, 10 min)
Parrela et al., 2012	Leite acidófilo	Extrato celular (5) & Extrato intracelular livre de células (6)	Diluição em tampão fosfato (1:100); Diluição em água e centrifugação (151 rpm, 20 min)
Sah et al., 2014	logurte	Extrato intracelular livre de células (7)	Diluição em ácido tricloroacético, centrifugação (4000 rpm, 30 min, 4°C), e filtração (45µ)
Li et al., 2015	Leite acidófilo	Extrato intracelular livre de células (8)	Ajuste de pH (3,8), centrifugação (3000 rpm, 20 min), Ajuste do pH (7,0), centrifugação (3000 rpm, 10 min), eluição em coluna de troca catiônica e liofilização
Zhang et al., 2015	Leite acidófilo, logurte	Extrato intracelular livre de células (9)	Centrifugação (1000 rpm, 20 min, 5°C), e filtração (45µ)

Com base no exposto acima, um total de nove materiais celulares foram citados ao longo dos estudos incluídos. Sobre eles, apesar da totalidade dos autores declararem a utilização de extratos celulares em suas análises, foi verificado que em 66,67% dos casos (n=6) houve a intenção do rompimento celular previamente à realização dos testes analíticos, em função da aplicação do processo físico de

centrifugação, o que facilita a obtenção do analito denominado de “conteúdo intracelular livre de células”. Sabe-se que, com esse procedimento, maior é a probabilidade de haver liberação de compostos com atividade funcional a partir do metabolismo bacteriano, especialmente aqueles com funcionalidade antioxidante, conforme descrito na literatura por autores que pesquisaram exclusivamente este tipo de analito (AMARETTI et al., 2013; LIN; YEN, 1999).

Por conseguinte, para 33,33% (n=3) dos materiais utilizados como analito, não houve a prévia centrifugação das amostras para proceder às análises. Para estes, conforme descrições apresentadas nos trabalhos de Ivanov (2007a & 2007b), houve apenas a reação das amostras com metanol durante 30 minutos. Ainda, de acordo com esclarecimentos obtidos pelo contato direto com o autor Parrela et al. (2012), duas amostras foram utilizadas ao longo do mesmo estudo, sendo uma diretamente diluída em tampão, e outra não diluída, mas submetida à centrifugação e demais procedimentos. Por esses motivos, as amostras não centrifugadas (2, 3 e 5) foram consideradas “extratos celulares”, podendo conter, mas não necessariamente, componentes intracelulares bacterianos.

Com relação à capacidade de extração dos componentes intracelulares dos microrganismos, Becerra et al. (2001) consideraram o rompimento celular um fator essencial na obtenção de compostos funcionais, e, por isso, demonstraram que a extração do conteúdo intracelular de leveduras com o uso de solventes não pareceu ser eficiente. Dentre os solventes testados, o metanol teve o melhor comportamento, assim como empregado na prática por alguns dos estudos aqui avaliados (IVANOV, 2007a & 2007b), porém com o inconveniente do tempo de reação, em que o resultado mais robusto para a liberação intracelular de lactase, por exemplo, foi alcançado com 21 horas de reação, e com isso o método foi considerado pouco útil nesta etapa.

Em consequência do exposto acima, os autores sugeriram o processo de sonicação como a melhor técnica para liberação de compostos intracelulares de microrganismos. Por isso, de acordo com as observações destes e de outros autores (CHISTI; MOO-YOUNG, 1986), para a obtenção do máximo benefício ofertado pelos microrganismos, o ideal é a recuperação dos constituintes celulares internos, sendo necessário, para isso, a aplicação de processos mecânicos, químicos, físicos ou enzimáticos (KULA; SCHÜTTE, 1987).

Sendo assim, uma funcionalidade de destaque obtida através da recuperação do conteúdo intracelular bacteriano, é o efeito antioxidante, a partir do qual ainda

não é possível determinar com exatidão qual ou quais compostos são diretamente relacionados com esta característica, embora se saiba que o benefício seja, em maioria, proveniente desse material (KIM et al., 2006; LIN; YEN, 1999; OU et al., 2009; PIENIZ et al., 2014).

Como ferramenta confirmatória a ser empregada após a obtenção do material intracelular, Kula & Schütte (1987) descreveram a necessidade de avaliação da eficiência da desintegração celular, como uma função da velocidade do agitador ou do impulsor, dependendo do equipamento utilizado para o rompimento celular. Em adição, tais pesquisadores ainda apresentaram a possibilidade da modificação de parâmetros e/ou ferramentas, de acordo com o material desejado, caso compostos do citoplasma celular, ou do espaço periplasmático, por exemplo. Os autores também destacaram o uso de pérolas de vidro como um eficiente auxiliar no processo de rompimento celular, a ser acoplado a um moinho de pérolas.

Nesse contexto, tais fatos favorecem a tomada de decisão a respeito de estudos futuros, seguindo a mesma linha de pesquisa, no que se refere à atividade antioxidante de bactérias lácticas aplicadas em bebidas fermentadas a partir do leite, em que, para a obtenção do benefício contra a ação dos radicais livres, o uso do conteúdo intracelular bacteriano pode ser preferencialmente utilizado.

5.3 Tempo de fermentação

No que se refere ao tempo de fermentação para a obtenção dos produtos de interesse, tendo como base as características de cada subgrupo estudado, foi possível verificar que todas as amostras do subgrupo A tiveram o tempo de fermentação descritos, e para estas, foi observado que o tempo médio de fermentação foi de 17 horas, tempo este bastante semelhante aos dois tipos de leites fermentados obtidos a partir de L.A., preparados no estudo de Anderson & Gilliland (1999), no qual, para ambas as amostras, o tempo resultante foi de 18 horas de fermentação.

Todavia, o tempo médio aqui recuperado foi ainda superior ao descrito por Damin et al. (2008), em que um leite fermentado, obtido a partir da co-cultura de S.T. e L.A., resultou em 9,3 horas de fermentação, possivelmente devido ao estímulo da produção de acidez alcançada pela associação das referidas bactérias lácticas, em conjunto com as condições do preparo das amostras. Os resultados sumarizados

para ambos os subgrupos e demais informações pertinentes ao tópico, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Tempo de fermentação (horas) para cada amostra incluída na pesquisa, e valores médios para os subgrupos de interesse, comparado aos dados de literatura científica

Amostra	Classificação	Subgrupo	Tempo de fermentação	Tempo médio de fermentação	Literatura científica
1	Leite fermentado	A	24 h	17 h	18 h (Anderson & Gilliland, 1999)
2			24 h		
3			3 h		
4	Leite acidófilo	B	24 h	14,19 h	20,2 h (Sodini et al., 2002)
5			24 h		
6			5,5 h		
7			5 h		
8			5 h		
9			24 h		
10			24 h		
11	7 h				
12	Iogurte	C	-	7 h	~7 h (Soukoulis et al., 2007)
13			-		
14			-		
15			-		
16			7 h		
17			7 h		

Por outro lado, 100% das amostras do subgrupo B declararam o tempo de fermentação, o qual alcançou o valor médio de 14,2 horas. Sodini et al. (2002) descreveram um resultado obtido por leite fermentado a partir de uma única cepa de bactéria láctica, sendo ela, *Lactobacillus rhamnosus* (L.R.), a qual requereu pouco mais de 20 horas de fermentação para o alcance das características de interesse.

No caso do subgrupo C, tal informação foi possível de ser extraída apenas para 33,33% das amostras (n=2), e nessas, a média foi de 7 horas de fermentação, isso porque, para os 66,67% de amostras restantes (n=4), o parâmetro de interesse foi o alcance de um determinado valor de pH (4,5), não tendo sido o tempo de fermentação um fator mensurado pelos pesquisadores. No entanto, o tempo médio para este subgrupo foi de encontro ao obtido no estudo de Soukoulis et al. (2007), em que dois iogurtes foram preparados com leite desnatado e integral, respectivamente, por meio da associação entre L.B. e S.T., sendo que ambos alcançaram os parâmetros desejados em aproximadamente sete horas.

Tais informações foram consideradas relevantes, uma vez que o tempo de fermentação de um produto é capaz de influenciar no crescimento bacteriano, bem como no sabor e textura de um alimento (KRISTO; BILIADERIS; TZANETAKIS, 2003), além da possibilidade de produção e liberação de diferentes compostos do metabolismo bacteriano, potencialmente funcionais, de acordo com o tempo de fermentação praticado, como também foi destacado por Ostlie et al. (2003).

Sodini et al. (2002), por sua vez, descreveram um importante fato a respeito dos leites fermentados, em que o tempo de fermentação de amostras adicionadas de uma única cepa, no caso, S.T., tende a ser de duas a três vezes maior quando comparado ao mesmo produto preparado em associação ao L.B., o que indica que a composição microbiológica e seus produtos de fermentação interferem consideravelmente no tempo de fermentação, no que se refere ao alcance das características de interesse para um alimento (pH, acidez, viscosidade, contagem de microrganismos, entre outros), devendo a constituição microbiana ser, portanto, um fator a ser considerado no momento do desenvolvimento de um produto.

Semelhante ao descrito por Sodini et al. (2002), foi a constatação obtida a partir dos subgrupos aqui avaliados, em que o leite fermentado pela cultura pura (L.A.) resultou em tempo médio de 20 horas de fermentação, e o iogurte, portanto, obtido a partir das mesmas culturas “starters”, resultou em um tempo médio quase três vezes inferior, ou seja, 7 horas.

Outro item que, adicionalmente, também colabora com a redução do tempo de fermentação, e, conseqüentemente, com a qualidade nutricional e tecnológica do produto, é a incorporação de fontes proteicas, como os hidrolisados proteicos, por exemplo, conforme caracterizado por Lucas et al. (2004) e Antunes; Cazetto & Bolini (2005), ou ainda, a incorporação de prebióticos (DESAI; POWELL; SHAH, 2004).

Com relação aos requisitos nacionais e internacionais para leites fermentados, não há padronização para o tempo de fermentação a ser empregado na fabricação desses tipos de alimentos (BRASIL, 2007; US-FDA, 2015), sendo este um fator a ser estabelecido com base nos objetivos prévios traçados, os quais geralmente englobam, ou um período de tempo fixo de fermentação, ou mesmo um período definido em função do alcance de um parâmetro específico, como é o caso da acidez, por exemplo, considerando os valores já estabelecidos aos quais os leites fermentados devem se adequar.

5.4 Temperatura de fermentação

Outro parâmetro de importância substancial para a produção e caracterização de bebidas fermentadas de origem láctea é a temperatura de fermentação, pois de acordo com a sua intensidade, e aliada ao tempo de fermentação, pode-se determinar a melhor coagulação dos produtos de interesse, otimizando o processo produtivo (LEE & LUCEY, 2010).

Devido à importância do parâmetro, os dados relacionados à temperatura de fermentação das amostras que atenderam aos critérios de inclusão foram compilados na Tabela 5, juntamente com dados da literatura científica para amostras de semelhante constituição microbiológica.

Tabela 5 Temperatura de fermentação para cada amostra incluída na pesquisa, e valores médios para os subgrupos de interesse, comparado aos dados de literatura científica.

Amostra	Classificação	Subgrupo	Temperatura de fermentação	Temperatura média de fermentação	Literatura científica
1	Leite fermentado	A	37°C	37,33°C	37°C (Akabanda et al., 2014)
2			37°C		
3			38 +/- 1°C		
4	Leite acidófilo	B	37°C	37°C	37°C (Sarkar & Misra, 2010)
5			37°C		
6			38°C		
7			38 +/- 1°C		
8			37°C		
9			37 +/- 1°C		
10			30°C		
11	42°C				
12	Iogurte	C	42°C	42°C	42°C (Yu et al., 2014)
13			42°C		
14			42°C		
15			42°C		
16			42°C		
17			42°C		

Tendo como base o subgrupo A, a temperatura média de fermentação foi de 37,33°C, sendo este valor consideravelmente inferior em relação às amostras fermentadas no estudo promovido por Casarotti et al. (2014). De acordo com o protocolo proposto pelos pesquisadores, para as amostras de leites fermentados ou acidófilos, a temperatura de fermentação estabelecida foi de 42°C, até que o valor

de pH de interesse fosse alcançado (4,6). Por outro lado, a temperatura média aqui determinada concorda com as condições estabelecidas por Akabanda et al. (2014), em que para leites fermentados obtidos a partir de culturas isoladas, ou mesmo em co-culturas, a temperatura proposta para fermentação foi de 37°C.

No que se refere aos leites acidófilos (subgrupo B), com temperatura média de 37°C, considera-se que as referidas amostras foram também fermentadas em um intervalo de temperatura condizente com o gênero *Lactobacillus*, uma vez que o intervalo indicado para melhor crescimento e desenvolvimento dessa bactéria é de 35°C a 40°C, sendo que o microrganismo ainda é capaz de sobreviver em temperatura máxima de 45°C (GOMES & MALCATA, 1999). Em concordância com o exposto, quando avaliada de forma isolada, a cepa de L.A. apresentou temperatura ótima de crescimento a 37°C, com base nos experimentos de Fernández-Murga et al. (2000). Além disso, quando preparada uma amostra de leite acidófilo para avaliação das características tecnológicas e dietéticas, Sarkar & Misra (2010) também partiram de uma temperatura ótima de fermentação, sendo esta de 37°C.

Quanto à temperatura média obtida para a fermentação das amostras do subgrupo C, de 42°C, trata-se de um resultado similar ao apresentado na literatura científica sobre algumas amostras de iogurte, também preparados de forma a incluir o L.A. em suas constituições, por exemplo, uma amostra de iogurte adicionado de pimenta fermentada, por Yu et al. (2014), incubado a 42°C, ou mesmo se consideradas as amostras de iogurtes probióticos, suplementados ou não com soro de leite, na presença ou não de L.R., avaliados por Bulatovic et al. (2014), também incubados a 42°C. Em acordo com as informações já apresentadas, Lee & Lucey (2010) descreveram em seu artigo de revisão que, com relação à formação do iogurte e suas propriedades físicas, a temperatura ótima para fermentação se encontra no intervalo entre 40-45°C.

