

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof^a Dr^a Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof.^a Dr.^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Dr.^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof.^a Dr.^a Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof.^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A532	Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 2 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 2) Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-358-3 DOI 10.22533/at.ed.583192705 1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série. CDD 610.72
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprimindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
AS LIBÉLULAS (ODONATA: INSECTA) DE CONCEIÇÃO DA BARRA, ESPÍRITO SANTO, DEPOSITADAS NA COLEÇÃO ZOOLOGICA NORTE CAPIXABA / CZNC	
Karina Schmidt Furieri Carolini Cavassani Arianny Pimentel Storari	
DOI 10.22533/at.ed.5831927051	
CAPÍTULO 2	10
FORMIGAS (Hymenoptera: Formicidae) ASSOCIADAS ÀS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE DE UMA HIDRELÉTRICA DO SUL DO BRASIL	
Junir Antonio Lutinski Cladis Juliana Lutinski	
DOI 10.22533/at.ed.5831927052	
CAPÍTULO 3	23
IDENTIFICAÇÃO DA HERPETOFAUNA DO INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS CERES	
Alexandre Pereira de Oliveira Filho Marcos Vitor dos Santos Almada Jorge Freitas Cieslak	
DOI 10.22533/at.ed.5831927053	
CAPÍTULO 4	32
CRIAÇÃO DE PACAS (<i>Cuniculus paca</i>) COMO ALTERNATIVA DE DIVERSIFICAÇÃO DE PRODUÇÃO E RENDA EM RIO BRANCO - ACRE	
Francisco Cildomar da Silva Correia Reginaldo da Silva Francisco Valderi Tananta de Souza Vania Maria Franca Ribeiro Fábio Augusto Gomes	
DOI 10.22533/at.ed.5831927054	
CAPÍTULO 5	46
FISCALIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO: AVIFAUNA RESGATADA PELO MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DA BAHIA	
Diego Silva Macedo Alanna Barreto dos Santos Lucas Gabriel Souza Santos	
DOI 10.22533/at.ed.5831927055	
CAPÍTULO 6	56
LEVANTAMENTO DA AVIFAUNA EM AMBIENTE URBANO E RURAL NO MUNICÍPIO DE NOVO HAMBURGO, RS, BRASIL	
Brenda Silveira de Souza Marcelo Pereira de Barros	
DOI 10.22533/at.ed.5831927056	

CAPÍTULO 7 68

ASPECTOS PSICOLÓGICOS NO ESPORTE: REFLEXÕES, QUESTIONAMENTOS E INFLUÊNCIAS DO ESTRESSE E ANSIEDADE NOS ATLETAS DE HANDEBOL

Rômulo Dantas Alves
Taís Pelição
Marcos Gabriel Schuindt Acácio
Luan Henrique Roncada
Debora Gambary Freire Batagini
Rubens Venditti Júnior

DOI 10.22533/at.ed.5831927057

CAPÍTULO 8 81

EFEITO DO TAMANHO DA QUADRA SOBRE AÇÕES TÉCNICAS E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM JOVENS JOGADORES DE FUTSAL

Matheus Luiz Penafiel
Alexsandro Santos da Silva
Dagnou Pessoa de Moura
Osvaldo Tadeu da Silva Junior
Bruno Jacob de Carvalho
Yacco Volpato Munhoz
Julio Wilson Dos-Santos

DOI 10.22533/at.ed.5831927058

CAPÍTULO 9 90

EFEITOS DO ALONGAMENTO AGUDO SOBRE A FORÇA DE MEMBROS SUPERIORES NO ARREMESSO DO ATLETISMO

Fernando Barbosa Carvalho
Márcio Pereira da Silva

DOI 10.22533/at.ed.5831927059

CAPÍTULO 10 100

INFLUÊNCIA DA CARGA TABAGÍSTICA SOBRE O TRANSPORTE MUCOCILIAR NASAL DE TABAGISTAS ATIVOS

Alessandra Mayumi Marques Masuda
Iara Buriola Trevisan
Tamara Gouveia
Caroline Pereira Santos
Guilherme Yassuyuki Tacao
Tamires Veras Soares
Ercy Mara Cipulo Ramos
Dionei Ramos

DOI 10.22533/at.ed.58319270510

CAPÍTULO 11 110

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES CRÍTICOS

Lais Maria Bellaver de Almeida
Isabella Gonçalves Pierri
Karina Zanchetta Cardoso Eid
Welder Zamoner
Daniela Ponce
André Balbi