Com isso, a diferença entre os valores médios recuperados para a temperatura de fermentação de cada subgrupo pode ser relacionada com o perfil microbiológico em que as amostras foram constituídas, uma vez que, para os leites fermentados (37,33°C), por exemplo, a cultura “starter” para o iogurte não estava presente em sua constituição, mas sim, L.A. e outras bactérias que o caracterizaram dessa forma. Para o grupo de leites acidófilos, em que apenas a presença de L.A. é verificada, o racional foi semelhante (37°C). No caso do iogurte, em presença de outras bactérias lácticas, além da cultura inicial para iogurte, a temperatura média de

fermentação foi relativamente superior (42°C), estando ainda de acordo com o que é praticado por pesquisadores e produtores de iogurte de todo o mundo.

Ainda nesse contexto, vale ressaltar a importância da temperatura e do processo de fermentação como um todo, também para a liberação dos peptídeos bioativos no alimento formado, os quais exercem diversas funções fisiológicas benéficas ao consumidor, de acordo com a constituição microbiológica do produto lácteo fermentado (AKALIN, A.S., 2014; DE CASTRO & SATO, 2015).

5.5 Caracterização físico-química

A partir dos relatos apresentados nos estudos selecionados, alguns ensaios físico-químicos foram realizados, os quais tiveram os seus resultados subdivididos conforme os tipos de produtos considerados, a fim de melhor caracterizá-los. Para o subgrupo A, 100% das amostras (n=3) foram submetidas ao teste de pH, e como valor médio foi obtido o resultado de 5,27. Sobre tal parâmetro, é válido destacar que não há especificação descrita em legislação, considerando leites fermentados (BRASIL, 2007); entretanto, mesmo com um amplo tempo de fermentação, o valor médio de pH aqui determinado ainda é superior aos já apresentados para produtos semelhantes, de 4,3 (OLIVEIRA et al., 2001), 3,9 (OSTLIE et al., 2003) e 3,9 (RAMOS et al., 2013).

Ainda para o subgrupo A, no que se refere ao restante dos aspectos físico-químicos, desconsiderando o perfil de análises antioxidantes, a ser discutido adiante, o pH foi o único parâmetro possível de ser comparado entre ambas as amostras. Alguns testes adicionais foram realizados, como o grau de hidrólise proteica, o conteúdo de ácido láctico e o conteúdo de lactose, no entanto, tais metodologias foram aplicadas em apenas uma das amostras do subgrupo A (33,33%), não havendo, por isso, dados suficientes para comparações entre as amostras de interesse. Os resultados compilados para o teste de pH, envolvendo os três subgrupos de interesse, podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6 Valores médios de pH por subgrupo de interesse, comparados à literatura

Subgrupo	Adesão ao método	pH médio	Literatura científica
A	100,00% (n=3)	5,27	4,30 Oliveira et al. (2001)
B	37,50% (n=3)	4,27	5,00 - 5,50 Gilliland & Rich (1990)
C	66,67% (n=4)	4,50	4,50 Debon; Prudêncio & Petrus (2010)

*n: número de amostras

Considerando o subgrupo B, do total de amostras incluídas, apenas 37,50% delas (n=3) aplicaram o teste de pH, tendo a média alcançado o valor de 4,27, resultado este inferior ao obtido para leites fermentados, porém, como mencionado anteriormente, trata-se de amostras provenientes de um maior tempo médio de fermentação, característica capaz de influenciar diretamente na redução do potencial hidrogeniônico do produto. Nesse sentido, constatações feitas por Gilliland & Rich (1990) demonstram que o melhor valor de pH para crescimento e estabilidade de L.A., objetivando aplicações em produtos lácteos, seria entre 5,0 e 5,5, obtidos após 18 horas de cultivo.

Para o subgrupo C, 66,67% das amostras (n=4) foram preparadas até o alcance de um valor específico de pH, sendo este de 4,5, o mesmo parâmetro estabelecido nas amostras de iogurte avaliadas por Debon; Prudêncio & Petrus (2010).

Outra medida de considerável importância na análise de produtos lácteos fermentados é o conteúdo de ácido láctico, o qual apresentou aplicabilidade em 37,50% das amostras do subgrupo B (n=3), e apesar de terem sido avaliadas por metodologias distintas (cálculo com base nos resultados para a acidez titulável, e HPLC), resultaram em um teor médio de $1,45\text{g}/100\text{g}^{-1}$, conforme apresentado na Tabela 7. Por isso, o conjunto das amostras se enquadra nos requisitos da legislação brasileira para leites fermentados, em que o intervalo aceitável é de 0,6 – 2,0g/100mL (BRASIL, 2007).

Tabela 7 Testes adicionais de caracterização físico-química relativos ao subgrupo B, comparados aos dados da literatura

Teste	Adesão ao método	Resultado Médio	Literatura científica
Conteúdo de ácido láctico	42,86% (n=3)	1,45 g/100g	0,6 – 2,0 g/100mL (BRASIL, 2007)
Conteúdo de lactose residual	25,00% (n=2)	37,00g/L ⁻¹	35,80 g/L ⁻¹ (Leite fermentado com L.B.) (Ivanov, 2007 ^a)

*n: número de amostras

Apesar de não haver padrão oficial estabelecido para o conteúdo residual de lactose para leites fermentados, este foi um teste possível de ser comparado em 25,00% das amostras do subgrupo B (n=2), com resultado médio de 37,0 g/L⁻¹ (Tabela 7). Contudo, em consequência a um alto teor de ácido láctico, menor será o conteúdo de lactose residual, de modo com que seja possível avaliar a eficiência do processo fermentativo. Algumas amostras avaliadas no estudo de Ivanov (2007a), com base na fermentação do leite por outras bactérias lácticas, como L.B., S.T. e *Lactobacillus casei* (L.C.), por exemplo, resultaram em valores de lactose residual de 35,8, 37,8 e 38,9 g/L⁻¹, respectivamente, sendo assim, a média do conteúdo residual de lactose obtida para o subgrupo B foi muito semelhante em comparação aos resultados obtidos da literatura, para as referidas bactérias lácticas.

Além desses testes, outros foram realizados em amostras do subgrupo B, embora em amostras únicas, não havendo geração de resultados suficientes para comparações, como foi o caso dos métodos para avaliação do tempo de coagulação do leite, doseamento da inibição da alfa-glicosidase, doseamento da inibição da alfa-amilase, doseamento da inibição da enzima conversora de angiotensina, hidrólise proteica e a atividade proteolítica.

Ainda em termos de testes físico-químicos, o teste restante realizado pelo subgrupo C, possível de comparação entre amostras de composição microbiológica semelhante, foi o método para hidrólise proteica, apresentado por 66,67% das amostras estudadas, com resultado médio de 10,38% (Tabela 8).

Tabela 8 Capacidade média de hidrólise proteica de amostras do subgrupo C, comparada com a literatura

Teste	Adesão ao método	Resultado médio	Literatura científica
Hidrólise proteica	66,67% (n=4)	10,38%	5,38% (Leite fermentado com L.A. + L.B.) Sah et al. (2014)

*n: número de amostras

Com base nos dados descritos por Sah et al. (2014), as bactérias probióticas são capazes de melhor utilizar as fontes proteicas de um alimento como substrato para hidrólise, e, por esse motivo, comparativamente, a amostra de iogurte contendo apenas as culturas “starters” (L.A. + L.B.) apresentou resultado inferior, de 5,38%. Esses resultados podem ser interpretados também com base na revisão apresentada por Christensen et al. (1999), que descreveram a relação direta da hidrólise proteica promovida por bactérias lácticas, as quais possuem o seu crescimento dependente do sistema proteolítico, capaz de liberar aminoácidos essenciais a partir de peptídeos derivados da caseína, o que, por consequência, ocorre em nível proporcional, de acordo com as características e a quantidade dos microrganismos utilizados no preparo de um alimento, como foi o caso do resultado médio aqui encontrado, pois no estudo de Sah et al. (2014), o valor de destaque (11,91%) foi obtido pelo iogurte preparado com cinco diferentes espécies de bactérias lácticas, três das quais, probióticas.

Nesse sentido, outra correlação também pode ser feita a respeito do resultado alcançado, sobre o fato das proteinases serem enzimas específicas do ambiente intracelular bacteriano (KUNJI et al., 1996), dessa forma, quanto mais eficiente o processo de rompimento celular, maior tende a ser o grau da hidrólise proteica.

Mantendo o ponto de vista, é válido destacar ainda o mecanismo de proteção antioxidante envolvido com a ação dos peptídeos bioativos gerados a partir da hidrólise proteica, principalmente em relação às proteínas derivadas do leite, pois trata-se da fonte mais importante de peptídeos bioativos conhecidos (ALOGLU & ONER, 2011).

Um estudo realizado por Piccolomini et al. (2012) mostra que o uso de hidrolisado proteico, pressurizado ou não, é capaz de inibir a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, em células intestinais humanas. Constatações semelhantes foram apresentadas por Farvin et al. (2010), os quais avaliaram a

composição de aminoácidos de frações peptídicas a partir de iogurtes não probióticos. Neste estudo foi demonstrada a presença prioritária de aminoácidos como, prolina, glutamina, histidina, tirosina, leucina e valina, sendo a maioria deles reconhecidos pela atividade antioxidante intrínseca, característica que justifica o mecanismo protetor contra a ação dos radicais livres, obtido a partir da promoção da hidrólise das proteínas do leite.

5.6 Caracterização microbiológica

5.6.1 Qualitativa

Levando em conta o perfil microbiológico de cada um dos subgrupos de produtos avaliados na pesquisa, obtém-se a média de dois microrganismos utilizados para a produção das amostras de leite fermentado, um para a formação dos leites acidófilos, e quatro microrganismos associados para a produção das amostras de iogurte. Destes, a bactéria utilizada com maior frequência (n=100%) foi, devido ao fato de ser o alvo da pesquisa, L.A., seguida por S.T. (n=7, ou 41,18%) e L.B. (n=6, ou 35,29%), sendo os dois últimos, a base fermentativa do leite para obtenção de iogurte (BRASIL, 2007). O mapeamento microbiológico das amostras de interesse, no que se refere ao tipo e número de eventos em que foram utilizados, com exceção, portanto, do L.A., pode ser verificado na Figura 4.

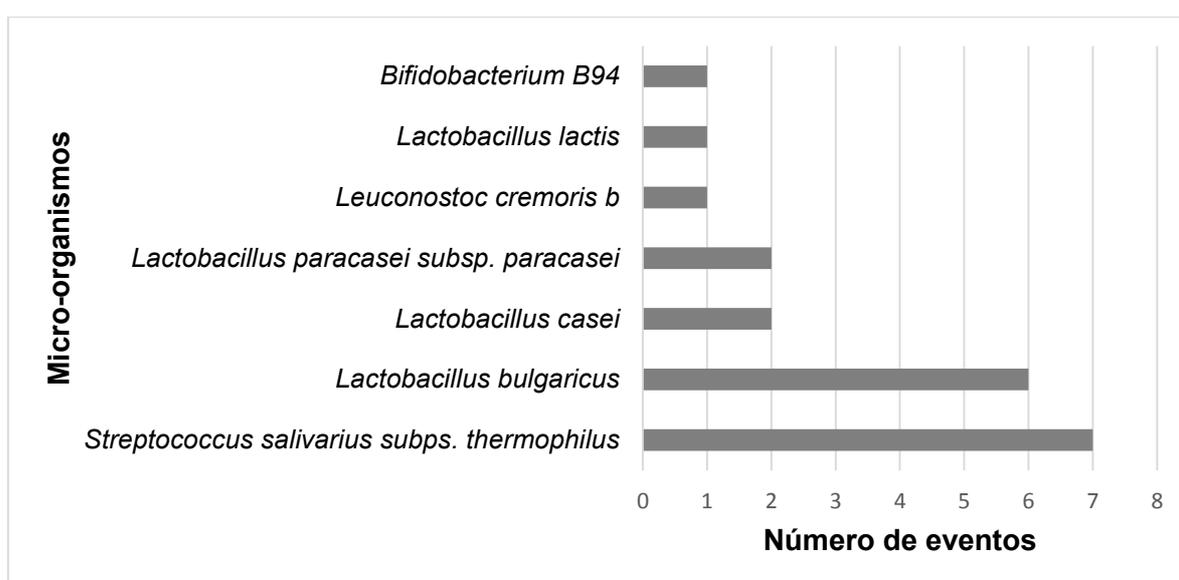


Figura 4 Tipos de microrganismos empregados e número de eventos em que foram utilizados, considerando o total de 9 amostras incluindo leites fermentados e iogurtes (e desconsiderando, portanto, os leites acidófilos), com base em oito artigos recuperados após o alcance dos critérios de inclusão da presente revisão.

Com base na presente figura e nos dados já mencionados, em que 47,06% do total das amostras consideradas (n=8) são referentes a leites acidófilos, a quantidade restante, de 52,94% (n=9), é proveniente da combinação de outras culturas, em adição ao L.A.. A partir disso, é possível verificar que dentre as nove amostras restantes, apenas duas delas apresentaram formulações repetidas na íntegra no que se refere à composição microbiológica, incluindo a associação de L.B., S.T. e L.A., o que representa um total de 33,33% das amostras do subgrupo C, sendo as de número 12 e 16.

Quanto à associação de microrganismos, probióticos e não probióticos na formulação de um alimento, e as razões para tal associação, Sareela et al. (2000) afirmaram que a utilização de uma cepa probiótica em conjunto com as bactérias lácticas “starters” de interesse para um produto lácteo fermentado, dá-se, entre outros motivos, pela melhoria dos aspectos sensoriais do produto, como o sabor e a textura, por exemplo.

Em paralelo, no momento do desenvolvimento de um alimento é necessário levar em consideração as possíveis interações entre os microrganismos de escolha, conforme constatações feitas por Vinderola et al. (2002), que demonstraram a característica do L.A. em ser inibido durante o crescimento em caldo, por outros probióticos como L.C. e *Bifidobacterium*. Além disso, os dois últimos promoveram também a inibição do crescimento das culturas “starters”, destacando, com isso, a importância do planejamento prévio do tipo de produto a ser desenvolvido, das características desejadas, e com base nesses pontos, a definição mais assertiva sobre a composição microbiológica pode ser feita.

5.6.2 Quantitativa

No que se refere aos testes microbiológicos realizados nas amostras selecionadas, os resultados foram sempre apresentados separadamente, considerando cocos e bacilos, como pode ser observado nos dados sumarizados apresentados no Quadro 1.

Desta forma, para o subgrupo A, 100% das amostras (n=3) realizaram a contagem no produto final, sendo os valores médios obtidos para cocos, de $3,70 \times 10^8$ UFC/mL (ou 8,57 log UFC/mL), e para bacilos, $2,49 \times 10^8$ UFC/mL (ou 8,40 log UFC/mL). O estudo realizado por Oliveira et al. (2001) apresentou resultado semelhante no que se refere à contagem de L.A., quando este foi associado ao St

em uma bebida fermentada. Para esta amostra, a contagem obtida foi de 2×10^8 UFC/mL (ou 8,30 log UFC/mL), após um dia do preparo do produto. E ainda, corroborando com o exposto, os valores médios obtidos para amostras do subgrupo A vão de encontro ao preconizado na legislação brasileira para leites fermentados, a qual estabelece uma contagem mínima de $1,00 \times 10^6$ bactérias lácticas totais para esta classe de bebidas (BRASIL, 2007).

No subgrupo B, em que apenas o L.A. foi utilizado como microrganismo fermentador, para a totalidade das amostras (n=8) foi apresentado o teste para a contagem microbiológica, e com base nesses experimentos, a contagem média para bacilos obtida foi de $1,7 \times 10^8$ UFC/mL (ou 8,23 log UFC/mL). O valor obtido para o subgrupo B se assemelha à contagem apresentada para uma amostra de leite acidófilo em seu primeiro dia de armazenamento, conforme descrito por Casarotti et al. (2014), o qual obteve resultado de $8,54 \pm 0,12$ log UFC/mL. Além disso, o referido subgrupo atende ao que dispõe a legislação brasileira para leites acidófilos, por serem constituídos de, no mínimo, $1,00 \times 10^7$ bactérias lácticas totais (BRASIL, 2007).

Quadro 1 Contagem bacteriana média, em UFC/mL, para os três tipos de produtos lácteos fermentados em estudo, comparados com valores de referência.

Subgrupo A		Subgrupo B	Subgrupo C		
Cocos	Bacilos	Bacilos	Cocos	Bacilos	Bacilos probióticos
$3,70 \times 10^8$	$2,49 \times 10^8$	$1,70 \times 10^8$	$1,50 \times 10^9$	$1,60 \times 10^8$	$3,80 \times 10^7$
Literatura científica					
Cocos	Bacilos	Bacilos	Cocos	Bacilos	Bacilos probióticos
Min $1,00 \times 10^6$ Bactérias lácticas totais (BRASIL, 2007)	Min $1,00 \times 10^7$ Bactérias lácticas totais (BRASIL, 2007)	Min $1,00 \times 10^7$ Bactérias lácticas totais (BRASIL, 2007)	Min $1,00 \times 10^7$ Bactérias lácticas totais (BRASIL, 2007)		Min $1,00 \times 10^8 - 10^9$ Bactérias lácticas totais (BRASIL, 2008)

Para o subgrupo C, por sua vez, 66,67% das amostras (n=4) apresentaram resultados para a contagem final de microrganismos, sendo que a contagem média obtida para cocos foi de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL (ou 9,18 log UFC/mL) e de bacilos foi de $1,6 \times 10^8$ UFC/mL (ou 8,21 log UFC/mL). Adicionalmente, como as quatro referidas amostras foram constituídas por diferentes probióticos, elas também apresentaram a contagem para os bacilos probióticos, tendo resultado em uma contagem média de $3,8 \times 10^7$ UFC/mL (ou 7,58 log UFC/mL). Dessa forma, o subgrupo C estaria devidamente caracterizado como iogurte, em função da contagem microbiológica

atender ao preconizado em legislação para esse tipo de alimento, ou seja, um mínimo de $1,00 \times 10^7$ bactérias lácticas totais (BRASIL, 2007).

Com relação à definição dos produtos quanto à característica probiótica, de acordo com as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008), para o recebimento desse título, o alimento deve ser preparado com um nível entre 10^8 e 10^9 UFC por porção do produto, a fim de que os microrganismos consigam atingir o trato digestório em uma quantidade suficiente para o desenvolvimento de suas funcionalidades.

Com isso, dos subgrupos aqui avaliados, todos se enquadraram nessa classificação, pois alcançaram o nível mínimo indicado, inclusive o subgrupo C, o qual mesmo apresentando um valor médio inferior ao recomendado pela legislação brasileira para produtos probióticos, quando este é convertido para uma porção padrão de 200g do alimento, ao invés do cálculo por mL, a contagem atinge a margem de $7,60 \times 10^9$ UFC, atendendo ao requisito para enquadramento na classificação de alimento probiótico, sendo portanto, um resultado satisfatório para a finalidade pretendida.

5.7 Caracterização antioxidante

Para que fosse possível conhecer o perfil antioxidante dos subgrupos de produtos lácteos estudados, foi necessário avaliar os resultados descritos a partir dos métodos empregados na caracterização de cada conjunto de amostras. Sendo assim, a comparação possível para o subgrupo A foi relacionada unicamente ao teste da capacidade de eliminação do radical ABTS, em que os resultados de 66,67% das amostras (n=2) geraram um valor médio de 23,30%, com base na avaliação das frações do soro provenientes das amostras de leites fermentados, resultados estes apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 Caracterização do perfil antioxidante para as amostras do subgrupo A.

Subgrupo A			
Teste	Adesão ao método	Resultado médio	Literatura científica
Capacidade de eliminação do radical ABTS	66,67% (n=2)	23,30%	20,90% (<i>Leuconostoc cremoris B</i> ; <i>Lactococcus lactis</i>) Virtanen et al. (2007)

*n: número de amostras

As amostras aqui consideradas foram originárias do estudo de Virtanen et al. (2007), os quais também avaliaram uma amostra de leite fermentado constituído por bactérias não probióticas, e nesta, o resultado obtido pelo mesmo método, a partir das frações do soro, foi de 20,90%. Tais resultados sugerem, portanto, que a presença de L.A. interferiu de maneira positiva no perfil antioxidante das amostras avaliadas para o subgrupo A.

O restante das metodologias utilizadas na avaliação das amostras que constituíram o subgrupo A, não apresentaram parâmetros suficientes para comparações, uma vez que foram realizadas em apenas uma amostra, envolvendo os testes de capacidade eliminatória do radical DPPH e inibição da peroxidação lipídica.

Para o subgrupo B, 62,50% das amostras (n=5) utilizaram a metodologia da capacidade eliminatória do radical DPPH, com um valor médio resultante de 55,09%. Este resultado foi consideravelmente superior aos obtidos no estudo de Zhang et al. (2011), quando avaliaram o conteúdo intracelular de duas amostras de leites fermentados por L.C. e L.B., resultando em capacidades eliminatórias de 12,50% e 17,50%, respectivamente.

Nesse contexto, Ajibola et al. (2011) descreveram que os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em uma amostra podem ser os responsáveis pelo potencial eliminatório de radicais livres, o que se relaciona também com a eficiência do processo de hidrólise proteica durante a fermentação. No entanto, considerando o preparo das amostras aqui mencionadas pela ação de apenas um microrganismo, o resultado mais promissor quanto ao potencial antioxidante se refere ao conjunto de amostras obtidas pela ação de L.A., confirmando relatos prévios a respeito desse probiótico, bem como sua ação antioxidante (AMARETTI et al., 2013; LIN & CHANG, 2000; LIU & PAN, 2010; WANG et al., 2008). O sumário dos resultados obtidos para a atividade antioxidante referente ao subgrupo B pode ser encontrado na Tabela 9.

Tabela 9 Caracterização antioxidante das amostras do subgrupo B, em comparação com dados da literatura científica.

Subgrupo B			
Teste	Adesão ao método	Resultado médio	Literatura científica
Capacidade de eliminação do radical DPPH	71,43% (n=5)	55,09%	12,50% e 17,50% (Leites fermentados com L.C. e L.B., respectivamente) Zhang et al. (2011)
Capacidade de eliminação do radical ABTS	25,00% (n=2)	34,50%	15,70% (Leite não fermentado) Virtanen et al. (2007)
Poder redutor	25,00% (n=2)	0,388	0,138 e 0,451 (Leite fermentado por L.A. e L.H., respectivamente) Li, Liu & He (2014)
Capacidade quelante dos íons metálicos	28,57% (n=2)	36,26%	28,19% (Leite fermentado por L.A.) Li, Liu & He (2014).

*n: número de amostras

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método ABTS (com resultados expressos em porcentagem) foi realizada por 25,00% das amostras do subgrupo B (n=2), com resultado médio de 34,50%. Ambas as amostras aqui comparadas foram provenientes do estudo realizado por Virtaneem et al. (2007), que também avaliaram a atividade de inibição antioxidante da fração do soro do leite não fermentado, com resultado de 15,70%, demonstrando o diferencial da presença de L.A. na fermentação do leite, em termos de atividade antioxidante.

Sequencialmente, o teste que avalia o poder redutor foi adotado por 25,00% (n=2) das amostras do subgrupo B, as quais obtiveram como valor médio, a absorbância de 0,388. De acordo com as informações compartilhadas por Li, Liu & He (2014), o aumento na absorbância indica aumento do poder redutor da amostra, e, conseqüentemente, da atividade antioxidante. Para as amostras avaliadas no referido estudo, aquela preparada apenas com L.A. apresentou menor poder redutor, em função do menor valor de absorbância (0,138), em comparação com o resultado obtido para o leite fermentado com *Lactobacillus helveticus* (L.H.) (0,451), e também da amostra combinada entre L.H. e a levedura *Debaryomyces hansenii* H2 (0,581). Os autores ainda relacionaram o alto poder redutor de uma amostra à habilidade redutora dos aminoácidos provenientes de hidrólises proteicas durante a

fermentação, capazes de reagir com os radicais livres, estabilizá-los, e com isso, bloquear a cadeia de reações. Dessa forma, com base no resultado médio obtido para o subgrupo B, é possível verificar que, apesar de possuírem o potencial, a capacidade das amostras em atuarem como redutoras não foi pronunciada.

Outro teste considerado é a capacidade quelante dos íons metálicos, empregado por 25,00% das amostras do subgrupo B (n=2), com valor médio de 36,26%. A importância deste teste dá-se, entre outros motivos, em função da atuação do ferro como catalisador de reações que favorecem a formação de radicais livres, como o radical hidroxila, por exemplo, gerado a partir do peróxido de hidrogênio. Além disso, quando os íons metálicos são sequestrados, a formação de compostos que atuam como sinalizadoras intracelulares, é favorecida (HALLIWELL, 1995).

No estudo realizado por Parrella et al. (2012), a amostra fermentada com L.A. não obteve resultado expressivo para a capacidade quelante de íons metálicos, sendo tal característica exaltada quando o leite foi co-fermentado em adição da levedura *Saccharomyces boulardii*. Para os valores obtidos por Li, Liu and He (2014), o melhor deles foi para o leite fermentado com St (42,34%), seguido pela amostra cofermentada com L.C. e a levedura *Debaromyces hansenii* (40,09%), sendo que o leite acidófilo, por sua vez, obteve a capacidade quelante de 28,19%.

Mesmo com resultados pouco expressivos, ainda não se conhece os mecanismos pelos quais as bactérias lácticas desenvolvem a proteção contra os íons metálicos. Adicionalmente, o desfecho apresentado por Lin & Yen (1999) é de que a melhor atividade quelante dos íons metálicos foi obtido pelo extrato intracelular livre de células, exatamente como foi o caso dos leites acidófilos aqui avaliados (amostras nº 9 e 10, conforme Tabelas 2 e 3).

Além dessas, outras metodologias foram empregadas no que se refere ao subgrupo B, como o doseamento de fenóis totais, a inibição da auto-oxidação do ascorbato e a capacidade eliminatória do radical hidroxila. No entanto, não foi possível a extrapolação do resultado médio, devido a terem sido realizadas apenas em uma amostra.

No que se refere ao subgrupo C, cujos dados estão descritos na Tabela 10, 100% das amostras (n=6) foram submetidas ao método que avalia a capacidade eliminatória do radical DPPH. Dessas amostras, 66,67% (n=4) utilizaram a mesma metodologia (concentração inibitória), com resultado médio para IC50 de 1,78 mg/mL, representando a concentração da amostra necessária para a inibição de

50% da concentração inicial de radicais DPPH. Esse resultado médio se mostra superior em termos de atividade antioxidante em relação ao iogurte padrão (L.B. + S.T.) preparado por Sah et al. (2014), que atingiu o nível de 2,23 mg/mL, bem como outras amostras de iogurtes probióticos, embora ausentes de L.A., com valores de 1,83 e 1,82 mg/mL. O autor destaca que em caso de associação entre várias culturas, melhor é o perfil antioxidante do iogurte, com ênfase nas cepas probióticas, pois naquele em que associou L.B., S.T., L.A., L.C. e *Lactobacillus paracasei* (L.P.), o resultado obtido foi de 1,51 mg/mL, indicando que uma menor concentração da amostra é capaz de inibir a concentração de DPPH em 50%.