DOI 10.22533/at.ed.58319270511

CAPÍTULO 12 121

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES NÃO CRÍTICOS

Isabella Gonçalves Pierri
Lais Maria Bellaver de Almeida
Karina Zanchetta Cardoso Eid
Welder Zamoner
André Balbi
Daniela Ponce

DOI 10.22533/at.ed.58319270512

CAPÍTULO 13 133

POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO CORTICAL EM BEBÊS A TERMO E PRÉ-TERMO

Dayse Mayara Oliveira Ferreira
Letícia Sampaio de Oliveira
Rafaela Cristina da Silva Bicas
Yara Bagali Alcântara
Brena Elisa Lucas
Ana Cláudia Figueiredo Frizzo

DOI 10.22533/at.ed.58319270513

CAPÍTULO 14 146

PROCEDÊNCIA DOS ENCAMINHAMENTOS À MATERNIDADE DO HC- FMB-UNESP DOS CASOS GRAVES E DE MORTE MATERNA ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL

Eduardo Minoru Nomura
Victoria de Carvalho Zaniolo
Ariel Althero Zambon
Ana Débora Souza Aguiar
Eduarda Baccari Ferrari
José Carlos Peraçoli

DOI 10.22533/at.ed.58319270514

CAPÍTULO 15 160

SERIA A ANESTESIA UMA INTERFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE ELETROACUPUNTURA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Strongyloides venezuelensis*?

Maria Teresa da Silva Bispo
Luana dos Anjos Ramos

DOI 10.22533/at.ed.58319270515

CAPÍTULO 16 175

ESTUDANTES DE ODONTOLOGIA CANHOTOS E OS DESAFIOS ENFRENTADOS EM ATIVIDADES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Julio Martinez Alves Oliveira
Suzely Adas Saliba Moimaz
Artênio José Isper Garbin
Tânia Adas Saliba

DOI 10.22533/at.ed.58319270516

CAPÍTULO 17 181

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DE *MYRTACEAE* CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Juliana Barbosa Succar
Gabriele Marques Pinto
Tauana de Freitas Pereira
Ida Carolina Neves Direito
Maria Cristina de Assis
Cristiane Pimentel Victório

DOI 10.22533/at.ed.58319270517

CAPÍTULO 18 193

ATIVIDADE DE CELULASES, BETA-GLICOSIDASES E XILANASES DE *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma asperellum* EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Mariane Cristina Mendes
Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni
Fabiana Guillen Moreira Gasparin
Maria Inês Rezende

DOI 10.22533/at.ed.58319270518

CAPÍTULO 19 206

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E TEMPO DE REAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE

Poline Wilke
Karen Jaqueline Haselroth
Raquel Ströher

DOI 10.22533/at.ed.58319270519

CAPÍTULO 20 223

AVALIAÇÃO DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Victoria Pommer
Letícia Mara Rasbold
Jorge William Fischdick Bittencourt
Alexandre Maller
Marina Kimiko Kadowaki

DOI 10.22533/at.ed.58319270520

CAPÍTULO 21 231

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus rhamnosus* V5 CONTRA *SALMONELLA ENTERICA* sorovariedade *Typhimurium*.

Carina Terumi Tsuruda
Patrícia Canteri De Souza
Erick Kenji Nishio
Ricardo Sérgio Couto de Almeida
Luciano Aparecido Panagio
Ana Angelita Sampaio Baptista
Sandra Garcia
Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Gerson Nakazato

DOI 10.22533/at.ed.58319270521

CAPÍTULO 22	241
BIOFILME BACTERIANO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS : TEM COMO EVITAR?	
<p>Natara Favaro Tosoni Naiele Mucke Márcia Regina Terra Márcia Cristina Furlaneto Luciana Furlaneto Maia</p>	
DOI 10.22533/at.ed.58319270522	
CAPÍTULO 23	258
BIOFILTRO DE RESÍDUO ORGÂNICO APLICADO NA DESSALINIZAÇÃO DE ÁGUA SALOBRA	
<p>Francielle Fernandes Gonçalves de Barros Rebecca Carvalho Mendes e Silva Charles Albert Moises Ferreira Juliana Parolin Ceccon</p>	
DOI 10.22533/at.ed.58319270523	
CAPÍTULO 24	270
BIOLOGIA E APLICAÇÕES PRÉ-CLÍNICAS DO MODELO EXPERIMENTAL SARCOMA 180	
<p>Paulo Michel Pinheiro Ferreira Renata Rosado Drumond Carla Lorena Silva Ramos Rayran Walter Ramos de Sousa Débora Caroline do Nascimento Rodrigues Ana Paula Peron</p>	
DOI 10.22533/at.ed.58319270524	
CAPÍTULO 25	288
BIORREPOSITÓRIO DE SALIVA EM ESTUDOS GENÉTICO-MOLECULARES: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA APÓS LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO	
<p>Natália Ramos Thais Francini Garbieri Thiago José Dionísio Carlos Ferreira dos Santos Lucimara Teixeira das Neves</p>	
DOI 10.22533/at.ed.58319270525	
CAPÍTULO 26	302
CONTROLE DA ESTERILIZAÇÃO DE AUTOCLAVES DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIOESTE E DE UM ABRIGO PARA IDOSOS, CASCAVEL, PR	
<p>Helena Teru Takahashi Mizuta Fabiana André Falconi Sara Cristina Sagae Schneider Rodrigo Hinojosa Valdez Leanna Camila Macarini</p>	
DOI 10.22533/at.ed.58319270526	