Tabela 10 Caracterização antioxidante para as amostras do subgrupo C, em comparação com dados da literatura científica

Teste	Adesão ao método	Subgrupo C	
		Resultado médio	Literatura científica
Capacidade de eliminação do radical DPPH (IC50)	66,67% (n=4)	1,78 mg/mL	2,23 mg/mL e 1,51 mg/mL (iogurte padrão: S.T. + L.B., e iogurte associado de L.B., S.T., L.A., L.C. e L.P.) Sah et al. (2014)
Capacidade de eliminação do radical DPPH (%)	33,33% (n=2)	48,71%	71,20% e 81,90% (iogurte padrão (S.T. + L.B.) e iogurte não probiótico (S.T. + L.B. + L.F.) Madhu; Amrutha & Prapulla (2012)
Capacidade de eliminação do radical ABTS (IC50)	66,67% (n=4)	1,86 mg/mL	1,63 mg/mL (iogurte associado de L.B., S.T., L.A., L.C. e L.P.) Sah et al. (2014)
Poder redutor (700 nm)	33,33% (n=2)	0,6429	0,6494 (iogurte associado de L.B., S.T. e L.A.) Zhang et al. (2015)
Capacidade quelante dos íons metálicos	33,33% (n=2)	38,47%	52,56%, 54,69% e 80,15% (iogurte padrão: S.T. + L.B.) Zhang et al. (2015), iogurte probiótico, e iogurte probiótico com concentrado proteico, respectivamente, Unal et al. (2013)

*n: número de amostras

Por outro lado, a mensuração da atividade antioxidante nos 33,33% das amostras restantes (n=2), ainda com base no método de DPPH, tiveram os resultados representados em porcentagem, com a média de 48,71%. Tal valor é

consideravelmente inferior ao descrito por Madhu; Amrutha & Prapulla (2012), que prepararam iogurtes não probióticos com média de 81,90%, iogurtes simbióticos em presença de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* (L.F.) associados com frutooligossacarídeos com resultado médio de 83,40%, e um iogurte padrão com capacidade eliminatória do radical DPPH de 71,20%, após o primeiro dia da fabricação, sendo que durante 28 dias de armazenamento, todas as amostras apresentaram melhoria no potencial antioxidante.

No entanto, o valor médio recuperado para o subgrupo C é superior aos obtidos para amostras de iogurtes tradicionais (caseiros) e comerciais, não probióticos, avaliados por Aloglu & Oner (2011), que resultaram em 17,36% e 18,67%, respectivamente. Ainda, uma amostra de leite fermentado pelo probiótico L.C., quando testada a partir de seu conteúdo intracelular, alcançou o nível de apenas 12,50% de eliminação do radical DPPH, como observado por Zhang et al. (2011).

Assim, os resultados obtidos para o método de eliminação do radical DPPH, considerando o subgrupo C, quando comparados com a amplitude de condições testadas e os diversos valores obtidos em literatura científica, ainda não permitem inferir que as características das amostras aqui estudadas se devem, de fato, à ação do L.A..

Para o teste da capacidade eliminatória do radical ABTS, que possui como finalidade a avaliação da capacidade da amostra em estabilizar radicais livres, 66,67% do total de amostras do subgrupo C (n=4) foram avaliadas, tendo alcançado o valor médio para IC50 de 1,86 mg/mL. Wang; Yu & Chou (2006), descreveram que a atividade antioxidante ótima, no geral, é obtida quando há a associação de mais de um tipo de microrganismo, em especial, em cocultura com probióticos. No caso das amostras avaliadas por Sah et al. (2014), a característica alcançada concorda com os autores anteriormente mencionados, em que o melhor perfil antioxidante geral, e também com base no teste de ABTS (1,63 mg/mL), foi obtido para o iogurte constituído por todas as cepas estudadas (L.B., S.T., L.A., L.C. e L.P).

Na sequência, o poder redutor, método que avalia a capacidade de um composto em estabilizar um radical livre em razão da doação de elétrons, foi um teste alvo em apenas 33,33% das amostras de interesse do subgrupo C (n=2), com valor médio de absorbância (700nm) de 0,6429. Nesse caso, o valor de absorbância é diretamente proporcional ao potencial antioxidante da amostra.

No estudo de Zhang et al. (2011), o resultado mais pronunciado foi obtido para o conteúdo intracelular do probiótico L.C.. Dentre as amostras de iogurte descritas por Zhang et al. (2015), o destaque foi para aquela fermentada por L.B., S.T. e L.A. (0,6494), e comparativamente, o leite fermentado apenas com L.A. apresentou absorvância de 0,6371. No entanto, com base nos experimentos de Cheng & Li (2004), a utilização apenas do método do poder redutor para a determinação da atividade antioxidante não é suficiente, sendo recomendada a associação de outras metodologias que fortaleçam os resultados encontrados, já que se trata de uma metodologia com pouco significado quando realizada de forma isolada para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra.

De forma complementar, 33,33% das amostras desse subgrupo (n=2) aplicaram o teste da capacidade quelante dos íons metálicos, resultando em um valor médio de 38,47%. Zhang et al. (2015) ao avaliarem a atividade antioxidante de iogurtes por meio desse método, observaram que a fermentação do leite por diferentes culturas não influenciou significativamente nos resultados obtidos, sendo que dentre as amostras preparadas a partir de leite bovino, a que apresentou resultado mais expressivo foi aquela preparada apenas com as culturas “starters” (L.B. + S.T.), de 52,56%.

Neste sentido, Unal et al. (2013) obtiveram bom resultado para um iogurte probiótico (54,69%), embora o iogurte probiótico fortificado com concentrado proteico de soro de leite apresentasse um comportamento frente aos íons metálicos ainda melhor (80,15%). Com base no exposto, apesar da capacidade eliminatória de íons metálicos ser uma característica conhecida das bactérias lácticas (LIN & YEN, 1999), o ideal é que tal metodologia também seja empregada em conjunto com outras técnicas de avaliação antioxidante.

Em resumo, o conjunto das metodologias utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante e o número de eventos em que foram empregadas, considerando a totalidade das amostras selecionadas, pode ser visualizado na Figura 5. Ainda, de modo a melhor representar o perfil antioxidativo, as metodologias foram também classificadas de acordo com cada subgrupo, como pode ser verificado na Tabela 2.

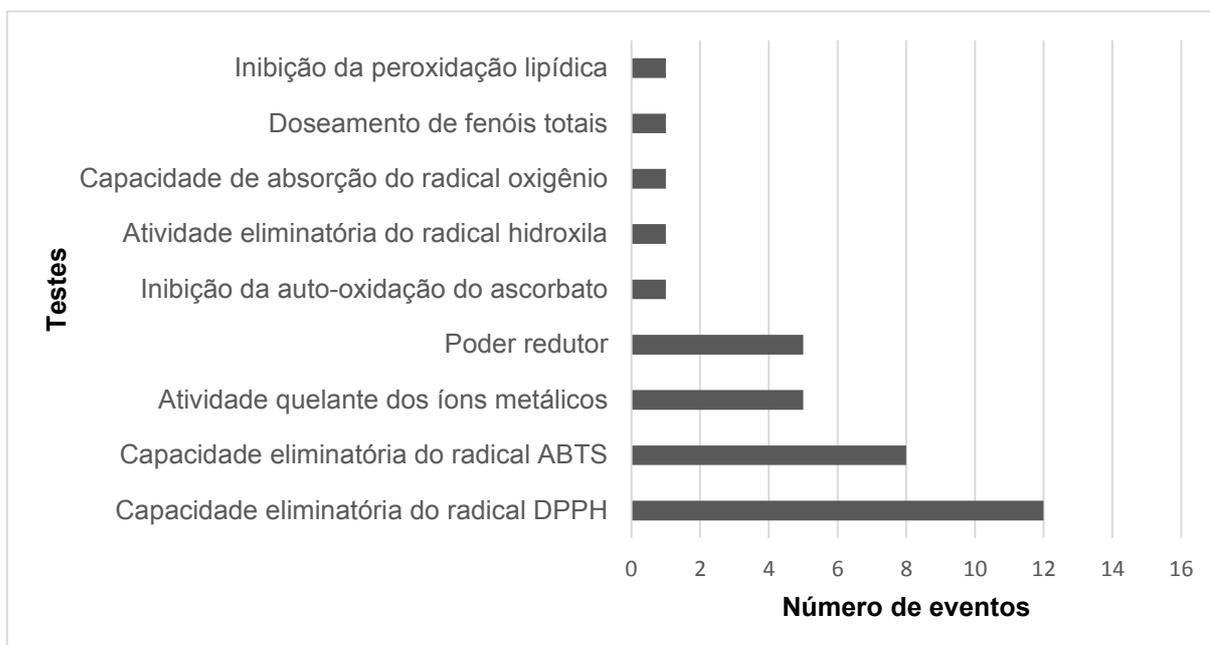


Figura 5 Tipo e número de vezes em que os métodos de atividade antioxidante foram empregados na avaliação de extratos celulares de leites fermentados, leites acidófilos e iogurtes, de 17 amostras provenientes de oito artigos recuperados, após o alcance dos critérios de inclusão da presente revisão.

Com base na Figura 5 e em adição aos dados descritos anteriormente, o teste que avalia a capacidade eliminatória do radical DPPH foi, no geral, o mais empregado dentre as avaliações de todas as amostras estudadas, com uma frequência de utilização de 70,59%, seguido do teste que mensura a capacidade eliminatória do radical ABTS, utilizado para a avaliação de 47,06% das amostras em estudo. Em seguida, a atividade quelante dos íons metálicos alcançou o mesmo nível de abordagem quando comparado ao teste do poder redutor (29,41%).

A partir do que foi constatado, pode-se inferir que o resultado pronunciado para o método de DPPH ocorreu em função de ser um método usual, de baixo custo e que possui um simples procedimento metodológico para a finalidade da avaliação da atividade antioxidante. Apesar disso, este é reconhecidamente um método frágil, capaz de conferir resultados consideravelmente variáveis de acordo com as interferências que pode sofrer ao longo do preparo, o que justifica o fato de haver resultados divergentes para amostras de mesma constituição microbiológica e que foram avaliadas por meio do mesmo método analítico.

Assim, levando em conta as características metodológicas conhecidas para o método de DPPH, sugere-se que o método de ABTS seja preferivelmente utilizado em avaliações “in vitro”, em função de também ser caracterizado por um

simples procedimento analítico, mas apresentar menor variação metodológica, e com isso, tender a conferir resultados mais confiáveis. Tais constatações foram também apresentadas por Floegel et al. (2011), quando compararam os métodos de ABTS e DPPH na avaliação da capacidade antioxidante de alimentos americanos populares, ricos em antioxidantes, tendo concluído que o perfil antioxidante foi melhor reproduzido pelo método ABTS em relação ao método de DPPH.

Sobre os testes restantes, estes foram aplicados com menor frequência, não tendo representado grande potencial de utilização na avaliação das amostras selecionadas, tendo sido os métodos de: inibição da auto-oxidação do ascorbato, atividade eliminatória do radical hidroxila, capacidade de absorção do radical oxigênio, doseamento de fenóis totais e a inibição da peroxidação lipídica. Destes últimos, com exceção daquele que avalia a inibição da peroxidação lipídica, o qual foi aplicado em uma amostra de leite fermentado, os restantes foram aplicados exclusivamente em amostras de leite acidófilo, o que pode também ser observado na Tabela 11.

Tabela 11 Classificação dos métodos de avaliação da atividade antioxidante e número de eventos em que foram empregados, com base nos subgrupos de amostras estudadas

Testes atividade antioxidante	Subgrupos		
	A	B	C
Capacidade eliminatória do radical DPPH	1	5	6
Capacidade eliminatória do radical ABTS	2	2	4
Atividade quelante dos íons metálicos	-	2	2
Poder redutor	-	2	2
Inibição da auto-oxidação do ascorbato	-	1	-
Atividade eliminatória do radical hidroxila	-	1	-
Capacidade de absorção do radical oxigênio	-	1	-
Doseamento de fenóis totais	-	1	-
Inibição da peroxidação lipídica	1	-	-
Total	4	15	14

De acordo com as informações apresentadas na tabela acima, é possível verificar que o subgrupo que englobou os leites acidófilos (B) foi melhor caracterizado quanto ao perfil antioxidante, seguido pelo subgrupo dos iogurtes (C), no que se refere ao número de testes analíticos aplicados. Na sequência, estes foram acompanhados pelos leites fermentados (A), considerados fracamente caracterizados nesse aspecto.

Sendo assim, ao levar em conta os dados apresentados até o momento, é possível inferir que muito ainda precisa ser esclarecido a respeito da atividade antioxidante de bebidas lácteas fermentadas, em especial aquelas incorporadas por bactérias probióticas. O conjunto dos resultados recuperados, por sua vez, demonstra que as metodologias analíticas podem se comportar de forma variável, de acordo com o modo de preparo das amostras, ou mesmo pelas variações nos procedimentos analíticos realizados, ainda que as metodologias empregadas sejam semelhantes.

Sobre a ação do L.A., muitos estudos já apresentaram as suas funcionalidades, com destaque para a avaliação da atividade antioxidante, mas poucas pesquisas se dedicam em avaliar o real potencial antioxidante desse tipo bactéria no alimento, após o processo de fermentação. O que ocorre com frequência, é o cultivo das bactérias, probióticas ou não, o preparo do analito a partir deste cultivo, e a aplicação dos testes analíticos para a atividade antioxidante nesse tipo de amostra. Dessa forma, estes resultados não podem ser extrapolados para a caracterização geral do alimento, pois é necessária a avaliação paralela, tanto da cultura pura quanto do alimento pronto constituído pela cultura, uma vez que o crescimento e a viabilidade dos microrganismos durante o processamento de um alimento podem ser influenciados por diversos fatores, e com isso, desencadear alterações no perfil antioxidativo do produto final.

Outro ponto pouco explorado pelos pesquisadores, e de suma importância, é a divulgação dos resultados de atividade antioxidante realizadas durante o acompanhamento no tempo de prateleira proposto para o produto, como uma maneira de destacar o aspecto funcional do alimento, não apenas após o preparo, mas enquanto atender ao prazo de validade.

A partir da classificação das amostras por subgrupos, foi possível visualizar quais produtos foram melhor caracterizados, e ainda, verificar que na presença do L.A. a maioria das amostras apresentaram resultados consideravelmente superiores

quando comparadas com dados da literatura científica. Por isso, até o momento, o que se pode entender é que os fatos favorecem a ação efetiva das bebidas lácteas fermentadas por L.A. contra os radicais livres.

Mantendo o ponto de vista, é possível propor novos horizontes aos pesquisadores desse ramo, como estudos melhor desenhados e amplas comparações, onde as bactérias sejam associadas em um alimento, mas com os resultados reportados tanto para o cultivo isolado, para o cultivo das bactérias associadas, no alimento com cada um dos microrganismos possíveis de serem utilizados, bem como do produto em combinação de todas as condições propostas, e ainda, isento de microrganismos, como modo de comparação. Além disso, estabelecer um protocolo a respeito das metodologias de interesse, e aplicá-las com uniformidade para todas as amostras, para que seja possível visualizar os resultados com base em todas as situações previstas, favorecendo as conclusões e a tomada de decisão a partir de trabalhos melhor estruturados.

5.8 Resultados direcionados aos artigos com desenho experimental “in vivo”

No que se refere ao grupo de artigos com desenho experimental “in vivo”, um total de seis artigos foram selecionados para a leitura de seus conteúdos integrais. Destes, cinco artigos foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão, quatro deles sendo estudos realizados em animais, e um deles em humanos. Dessa forma, apenas um artigo atendeu aos critérios de inclusão, como pode ser observado por meio da Figura 6.

Tendo como base a estratégia de busca traçada no que se refere ao desenvolvimento da pesquisa direcionada aos estudos com desenho experimental “in vivo”, e considerando que apenas um artigo (EJTAHED et al., 2012) atendeu aos critérios de inclusão preestabelecidos para o trabalho, não foi possível concluir esta etapa da investigação, devido à necessidade de haver no mínimo dois artigos que atendam aos critérios de inclusão para que seja possível realizar as comparações pertinentes e favorecer o desenvolvimento de um racional sobre o assunto, a partir dos dados já publicados em literatura.

Com isso, o destaque da pesquisa ocorreu apenas no que concerne aos estudos publicados e dados extraídos de estudos “in vitro”, como anteriormente apresentado.

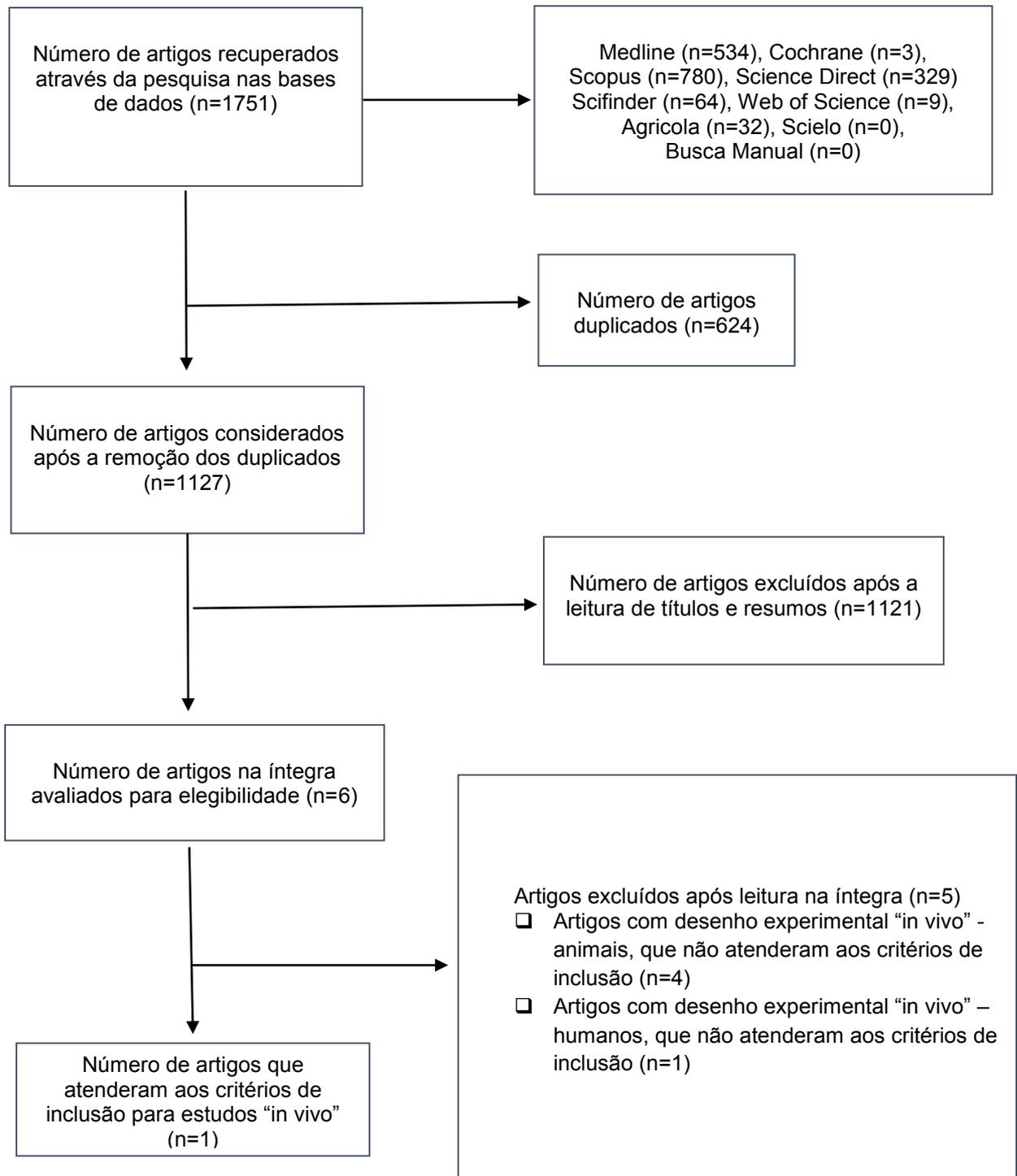


Figura 6 Fluxograma da seleção de estudos com desenho experimental "in vivo", adaptado de Liberati et al. (2009).

5.9 Informações adicionais obtidas por meio do contato direto com os autores

Durante o desenvolvimento da pesquisa, alguns autores dos artigos científicos em avaliação tiveram de ser contatados e solicitados a compartilharem, ou os estudos na íntegra para o cumprimento do protocolo da pesquisa e demais avaliações pertinentes, ou solicitados a fornecerem informações adicionais não descritas nos artigos já selecionados após a leitura na íntegra, informações estas, indispensáveis para a etapa de extração dos dados e consequente composição da presente revisão sistemática.

Após a seleção dos artigos, considerando a leitura de títulos e resumos, e, na sequência, a leitura dos artigos em seu conteúdo integral, a busca por informações adicionais junto aos autores teve início no mês de março de 2016, e a conclusão no mês de julho do mesmo ano. Sobre este ponto, a Tabela 12 apresenta o percentual de retorno obtido, envolvendo solicitações direcionadas tanto aos artigos ainda em etapa de seleção quanto aos artigos incluídos após a leitura na íntegra, bem como o somatório das solicitações e o percentual de retorno e efetividade alcançado.

Tabela 12 Classificação dos artigos que requereram contato direto com os seus autores, e as taxas de retorno e efetividade obtidas para cada grupo de artigos considerado

Itens avaliados	Artigos alvos de questionamento			
	Artigos em etapa de seleção	Artigos incluídos após a leitura na íntegra	Total	Taxa de retorno total (%)
Número de artigos envolvidos	4	3	7	-
Número de solicitações	21	15	36	-
Número de retornos obtidos	5	5	10	27,78
Taxa de retorno por classificação do artigo (%)	23,81	33,33	-	-
Taxa de efetividade no retorno (%)	100,00	100,00	-	-

Com base na referida tabela, é válido ressaltar que, para os quatro artigos em etapa de seleção, os quais dependeram do retorno de seus autores para a inclusão ou não na pesquisa, 21 solicitações foram enviadas ao todo (incluindo solicitações e

re-solicitações), com um total de cinco respostas obtidas, o que representou 23,81% do total de contatos realizados. Desses, dois dos quatro artigos obtidos na íntegra foram incluídos na presente pesquisa, devido aos seus conteúdos atenderem aos critérios de inclusão previamente estabelecidos.

Os artigos incluídos após os retornos, foram provenientes do autor Galin Ivanov, escritos e publicados na Bulgária (IVANOV, G., 2007a; IVANOV, G., 2007b). Por consequência, os dois artigos restantes (HAE-SEON et al., 2006; ZHANG et al., 2015) foram descartados após a leitura na íntegra, levando em conta que os seus conteúdos não atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos. Apesar disso, a taxa de efetividade foi considerada de 100% para este grupo de artigos, uma vez que os quatro estudos solicitados na íntegra foram recebidos.

Por outro lado, para os três artigos já selecionados após a sua leitura integral, mas que ainda requereram contato direto com os autores para esclarecimentos relacionados aos seus conteúdos, no total, 15 solicitações foram enviadas via e-mail (incluindo solicitações e re-solicitações), das quais cinco respostas foram obtidas (33,33%), tendo sido as cinco efetivas (100,00%), e as dúvidas a partir destes artigos, portanto, foram sanadas.

Em adição, considerando o total de contatos diretos necessários nesta pesquisa (envolvendo os artigos já incluídos e aqueles em etapa de seleção), a taxa geral de retorno considerando o total de emails enviados, foi de 27,78%.

As informações obtidas por meio deste tópico levam a incentivar a prática do contato direto com autores, sejam eles de artigos já incluídos na pesquisa ou de estudos ainda em etapa de seleção, pois apesar do tempo dispensado até a obtenção das respostas de interesse, muitas informações úteis puderam ser conseguidas com essa atividade. Essas informações são capazes de auxiliar fortemente na tomada de decisão quanto à inclusão ou não destes estudos na constituição final da revisão sistemática/meta-análise, tornando o trabalho otimizado e confiável, uma vez que as informações de interesse são obtidas diretamente dos autores principais.

Por fim, é válido ressaltar a importância de se evitar, dentro do possível, ocultar informações metodológicas dos artigos a serem publicados, uma vez que esses detalhes podem servir de ferramentas para o desenvolvimento de futuras pesquisas na área, e com isso, reduzir a probabilidade de que os artigos sejam descartados devido à limitada quantidade de informações disponíveis.

6 CONCLUSÃO

A presente revisão sistemática reuniu evidências contidas na literatura científica direcionadas à avaliação da atividade antioxidante de leites fermentados provenientes apenas de estudos com desenho experimental “in vitro” em presença de L.A., entre outros aspectos metodológicos de interesse. Sobre isso, uma variação considerável foi observada na constituição microbiológica das amostras incluídas, o que influenciou diretamente na diferença da atividade antioxidante entre os subgrupos avaliados. Apesar disso, quando o probiótico de interesse se faz presente na formulação das bebidas, observa-se, quase na totalidade dos casos, resultados superiores em termos de atividade antioxidante.

Ainda, com base na literatura consultada para demais embasamentos, o que se encontra na maioria dos casos é que a presença deste probiótico se faz satisfatória em fornecer proteção antioxidante quando adicionada em leites fermentados, e que, portanto, a menos que se busque outras características de interesse, apenas a presença dessa espécie bacteriana parece ser suficiente para conferir o aspecto antioxidante desejável. Isso porque, quando em presença de outras bactérias, probióticas ou não, a atividade antioxidante apesar de ser melhorada, não ocorre de modo proporcional. Assim, as bebidas lácteas fermentadas em presença de L.A. poderiam ser consumidas com a premissa de proteção antioxidante, principalmente por indivíduos acometidos por doenças de fisiopatologias envolvidas com o estresse oxidativo.

Considerando ainda os resultados aqui alcançados, destaca-se a importância da associação de métodos analíticos para a determinação de atividade antioxidante, uma vez que quando mais de uma técnica é empregada para este fim, maior a precisão dos resultados obtidos e mais confiável será a conclusão do estudo. Como destaque metodológico, devido aos resultados consistentes que confere, pode-se mencionar o método ABTS a ser aplicado em avaliações “in vitro”.

Em suma, a pesquisa realizada reuniu informações de diversos âmbitos de interesse na área de bebidas fermentadas, bem como informações a respeito do uso de L.A. voltado à sua propriedade antioxidante, e enfatiza a necessidade de estudos futuros direcionados ao rastreamento desta propriedade funcional quando avaliada após o consumo do alimento por humanos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos a partir deste estudo, a sugestão para os grupos de pesquisa que concentram os seus trabalhos nesta mesma área de interesse, propondo a utilização contínua das ferramentas da saúde baseada em evidências para a obtenção de respostas que venham a favorecer as futuras pesquisas em bancada, ou até mesmo favorecer o desenvolvimento dos estudos clínicos, devido à riqueza de informações e direcionamentos que se pode obter com este tipo de investigação; bem como encontrar orientações aplicáveis à terapêutica. Além disso, é possível encontrar respostas relevantes em estudos deste mesmo âmbito, e que já foram concluídos, ou seja, se torna possível concentrar os recursos disponíveis em direção a novas pesquisas, e evitar a realização de estudos repetidos, partindo de informações já disponibilizadas na literatura científica.