CAPÍTULO 27	309
ELEIÇÃO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS PARA INCORPORAÇÃO DE CAFEÍNA PARA TRATAMENTO DE LIPODISTROFIA GINÓIDE	
Julia Vila Verde Brunelli Maria Virgínia Scarpa Flavia Lima Ribeiro Maccari Tayara Luísa Paranhos de Oliveira Ribeiro de Almeida	
DOI 10.22533/at.ed.58319270527	
CAPÍTULO 28	316
ESTATÍSTICA PARAMÉTRICA E NÃO PARAMÉTRICA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ	
Deusélio Bassini Fioresi Wilton Soares Cardoso Weliton Barbosa de Aquino Luzia Elias Ferreira Vinícius Serafim Coelho	
DOI 10.22533/at.ed.58319270528	
CAPÍTULO 29	326
ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGARCANE BAGASSE PRE-TREATED BY ALKALINE SOLUTION IN FLUIDIZED BED REACTOR	
Felipe A. F. Antunes Guilherme F. D. Peres Thaís. S. S. Milessi Letícia E. S. Ayabe Júlio C. dos Santos Silvio S. da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.58319270529	
CAPÍTULO 30	331
ESTUDO DESCRITIVO SOBRE O USO DE FOLHAS DA BATATA-DOCE E POTENCIAL PARA REDUÇÃO DE EFEITOS OXIDATIVOS	
Thaís Cristina Coelho de Ornelas Salazar Roberta Cattaneo Horn Rodrigo Fernando dos Santos Salazar Diego Pascoal Golle Jana Koefender Andreia Quatrin Carolina Peraça Pereira Regis	
DOI 10.22533/at.ed.58319270530	
CAPÍTULO 31	339
FITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA CO-EXPOSIÇÃO A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E ARSÊNIO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE CRESPA (<i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i>)	
Flávio Manoel Rodrigues Da Silva Júnior Eduarda De Moura Garcia Rodrigo De Lima Brum Silvana Manske Nunes Mariana Vieira Coronas Juliane Ventura Lima	
DOI 10.22533/at.ed.58319270531	

CAPÍTULO 32	345
FOTOBIOREATOR DE MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE EMISSÕES GASOSAS UTILIZANDO MATERIAIS ALTERNATIVOS	
Ana Beatriz Medeiros Dantas	
Luana Valezi	
Vitória Luciana de Souza	
Roberto Shiniti Fujii	
DOI 10.22533/at.ed.58319270532	
CAPÍTULO 33	355
HIDRÓLISE ENANTIOSSELETIVA DE α - E β -BUTIRILOXIFOSFONATOS MEDIADAS POR LIPASE DE CANDIDA RUGOSA	
Lucidio Cristovão Fardelone	
José Augusto Rosário Rodrigues	
Paulo José Samenho Moran	
DOI 10.22533/at.ed.58319270533	
CAPÍTULO 34	365
IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NOS EXTRATOS DAS CASCAS E AMÊNDOAS DO TUCUMÃ POR MEIO DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO POR BIOFILMES COM <i>C. ALBICANS</i>	
Luis Fhernando Mendonça da Silva	
Ana Cláudia Rodrigues de Melo	
DOI 10.22533/at.ed.58319270534	
CAPÍTULO 35	376
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE TANASE POR FUNGO ISOLADO DE CACAU NO SUL DA BAHIA	
Priscilla Macedo Lima Andrade	
Julyana Stoffel Britto	
Camila Oliveira Bezerra	
Ana Paula Trovatti Uetanabaro	
Andrea Miura da Costa	
DOI 10.22533/at.ed.58319270535	
SOBRE O ORGANIZADOR	381

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus rhamnosus* V5 CONTRA *Salmonella* ENTERICA SOROVARIEDADE TYPHIMURIUM.