Ainda, para estudos de maior relevância clínica, sugere-se utilizar as informações obtidas a partir da presente pesquisa, para o desenvolvimento de novas revisões sistemáticas e meta-análises com estratégias em busca direcionadas exclusivamente para estudos clínicos.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.; FERREAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicação da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**. v.30, n.3, p. 623-628, 2007.
- AIKENS, J.; DIX, T. A., Perhydroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides, **Journal of Biological Chemistry**. v.266, n.23, p.15091-15098, 1991.
- AJIBOLA, C.F.; FASHAKIN, J.B; FAGBEMI, TN.N.; ALUKO, R.E. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. **International Journal of Molecular Sciences**. v.12, n.10, p.6685-6702, 2011.
- AKABANDA, F.; OWUSU-KWARTENG, J.; TANO-DEBRAH, K.; PARKOUDA, C.; JESPERSEN, L. The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of Nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana. **International Journal of Food Science**. v.2014, p.1-11, 2014.
- AKALIN, A.S. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. **Trends in Food Science & Technology**. v.36, p.79-95, 2014.
- ALAM, Md., N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 21, p.143–152, 2013.
- ALOGLU, H.S.; ONER, Z. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. **Journal of Dairy Science**. v.94, p.5305-5314, 2011.
- ALMEIDA, A.P.S.; AVI, C.M.; BARBISAN, L.F.; MOURA, N.A.; CAETANO, B.F.R.; ROMUALDO, G.R.; SIVIERI, K. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 reduce the early phases of colon carcinogenesis in male Wistar rats. **Food Research International**. v.74, p.48–54, 2015.
- ALTERMANN, E.; RUSSELL, W.M.; AZCARATE-PERIL, M.A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B.L.L.; McAULIFFE, O.; SOUTHER, N.; DOBSON, A.; DUONG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, TR. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**. v.102, n.11, p.3906–3912, 2005.
- 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 and Biotechnology**. v.97, p.809-917, 2013.
- ANDERSON, J.W.; GILLILAND, S.E. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. **Journal of the American College of Nutrition**. v.18, n.1, p.43–50, 1999.

ANDREASEN, A.S.; LARSEN, N.; PEDERSEN-SKOVSGAARD, T.; BERG, R.M.; MOLLER, K.; SVENDSEN, K.S.; JAKOBSEN, M.; PEDERSEN, B.K. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. **British Journal of Nutrition**. v.104, n.12, p.1831–1838, 2010.

ANKOLEKAR, C.; JOHNSON, K.; PINTO, M.; JOHNSON, D.; LABBE, R.G.; GREENE, D.; SHETTY, K. Fermentations of whole apple juice using *Lactobacillus acidophilus* for potential dietary management of hyperglycemia, hypertension, and modulation of beneficial bacterial responses. **Journal of Food Biochemistry**. v.36, n.6, p.718-738, 2012.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic microorganisms during storage, post acidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. **International Journal of Dairy Technology**. v. 58, n.3, p.169-173, 2005.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I.; HAEDIAN, R.; SHETTY, K. Fermentation of Milk and Soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* Enhances Functionality for Potential Dietary Management of Hyperglycemia and Hypertension. **Food Biotechnology**. v.21, p.217-236, 2007.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2014, p.1-31, 2014.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; De PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

BECERRA, M.; RODRÍGUEZ-BELMONTE, E.; CERDÁN, E.; SISO, I.G. Extraction of Intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology Biotechnology**. v.39, n.2, p.135-139, 2001.

BERWANGER, O.; SUZUMURA, E.A.; BUEHLER, A.M.; OLIVEIRA, J.B. Como avaliar criticamente revisões sistemáticas e metanálises? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v.19, n.4, p.475-480, 2007.

BING, S.R.; KINOUCHI, T.; KATAOKA, K.; KUWAHARA, T.; OHNISHI, Y. Protective effects of a culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* and antioxidants on ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug. **Microbiology and Immunology**. v.42, n.11, p.745–753, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CULEVIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. v.28, p.25,30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.** Atualizado em julho, 2008. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 6 ago, 2016.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 46 de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Leis, decretos etc. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de out, 2007, Seção 1, p.5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais comparativos sobre fatores de risco e prognóstico. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 132p., 2014.

BULATOVIC, M.L.; KRUNIC, T.Z.; VUKASINOVIC-SEKULIC, M.S.; ZARIC, D.B.; RAKIN, M.B. Quality attributes of a fermented whey-based beverage enriched with milk and a probiotic strain. **Royal Society of Chemistry**. v.4, p.55503-55510, 2014.

CARILLON, J.; ROUANET, J.M.; CRISTOL, J.P.; BRION, R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: Several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. **Pharmaceutical Research**. v.30, p.2718-2728, 2013.

CASAROTTI, S.N.; MONTEIRO, D.A.; MORETTI, M.S.; PENNA, A.L.B. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. **Food Research International**. v.59, p.67–75, 2014.

CASTELLAZZI, A.M.; VALSECCHI, C.; CAIMMI, S.; LICARI, A.; MARSEGLIA, A.; LEONI, M.C.; CAIMMI, D.; DEL GIUDICE, M.M.; LEONARDI, S.; LA ROSA, M.; MARSEGLIA, G.L. Probiotics and food allergy. **Italian Journal of Pediatrics**. v.39, n.47, p.1-10, 2013.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**. v.49, n.3, p.481-493, 1993.

CHENG, Z.; LI, Y. Reducing powder: the measure of antioxidant activities of reductant compounds? **Redox Report**. v.9, n.4, p.213-217, 2004.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme and Microbial Technology**. v.8, p.194-204, 1986.

CHOI, S.S.; KIM, Y.; HAN, K.S.; YOU, S.; OH, S.; KIM, S.H. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**. v.42, n.5, p.452-458, 2006.

CHRISTENSEN, J.E.; DUDLEY, E.G.; PEDERSON, J.A.; STEELE, J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.76, p.217–246, 1999.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ANCÂNTARA, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yoghurt and probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**. v.39, p.40–55, 2008.

DEBON, J.; PRUDÊNCIO, E.S.; PETRUS, J.C.C Rheological and physico-chemical characterization of prebiotic microfiltered fermented milk. **Journal of Food Engineering**. v.99, p.128–135, 2010.

DE CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**. v.74, p.185-198, 2015.

DELCOUR, J.; FERAIN, T.; DEGHORAIN, M.; PALUMBO, E.; HOLS, P. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.76, p.159–184, 1999.

DESAI, A.R.; POWELL, I.B.; SHAH, N.P. Survival and activity of probiotic *Lactobacillus* in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**. v.69, n.3, p. 57-60, 2004.

DESROUILLÈRES, K.; MILLETTE, M.; VU, K.D.; TOUJA, R.; LACROIX, M. Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. **Journal of Functional Foods**. v.17, p.816–827, 2015.

DE VRESE, M.; KRISTEN, H.; RAUTENBERG, P.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. **Journal of Dairy Research**. v.78, n.4, p.396–403, 2011.

EJTAHED, H.A.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A.; NIAFAR, M; ASGHARI-JAFARABADI, M.; MOFID, V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**. v.28, p.539–543, 2012.

EL DIB, R.P. Como praticar a medicina baseada em evidências. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.6, n.1, p.1-4, 2007.

EL DIB, R.P.; ATALLAH, A.N. Fonoaudiologia baseada em evidências e o Centro Cochrane do Brasil. **Diagnóstico e Tratamento**. v.11, n.2, p.103-106, 2006.

FARVIN, K.H.S.; BARON, C.P.; NIELSEN, N.S.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω -3 enriched milk. **Food Chemistry**. v.123, p.1081–1089, 2010.

FARVIN, K.H.S.; BARON, C.P.; NIELSEN, N.S.; OTTE, J.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**. v.123, p.1090–1097, 2010.

FEIHRMANN, A.C. Doce de leite: revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.118, p.21-23, mar. 2004.

FERNÁNDEZ MURGA, M.L.; CABRERA, G.M.; FONT DE VANDEZ, G.; DISALVO, A.; SELDES, A.M. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**. v.88, p.342-348, 2000.

FISBERG, M.; MACHADO, R. History of yogurt and current patterns of consumption. **Nutrition Reviews**. v.73, p.4-7, 2015.

Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). **FAO Food and Nutrition Paper**. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. v.85, p.1-4, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 8 ago, 2016.

Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. p.1-11, 2002. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Acesso em: 8 ago, 2016.

FLOEGEL, A.; KIM D-O; CHUNG, S-J. KOO, S.I.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.24, p.1043-1048, 2011.

GALVÃO, T.F.; PEREIRA, M.G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.23, n.1, p.183-184, 2014.

GEBICKI, J.M. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.595, p.33 - 39, 2016.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – a review. International. **Dairy Journal**. v.12, p.541–553, 2002.

GHANY, K.A.E. Evaluation of antioxidant and antitumor activities of *Lactobacillus acidophilus* bacteria isolated from Egyptian infants. **International Journal of Pharmacology**. v.10, n.5, p.282-288, 2014.

GILL, S.S.; ANJUM, N.A.; HASANUZZAMAN, M.; GILL, R.; TRIVEDI, D.K.; AHMAD, I.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.70, p.204-212, 2013.

GILLILAND, S.E.; RICH, C.V. Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* grow at different pH. **Journal of Dairy Science**. v.73, p.1187-1192, 1990.

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

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar: Boletim de Tecnologia**. v.101, p.12-22. 2002.

HAE-SEON, N.; KYONG-AE, L.; YONG-JIN, L.; YONG-JIN, L.; YONG-BAE, K.; SUNG-HO, K.; SANG-HAN, L.; SUN-HWA, L.; YOON-JIN, L.; HO-YOUNG, K.; YOUNG-TAE, A.; KWANG-SEI, L.; CHUL-SUNG, H. Effects of the fermented milk intake on human antioxidant activity and blood alcohol concentration. **Food Science and Biotechnology**. v.15, n.1, p.82-85, 2006.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.280, n.1, p.1-8, 1990.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **The lancet**. v.344, p.721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radical and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.35, n.1-2, p.7-20, 1995.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. v.33, n.7, p.601-617, 1995(b).

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. 'The Genus *Lactobacillus*' in The Lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria, (Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H., eds), pp. 409-417. **Encyclopedia of food Microbiology**. Blackie Academic, London, 1995.

HATA, Y.; YAMAMOTO, M.; OHNI, M.; NAKAJIMA, K.; NAKAMURA, Y.; TAKANO, T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects, **American Journal of Clinical Nutrition**. v.64, n.5, p.767-771, 1996.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M.J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, A. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**. v.38, p.82-100, 2014.

HEYLAND, D.K.; DHALIWAL, R.; SUCHNER, U.; BERGER, M.M. Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. **Intensive Care Medicine**. v.31. n.3, p.327-337, 2005.

HIGGINS, J.P.T.; GREEN, S. (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]. **The Cochrane Collaboration**, 2011.

HOR, Y.Y.; LIONG, M.T. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. **Dermatologica Sinica**. v.32, p.141-147, 2014.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.1841-1856, 2005.

IRAVANI, S.; KORBOKANDI, H.; MORMOHAMMADI, S.V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. **Journal of Food Science and Technology**. v.52, n.8, p.4679–4696, 2015.

IVANOV, G. In situ antioxidative activity of monocultures of lactic acid bacteria. **Nauchni Trudove Na Meditsinskata Akademia**. v.54, p.37-42, 2007a.

IVANOV, G. Technological and functional characteristics of starter cultures for fermented milks. **Nauchni Trudove Na Meditsinskata Akademia**. v.54, p.43-48, 2007b.

JAFAREI, P.; EBRAHIMI, M.T. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. **African Journal of Microbiology Research**. v.5, n.24, p.4033-4042, 2011.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products – challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**. v.21, p.175–181, 2010.

JAYAPRAKASH, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55, p.1018–1022, 2001.

JIMÉNEZ, A.M.; MURCIA, M.A.; PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M. On the importance of adequately choosing the ingredients of yoghurt and enriched milk for their antioxidant activity. **International Journal of Food Science and Technology**. v.43, p.1464–1473, 2008.

KADOOKA, Y.; SATO, M.; IMAIZUMI, K.; OGAWA, A.; IKUYAMA, K.; AKAI, Y.; OKANO, M.; KAGOSHIMA, M.; TSUCHIDA, T. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lacto-bacillus gasser* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.64, n.6, p.636-643, 2010.

KHORSAN, R.; CRAWFORD, C. External validity and model validity: A conceptual approach for systematic review methodology. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v.2014, p.1-12, 2014.

KIM, H.S.; CHAE, H.S.; JEONG, S.G.; HAM, J.S.; IM, S.K.; AHN, C.N.; LEE, J.M. *In vitro* Antioxidative Properties of Lactobacilli. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.19, n.2, p.262-265, 2006.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G.; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International Dairy Journal**. v.13, p.517-528, 2003.

KULA, M.R.; SCHÜTTE, H. Purification of proteins and the disruption of microbial cells. **Biotechnology Progress**. v.3, n.1, p.31-42, 1987.

KUMAR, A.; KUMAR, D. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* culture. **Journal of Food Science and Technology**. v.53, n.1, p.667-675, 2016.

KUNJI, E.R.S.; MIERAU, I.; HAGTING, A.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.70, p.187-221, 1996.

KWON, Y.C.; JEWETT, M.C. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. **Scientific Reports**. v.5, p.1-8, 2015.

LABAYEN, I.; FORGA, L.; GONZÁLEZ, A.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; MARTÍNEZ, J.A. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. v.15, n.4, p.543-549, 2001.

LEE, J.; HWANG, K.T.; CHUNG, M.Y.; CHO, D.H.; PARK, C.S. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to Reactive Oxygen Species (ROS): Role for a Metal Ion Chelating Effect. **Journal of Food Science**. v.70, n.8, p.388-391, 2005.

LEE, W.J.; LUCEY, J.A. Formation and physical properties of yogurt. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.9, n.9, p.1127-1136, 2010.

LI, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; HUANG, L.; NIU, C.; YANG, Z.; WANG, Q. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. **Food Chemistry**. v.135, n.3, p.1914-1919, 2012.

LI, S.; MA, C.; GONG, G.; LIU, Z.; CHANG, C.; XU, Z. The impact of onion juice on milk fermentation by *Lactobacillus acidophilus*. **Food Science and Technology**. v.65, p.543-548, 2016.

LI, Y.; LIU, T.; HE, G. Antioxidant activity of peptides from fermented milk with mix culture of lactic acid bacteria and yeast. **Advance Journal of Food Science and Technology**. v.7, p.422-427, 2015.

LIBERATI, A.; ALTMAN, D.G.; TETZLAFF, J.; MULROW, C.; GOTZSCHE, P.C.; IOANNIDIS, J.P.A.; CLARKE, M.; DEVEREAUX, P.J.; KLEIJNEN, J.; MOHER, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: Explanation and elaboration. **British Medical Journal**, v. 339, 2009.

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

LIN, M.Y.; CHANG, F.J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**. v.45, n.8, p.1617-1622, 2000.

LIN, M.Y.; YEN, C.L. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.4; p.1460-1466, 1999.

LIU, C.F.; PAN, T.M. In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.18, n.2, p.77-86, 2010.

LOBO, V.; PATIL, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. v.4, n.8, p.118-126, 2010.

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**. v.14, p.47-53, 2004.

LUOTO, R.; KALLIOMÄKI, M.; LAITINEN, K.; ISOLAURI, E. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. **International Journal of Obesity**. v.34, n.10, p.1531-1537, 2010.

MADHU, A.N.; AMRUTHA, N.; PRAPULLA, S.G. Characterization and antioxidant property of probiotic and symbiotic yogurts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. v.4, p.90-97, 2012.

MAKINO, S.; SATO, A.; GOTO, A.; NAKAMURA, M.; OGAWA, M.; CHIBA, Y.; HEMMI, J.; KANO, H.; TAKEDA, K.; OKUMURA, K.; ASAMI, Y. Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. **Journal of Dairy Science**. v.99, n.2, p.915-923, 2016.

MARTEAU, P.; SEKSIK, P. Place des probiotiques dans la prevention et le traitement des diarrhees post-antibiotiques. **Revue Française des Laboratoires**. v.368, p.73-76, 2004.

MASEKO, T.; HOWELL, K.; DUNSHEA, F.R.; NG, K. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* increases expression and activity of glutathione peroxidase-1 and expression of glutathione peroxidase-2 in rat colon. **Food Chemistry**. v.146, p.327-333, 2014.

McGEE, H. On food and cooking: The science and lore of the kitchen. **New York: Scribner**. p.44-51, 2004.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**. v.129, p.39-148, 2011.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NÉMETI, B.; POÓR, M.; GREGUS, Z. A high-performance liquid chromatography-based assay of glutathione transferase ω 1 supported by glutathione or non-physiological reductants. **Analytical Biochemistry**. v.469, p.12-18, 2015.

NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1840, p.809-817, 2014.

NIKKHAH, A. Yogurt the most natural and healthy probiotic: history reveals. **Journal of Probiotics & Health**. v.2, n.2, 2014.

NUVLAC. 61% dos brasileiros consome mais iogurte hoje do que há 3 anos. **Núcleo para valorização dos produtos lácteos na alimentação humana. (NUVLAC)**. Minas Gerais, 24 de fevereiro de 2015. Disponível em: <<http://www.nuvlac.com.br/profiles/blogs/61-dos-brasileiros-consomem-mais-iogurte-hoje-do-que-ha-3-anos>>. Acesso em: 3 ago. 2016.

OGAWA, A.; KOBAYASHI, T.; SAKAI, F.; KADOKA, Y.; KAWASAKI, Y. Lactobacillus gasseri SBT2055 suppresses fatty acid release through enlargement of fat emulsion size in vitro and promotes fecal fat excretion in healthy Japanese subjects. **Lipids in Health and Disease**. v.14, n.20, p.1-10, 2015.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**. v.11, p.935–942, 2001.

OSTLIE, H.M.; HELLAND, M.H.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**. v.87, p.17-27, 2003.

OU, C.C.; LU, T.M.; TSAI, J.J.; YEN, J.H.; CHEN, H.W.; LIN, M.Y. Antioxidative Effect of Lactic Acid Bacteria: Intact Cells vs. Intracellular Extracts. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.17, n.3, p.209-216, 2009.

PARRELLA, A.; CATERINO, E.; CANGIANO, M.; CRISCUOLO, E.; RUSSO, C.; LAVORGNA, M.; ISIDORI, M. Antioxidant properties of different milk fermented with lactic acid bacteria and yeast. **International Journal of Food Science & Technology**. v.47, p.2493-2502, 2012.

PEREIRA, M.G.; GALVÃO, T.F. Extração, avaliação da qualidade e síntese dos dados para revisão sistemática. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.23, n.3, p.577-578, 2014.

PERPEROPOULOU, F.; ATAYA, F.S.; FOUAD, D.; MALIK, A.; SAEED, H.M.; LABROU, N.E. Biochemical characterization of the detoxifying enzyme glutathione transferase P1-1 from the Camel *Camelus dromedaries*. **Cell Biochemistry and Biophysics**. v.74, p.459-472, 2016.

PERSUAD N.; MAMDANI, M.M. External validity: the neglected dimension in evidence ranking. **Journal of Evaluation in Clinical Practice**. v.12, n.4, p. 450–453, 2006.

PICCOLOMINI, A.F.; ISKANDAR, M.M.; LANDS, L.C.; KUBOW, S. High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate

inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. **Food & Nutrition Research**. v.56, article number: 17549, 2012.

PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**. v.37, p.251-256, 2014.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v.63, p.1035-1042, 2000.

PINTO, L.P.S.; ALMEIDA, P.C.; BARACHO, M.; SIMIONI, P.U. O uso de probióticos para o tratamento do quadro de intolerância à lactose. **Revista Ciência & Inovação – FAM**. v.2, n.1, p.56-65, 2015.

POLIDORI, M.C.; SCHOLTES, M. Beyond and behind the fingerprints of oxidative stress in age-related diseases: Secrets of successful aging. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.595, p.50-53, 2016.

PUUPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A-M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**. v.13, n.1, p.3-11, 2002.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAMESH, V. Comparative evaluation of selected strains of lactobacilli for the development of antioxidant activity in milk. **Dairy Science & Technology**. v.92, p.179–188, 2012.

RAMOS, A.C.S.M.; STAMFORD, T.L.M.; MACHADO, E.C.L.; De LIMA, F.R.B.; GARCIA, E.F.; ANDRADE, S.A.C.; Da SILVA, C.G.M. Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. **Semina: Ciências Agrárias**. v.34, n.6, p.2817-2828, 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. v.26, n.9-10, p.1231–1237, 1999.

RIJKERS, G.T.; De VOS, W.M.; BRUMMER, R-J.; MORELLI, L.; CORTHER, G.; MARTEAU, P. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. **British Journal of Nutrition**. v.106, p.1291-1296, 2011.

RODRÍGUEZ, C. Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. **Journal of Dairy Science** Vol. v.92, n.6, p.2423-2434, 2009.

RODRIGUES, C.L.; ZIEGELMANN, P.K. Metanálise: Um guia prático. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**. v.30, n.4, p.436-447, 2010.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. v.12, p.163–171, 2002.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R.E.; BRITO, E. de S.; MORAIS, S.M. de; SAMPAIO, C. de G.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Comunicado técnico on line 128**, EMPRAPA, p.1-4, 2007.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.42, n.1, p.01-16, 2006.

SAADATZADEH, A.; FAZELI, M.R.; JAMALIFAR, H.; DINARVAND, R. Probiotic properties of lyophilized cell free extract of *Lactobacillus casei*. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**. v.8, n.3, p.131-137, 2013.

SAH, B. N. P.; VASILJEVIC, T.; McKECHNIE, S.; DONKOR, O.N. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food Chemistry**. v.7, p.109-114, 2014.

SAIDE, J.A.O.; GILLILAND, S.E. Antioxidative activity of Lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.1352-1357, 2005.

SAITO, T. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. **Animal Science Journal**. v.75, p.1-13, 2004.

SAMPAIO, R.F.; MANCINI, M.C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v.11, n.1, p.83-89, 2007.

SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**. v.84, n.2, p.319-331, 2001.

SAREELA, M.; MONGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**. v.84, p.197–215, 2000.

SARKAR, S.; MISRA, A.K. Technological and dietetic characteristics of probiotic acidophilus milk. **British Food Journal**. v.112, n.3, p.275-284, 2010.

SARSOUR, E.H.; KALEN, A.L.; GOSWAMI, P.C. Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.20, n.10, p.1618-1627, 2014.

SBA. Consumo de iogurte aumenta no Brasil e laticínios investem na produção. São Paulo, 11 de março de 2015. **Sistema Brasileiro do Agronegócio - SBA**. Disponível em: <http://www.sba1.com/noticias/49565/consumo-de-iogurte-aumenta-no-brasil-e-laticinios-investem-na-producao>. Acesso em: 10 ago. 2016.

SINGHAL, M.; PAUL A.; SINGH, H.P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**. v.18, p.121–127, 2014.

SLATER, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**. p.209-218, 1984.

SLOVER, C.M.; DANZIGER, L. *Lactobacillus*: a review. **Clinical Microbiology Newsletter**. v.30, n.4, 23-27, 2008.

SODINI, I.; LUCAS, A.; OLIVEIRA, M.N.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture and probiotic cell counts in fermented milk processing. **Journal of Dairy Science**. v.85, n.10, p.2479–2488, 2002.

SONGISEPP, E.; KALS, J.; KULLISAAR, T.; MÄNDAR, R.; HÜTT, P.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. **Nutrition Journal**. v.4, n.22, p. 2005.

SOUKOULIS, C.; PANAGIOTIDIS, P.; KOURELI, R.; TZIA, C. Industrial yogurt manufacture: Monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. **Journal of Dairy Science**. v.90, n.6, p.2641-2654, 2007.

SOUSA, C.M. de M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; Da COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B. de M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUSA, R.M.; RIBEIRO, A.L.P. Revisão sistemática e meta-análise de estudos de diagnóstico e prognóstico: um tutorial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.92, n.3, p. 241-251, 2009.

SRIKANTA, B.M.; SIDDARAJU, M.N.; DHARMESH, S.M. A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity. **World Journal of Gastroenterology**. v.21, n.13, p.5196-5207, 2007

STECKLER, A.; McLEROY, K.R. The importance of external validity. **American Journal of Public Health**. V.98, n.1, p. 9–10, 2008.

SZAJEWSKA, H. Understanding the role of probiotics and prebiotics in preventing allergic disease: evidence and methodological issues. **Immunotherapy**. v.5, n.8, p.869-878, 2013.

TANG, X.; HE, Z.; DAI, Y.; XIONG, Y.L.; XIE, M.; CHEN, J. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, n.1, p.587-593, 2010.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19, n.6-7, p.669–675, 2006.

UNAL, G.; EL, S.N.; AKALIN, A.S.; DINKCI, N. Antioxidant activity of probiotic yoghurt fortified with milk protein based ingredients. **Italian Journal of Food Science**. v.25, p.63-69, 2013.

URGELL, M.R.; ORLEANS, A.S.; SEUMA, M.R.P. La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. **Nutrición Hospitalaria**. v.20, n.2, p.135-146, 2005.

U.S. Department of Health and Human Services. **FDA – Food and Drug Administration**. 21CFR131.200, Revised as of April 1, 2015.

VANDENPLAS, Y. Author's reply: Identification of probiotics by specific strain name. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v.35, n.7, p.860, 2012.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria (Rio J)**. v.91, n.1, p.6-21, 2015.

VANDERHOOF, J.A.; WHITNEY, D.B.; ANTONSON, D.L.; HANNER, T.L.; LUPO, J.V.; YOUNG, R.J. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. **Journal of Pediatrics**. v.135, n.5, p.564–568, 1999.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; Da CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina, Ribeirão Preto**. v.31, p.31-44, 1998.

VASCONCELOS, S.M.M.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**. v.18, p.714-728, 2008.

VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products. **Journal of Dairy Science** v.85, p.721-729, 2002.

VIRTANEN, T.; PIHLANTO, A.; AKKANEN, S.; KORHONEN, H. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v.102, n.1, p.106-115, 2007.

XIE, C.; LI, J.; WANG, K.; LI, Q.; CHEN, D. Probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhoea in older patients: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**. v.13, n.2, p.128-134, 2015.

ZANONI, S. Growth kinetics on oligo- and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**. v.105, p.1266–1276, 2008.

ZHANG, J.; WANG, D.; ZHANG, J.; WANG, Y.-H. Extraction and antioxidant activity of the soluble protein from *Lactobacillus rhamnosus* broth. **Food Science and Technology**. v.37, p.235–239, 2012.

ZHANG, S.; LIU, L.; SU, Y.; LI, H.; SUN, Q.; LIANG, X.; LV, J. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. **African Journal of Microbiology Research**. v.5, n.29, p.5194-5201, 2011.

ZHANG, W. Q.; GE, W.P.; YANG, J.; XUE, X.C.; WU, S.Z.; CHEN Y. Comparative of in vitro antioxidant and cholesterol-lowering activities of fermented goat & cow milk. Resources, Environment and Engineering - Proceedings of the 2014. **Technical Congress on Resources, Environment and Engineering (CREE)**. p.417-424, 2015.

ZOCCAL, R. Produção e consumo de lácteos em queda. **Revista Balde branco**. São Paulo, 15 de junho de 2016. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/producao-e-consumo-de-lacteos-em-queda/>. Acesso em: 5 ago. 2016.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. **Journal of Dairy Research**, v.75, p.189-195, 2008.