Carina Terumi Tsuruda

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Patrícia Canteri De Souza

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Erick Kenji Nishio

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Ricardo Sérgio Couto de Almeida

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Luciano Aparecido Panagio

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Ana Angelita Sampaio Baptista

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Sandra Garcia

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Gerson Nakazato

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO: Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro, impedindo a colonização e invasão de patógenos no intestino. *Lactobacillus* é um dos principais agentes probióticos utilizados na prevenção de infecções e na restauração da microbiota intestinal. *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium é um importante agente causador de infecção intestinal de origem alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora do *Lactobacillus* produtor de exopolissacarídeos (EPS) contra *S. Typhimurium*. Para isso foi realizada a identificação do lactobacilo, pesquisa de bacteriocinas. Os resultados mostraram que os lactobacilos foram capazes de produzir compostos antimicrobianos contra *S. Typhimurium*. Nossos resultados sugerem que *L. rhamnosus* poderia ser um potencial probiótico para controlar a salmonelose.

PALAVRAS-CHAVE: proteção, bateria ácido lácticas, bacteriocinas.

EVALUATION OF THE PROBIOTIC EFFECT OF *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* V5 AGAINST *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM.

ABSTRACT: Probiotics are live microorganisms that when administered in suitable amounts confer benefits to the host's health, preventing colonization and invasion of pathogens in the intestine. *Lactobacillus* is one of the main probiotic agents used in the prevention of infections and in the restoration of the intestinal microbiota. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an important agent causing food-borne intestinal infection. The objective of this work was to evaluate the protective capacity of *Lactobacillus* exopolysaccharide (EPS) against *S. Typhimurium*. For this purpose, the identification of lactobacillus and bacteriocins was performed. The results showed that lactobacilli were able to produce antimicrobial compounds against *S. Typhimurium*. Our results suggest that *L. rhamnosus* could be a potential probiotic to control salmonellosis.

KEYWORDS: protection, lactic acid bacteria, bacteriocinas.

1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo das bactérias do ácido láctico (LAB), que é composto por bactérias Gram-positivas que produzem ácido láctico como um dos principais produtos da fermentação do catabolismo de carboidratos (HAYEK & IBRAHIM, 2013). Muitas cepas de LAB são capazes de produzir polímeros de monossacarídeos na maioria das vezes viscosos, denominados exopolissacarídeos (EPS), sendo de grande importância na indústria de laticínios, como na produção de iogurtes, aumentando a consistência e a viscosidade do produto (HASSAN, 2008). O *L. rhamnosus* produz EPS, acredita-se que este composto possa auxiliar a bactéria produtora na ligação ao muco intestinal, assim como proteger as células epiteliais e estimular o sistema imune (KLOPPER et al., 2018).

Os mecanismos exatos de ação dos probióticos ainda não foram inteiramente estabelecidos, mas estudos indicam que os probióticos são capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, como os ácidos orgânicos e bacteriocinas, inibindo o crescimento de patógenos (FERREIRA & SILVA, 2012; LEBEER et al., 2008). A modulação da microbiota intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre através de um mecanismo denominado “exclusão competitiva”. Esse mecanismo impede a colonização dessa mucosa por microrganismos potencialmente patogênicos, pela competição por sítios de adesão. (LEBEER et al. 2008; SAAD, 2006).

Segundo SAAD (2006), grande parte das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos sugere que os probióticos podem estimular a resposta imune sistêmica aumentando o número e a atividade de células fagocíticas do hospedeiro. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK - “natural killer”) e/ou dos níveis de imunoglobulinas

(MAHAJAN & SINGH, 2014; OELSCHLAEGGER, 2010).

Salmonella enterica, é um dos patógenos de origem alimentar de grande importância, pois causam doenças em humanos e outros animais, através do consumo de água e alimentos contaminados, podendo variar desde uma gastroenterite a uma infecção sistêmica grave, como a febre tifóide (ALVARÉZ-ORDÓÑEZ et al., 2011; RUBY et al., 2012).