YADAV, H.; LEE, J.H.; LLOYD, J.; WALTER, P.; RANE, S.G. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. **Journal of Biological Chemistry**. v.288, n.35, p.25088-25097, 2013.

YU, M.A.; KIM, J.M.; LEE, C.H.; SON, Y.J.; KIM, S.K. Quality characteristics of stirred yoghurt added with fermented red pepper. **Korean Journal of Food Science of Animal Resources**. v.34, n.4, p.408-414, 2014.

WANG, Y.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**. v.23, p.128–135, 2006.

WHANG, C.H. Antioxidative capacity produced by Bifidobacterium- and Lactobacillus acidophilus-mediated fermentations of konjac glucomannan and glucomannan oligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.88, p.1294–1300, 2008.

WOOTTON-BEARD, P.C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**. v.44, p.217–224, 2011.

ANEXO 1

CHECK LIST PRISMA

SECTION/TOPIC	ITEM N°	CHECKLIST ITEM	REPORTED ON PAGE N°
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both	iii
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number	iii, iv
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known	15-16
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS)	17
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number	Não aplicável
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale	38, 39, 40
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched	38
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated	92-93
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis)	39
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators	39-40
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made	39
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis	Não aplicável
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means)	40
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I ²) for each meta-analysis	40

SECTION/TOPIC	ITEM N°	CHECKLIST ITEM	REPORTED ON PAGE N°
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies)	Não aplicável
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified	Não aplicável
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram	42, 70, 94-96
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations	44
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12)	Não aplicável
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot	Não aplicável
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency	Não aplicável
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15)	Não aplicável
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16])	Não aplicável
DISCUSSION			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers)	44-46, 49, 51, 57-69
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias)	69-70, 56-57
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research	73-74
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review	Não aplicável

Fonte: LIBERATI A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. BMJ, v. 339, jul., 2009.

ANEXO 2

ESTRATÉGIAS DE BUSCA

Medline:

- 1) (antioxidant activity) OR oxidative stress) AND Lactobacillus acidophilus) AND lactic beverage) OR fermented milk) OR yogurt) AND in vivo)"
- 2) "(antioxidant activity) OR oxidative stress) AND Lactobacillus acidophilus) AND lactic beverage) OR fermented milk) OR yogurt) AND in vitro techniques)"

Cochrane Central Register of Controlled Trials:

- 1) #1: antioxidant activity
- 2) #2: Lactobacillus acidophilus
- 3) #3: #1 AND #2

Scopus:

- 1) ("antioxidant activity") OR ("oxidative stress") AND ("Lactobacillus acidophilus") AND ("lactic beverage") OR ("fermented milk") OR ("yogurt") AND ("in vivo")
- 2) ("antioxidant activity") OR ("oxidative stress") AND ("Lactobacillus acidophilus") AND ("lactic beverage") OR ("fermented milk") OR ("yogurt") AND ("in vitro techniques")

Science Direct:

- 1) (("antioxidant activity") OR ("oxidative stress") AND ("Lactobacillus acidophilus") AND ("lactic beverage") OR ("fermented milk") OR ("yogurt") AND ("in vivo"))
- 2) (("antioxidant activity") OR ("oxidative stress") AND ("lactobacillus acidophilus") AND ("lactic beverage") OR ("fermented milk") OR ("yogurt") AND ("in vitro"))

Scifinder:

- 1) antioxidant activity of Lactobacillus acidophilus OR acidophilus on lactic beverage OR fermented milk OR yogurt

Web of Science:

- 1) TS=("antioxidant activity" or "oxidative stress") AND TS=("Lactobacillus acidophilus") AND TS=("lactic beverage" or "fermented milk" or "yogurt") AND TS=("in vitro techniques")
- 2) TS=("antioxidant activity" or "oxidative stress") AND TS=("Lactobacillus acidophilus") AND TS=("lactic beverage" or "fermented milk" or "yogurt") AND TS=("in vivo")

Scielo:

- 1) ("antioxidant activity" AND "Lactobacillus acidophilus"), "((antioxidant activity) OR (oxidative stress)) AND ((Lactobacillus acidophilus) AND ((lactic beverage) OR (fermented milk) OR (yogurt) AND (in vitro techniques))"
- 2) "((antioxidant activity) OR (oxidative stress)) AND ((Lactobacillus acidophilus) AND ((lactic beverage) OR (fermented milk) OR (yogurt) AND (in vivo) OR (in vitro techniques))"

Agrícola:

- 1) ("antioxidant activity") AND ("Lactobacillus acidophilus")

ANEXO 3

Artigos excluídos após a leitura na íntegra, devido ao não cumprimento dos critérios de inclusão, considerando estudos com desenho experimental “in vitro”

Autor(es)	Ano	Título	Motivo da exclusão
Zommara M. et al.	1996	Whey from cultured skim milk decreases serum cholesterol and increases antioxidant enzymes in liver and red blood cells in rats	Desenho do estudo
Oberreuther-Moschner D.L. et al.	2004	Dietary intervention with the probiotics <i>Lactobacillus acidophilus</i> 145 <i>Bifidobacterium longum</i> 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells	Desenho do estudo
Kim; Chae; Jeong	2005	Antioxidant activity of some yogurt starter cultures	Intervenção
Wang; Yu; Chou	2005	Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria	Intervenção
Nam H.S. et al.	2006	Effects of the fermented milk intake on human antioxidant activity and blood alcohol concentration	Desenho do estudo
Taha S.H. et al.	2007	Antioxidant activity of flavoured stirred yoghurt like products	Intervenção
Cossu M. et al.	2009	Effects of enrichment with polyphenolic extracts from sardinian plants on physico-chemical, antioxidant and microbiological properties of yogurt	Intervenção
Jain; Yadav; Ravindra	2009	Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures	Intervenção
Sinha; Singh; Kumar	2009	Alteration in oxidative stress and c-Myc protein by administration of <i>Acidophilus-casei</i> dahi on DMH induced colon carcinogenesis	Desenho do estudo
Uskova & Kravchenko	2009	Antioxidant properties of lactic acid bacteria--probiotic and yogurt strains	Intervenção
Agil & Hosseinian	2012	Dual Functionality of Triticale as a Novel Dietary Source of Prebiotics with Antioxidant Activity in Fermented Dairy Products	Intervenção
Ejtahed H.S. et al.	2012	Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients	Desenho do estudo
LIM, S.M.	2012	Synbiotic potential of yoghurt manufactured with probiotic lactic acid bacteria isolated from mustard leaf kimchi and prebiotic fructooligosaccharide	Intervenção
Frumento D. et al.	2013	Development of milk fermented with <i>Lactobacillus acidophilus</i> fortified with <i>Vitis vinifera</i> Marc flour	Intervenção
LIM, S.M.	2013	Microbiological, physicochemical, and antioxidant properties of plain yogurt and soy yogurt	Intervenção
Nabas Z. et al.	2014	Chemical composition of royal jelly and effects of synbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities	Intervenção

Illupapalayam; Smith; Gamlath	2014	Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yogurt with spices	Intervenção
Najgebauer-Lejko, D.	2014	Effect of green tea supplementation on the microbiological, antioxidant, and sensory properties of probiotic milks	Intervenção
Alu'datt M.H. et al.	2015	Probiotics in Milk as Functional Food: Characterization and Nutraceutical Properties of Extracted Phenolics and Peptides from Fermented Skimmed Milk Inoculated with Royal Jelly	Intervenção
Chen H. et al.	2015	Effect of probiotic <i>Lactobacillus</i> strains on antioxidant activity from fermented goat milk.	Intervenção
Desrouillères et al.	2015	Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R and <i>L. rhamnosus</i> CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine	Desenho do estudo
Ehsani J. et al.	2015	Effects of artichoke (<i>Cynara scolymus</i> L.) extract addition on microbiological and physico-chemical properties of probiotic yogurt	Intervenção
Guo; Zhang; Yuan	2015	Comparison of lactobacilli isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties	Intervenção
Ipar; Aydogdu; Yildirim	2015	Effects of synbiotic on anthropometry, lipid profile and oxidative stress in obese children	Intervenção
Perna A. et al.	2015	Donkey Milk for Manufacture of Novel Functional Fermented Beverages.	Intervenção
Sah B.N.P. et al.	2015	Effect of pineapple waste powder on probiotic growth, antioxidant and antimutagenic activities of yogurt	Intervenção
Sah B.N.P. et al.	2015	Effect of refrigerated storage on probiotic viability and the production and stability of antimutagenic and antioxidant peptides in yogurt supplemented with pineapple peel	Intervenção
Shinde T. et al.	2015	Preparation and use of apple skin polyphenol extracts in milk: enhancement of the viability and adhesion of probiotic <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 1643) bacteria	Intervenção

ANEXO 4

Artigos excluídos após a leitura na íntegra devido ao não cumprimento dos critérios de inclusão, considerando estudos com desenho experimental “in vivo”

Autor(es)	Ano	Título	Motivo da exclusão
Zommara M. et al.	1996	Whey from cultured skim milk decreases serum cholesterol and increases antioxidant enzymes in liver and red blood cells in rats	Desenho do estudo
Oberreuther- Moschner D.L. et al.	2004	Dietary intervention with the probiotics <i>Lactobacillus acidophilus</i> 145 <i>Bifidobacterium longum</i> 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells	Desenho do estudo
Sinha; Singh; Kumar	2009	Alteration in oxidative stress and c-Myc protein by administration of <i>Acidophilus-casei</i> dahi on DMH induced colon carcinogenesis	Desenho do estudo
Ejtahed H.S. et al.	2012	Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients	Intervenção
Desrouillères et al.	2015	Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R and <i>L. rhamnosus</i> CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine	Desenho do estudo

ANEXO 5

Total de amostras contidas nos oito artigos incluídos na revisão sistemática de artigos com desenho experimental “in vitro”: Classificação quanto ao atendimento dos critérios de inclusão, e os motivos pelos quais as amostras foram desconsideradas da pesquisa

Artigo de origem	Amostra	Constituição microbiológica	Amostra incluída	Motivo da exclusão
Virtanen et al., 2007 (1)	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> A	Não	Constituição microbiológica
	2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> B		
	3	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> A		
	4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> B		
	5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> A		
	6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> B		
	7	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diasetylactis</i> C		
	8	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diasetylactis</i> D		
	9	<i>Lactococcus raffinolactis</i> ATCC 43920		
	10	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19 435		
	11	<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009		
	12	<i>Lactobacillus jensenii</i> ATCC 25258		
	13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469		
	14	<i>Lactobacillus curvatus</i> ATCC 25601		
	15	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 23272		
	16	<i>Lactobacillus helveticus</i> E		
	17	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730		
	18	<i>Lactobacillus acidophilus</i> F	Sim	-
	19	<i>Bifidobacterium infantis</i> G	Não	Constituição microbiológica

	20	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Sim	-
	21	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Não	Constituição microbiológica
	22	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869		
	23	Kefir, 1		
	24	Kefir, 2		
	25	<i>Lactobacillus casei</i> H		
	26	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Sim	-
	27	<i>Leuconostoc cremoris</i> B and <i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 19435	Não	Constituição microbiológica
	28	<i>Leuconostoc cremoris</i> B, <i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 19435 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Sim	-
Ivanov G., 2007a (2)	29	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i>	Não	Constituição microbiológica
	30	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sim	-
	31	<i>Lactobacillus casei</i>	Não	Constituição microbiológica
	32	<i>Lactobacillus helveticus</i>		
	33	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>		
	34	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
	35	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>		
	36	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> .		
Ivanov G., 2007b (3)	37	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Não	Constituição microbiológica
	38	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sim	-
	39	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
Apostolidis et al., 2007 (4)	40	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Não	Constituição microbiológica
	41	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sim	-
	42	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Não	Constituição microbiológica
	43	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		Tipo de leite

Parrela et al., 2012 (5)	44	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sim	-
	45	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Não	Constituição microbiológica
	46	<i>Lactobacillus casei</i>		
	47	<i>Lactobacillus fermentum</i>		
	48	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		
	49	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Saccharomyces boulardii</i>		
	50	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Saccharomyces boulardii</i>		
	51	<i>Lactobacillus casei</i> + <i>Saccharomyces boulardii</i>		
	52	<i>Lactobacillus fermentum</i> + <i>Saccharomyces boulardii</i>		
	53	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> + <i>Saccharomyces boulardii</i>		
Sah et al., 2014 (6)	54	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>		
	55	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sim	-
	56	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus casei</i>	Não	Constituição microbiológica
	57	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus paracasei</i>		
	58	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus casei</i>	Sim	-
	59	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus paracasei</i>		
	60	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus casei</i> + <i>Lactobacillus paracasei</i>	Não	Constituição microbiológica
	61	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus paracasei</i> + <i>Lactobacillus casei</i>	Sim	-

Li et al., 2015 (7)	62	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i>	Não	Constituição microbiológica
	63	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Debaryomyces hansenii</i>		
	64	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		
	65	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Debaryomyces hansenii</i>	Sim	-
	66	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
	67	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Debaryomyces hansenii</i>		
	68	<i>Lactobacillus helveticus</i>		
	69	<i>Lactobacillus helveticus</i> + <i>Debaryomyces hansenii</i>		
	70	<i>Lactococcus lactis</i>	Não	Constituição microbiológica
	71	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Debaryomyces hansenii</i>		
Zhang et al., 2015 (8)	72	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Não	Constituição microbiológica
	73	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Bifidobacterium</i>		
	74	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sim	-
	75	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Bifidobacterium</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
	76	<i>Bifidobacterium</i>	Não	Constituição microbiológica
	77	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sim	-
	78	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Não	Tipo de leite e constituição microbiológica
	79	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Bifidobacterium</i>		

	80	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Tipo de leite
	81	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Bifidobacterium</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Tipo de leite
	82	<i>Bifidobacterium</i>	Tipo de leite e constituição microbiológica
	83	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Tipo de leite