A dose infectante média (DI_{50}) está entre 10^5 a 10^{10} bactérias ingeridas, os sintomas são basicamente diarreia, vômito e dores abdominais que podem aparecer dentro de 6-72 horas após a ingestão do alimento contaminado (FÀBREGA & VILA, 2013). Entretanto a quantidade exata requerida para causar a doença varia de acordo com o estado imunológico do paciente, do patógeno encontrar local adequado, para que possa se estabelecer, replicar e expressar seus fatores de virulência, assim como a sorovariedade envolvida (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

O primeiro obstáculo a ser superado dentro do hospedeiro é resistir ao pH ácido do estômago e aos sais biliares intestinais, propriedades essenciais, para que ocorra a infecção. Para se proteger, o patógeno possui um mecanismo ácido-tolerância, que regula a homeostase do pH, que induz manter o pH intracelular em valores superiores aos do ambiente extracelular (FOSTER & HALL, 1991).

S. enterica após resistir ao pH ácido e aos sais biliares, é no intestino delgado seu local de infecção, onde vai se aderir ao epitélio intestinal por meio de adesinas e invadir os enterócitos, células dendríticas e principalmente as células M, que tem como função, capturar antígenos intestinais por endocitose e transportar para células linfóides presentes nas placas de Peyer. A invasão das células M também permite que as bactérias infectem células epiteliais adjacentes através de sua superfície basolateral (JONES et al., 1994).

Durante a invasão, *S. enterica* altera o citoesqueleto sendo engolfada pela célula do hospedeiro em vesículas chamadas Salmonella-containing vacuoles (SCV), simultaneamente, ocorre uma intensa resposta inflamatória no epitélio intestinal iniciando o recrutamento e transmigração de fagócitos do espaço submucoso para dentro do lúmen intestinal (FÀBREGA & VILA, 2013).

S. enterica atravessa o epitélio intestinal e os macrófagos da submucosa detectam a bactéria e a internalizam para eliminá-la do hospedeiro, no entanto nem todas as bactérias são eliminadas, as que sobrevivem são capazes de se replicar no interior dos SCV dos fagócitos, mecanismo essencial para a sua sobrevivência (FÀBREGA & VILA, 2013). Após esse processo a bactéria induz a célula sofrer apoptose sendo liberada para invadir novas células. Por fim, estes fagócitos infectados podem disseminar-se através do sistema linfático e da corrente sanguínea.

Todo esse mecanismo de invasão da Salmonella, provoca uma intensa resposta inflamatória, que leva a liberação de prostaglandinas que estimulam a adenilato ciclase nas células intestinais a inibir a absorção de sódio e aumentar a secreção de cloro ocasionando diarreia aquosa (FÀBREGA & VILA, 2013).

Sendo assim, devido à importância dos probióticos em prevenir infecções intestinais causadas por patógenos como *S. enterica*, mostra a relevância deste trabalho.

2 | OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora do *Lactobacillus rhamnosus* V5, produtor de exopolissacarídeos (EPS) contra a *S. Typhimurium*.

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração de DNA e amplificação por PCR

Os DNAs genômicos totais de *Lactobacillus rhamnosus* V5 foram extraídos usando o Blood kit B Puregene® (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As subunidades ribossômicas bacterianas foram utilizadas 16S primers neste estudo (conjuntos de primers: 16S Fw: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 16S Rev: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' »). A temperatura de fusão da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi de 59°C. Um PCR mistura de reação incluía 2 mL de DNA modelo extraído (50ng), 2 mL de dNTPs (0,2 mM; Invitrogen, EUA), 0,2 µL de Taq High Fidelity (5 U / µL; Invitrogen, EUA), 5 µL de tampão (10 x; Invitrogen, EUA), 3 µL de MgSO₄ (50 mM; Invitrogen, EUA) e 37 µL de água desionizada, totalizando um volume de 50 µL. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose em 1% em TAE (acetato Tris 20 mM, pH 8,0; EDTA 0,5 mM) a 80 V e 400 mA durante 30 min. Depois de que, o DNA foi extraído do gel e purificado usando extração rápida de gel Kit PureLink™ (Invitrogen, EUA). Os ciclos de PCR consistiram em 94°C de desnaturação inicial por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min e 68°C por 2 min, seguidos por 10 min de extensão a 68°C.

3.2 Cepas

A cepa *Lactobacillus rhamnosus* V5 foi obtida a partir de uma mistura de várias bactérias “Viili” do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. A cepa *Lactobacillus* foi cultivada em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA), a uma temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% (v / v) de CO₂ por 18 h.

Um patógeno atenuado *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium x3985 UK1 (Δ cya Δ crp) do Centro de Doenças Infecciosas e Vacinologia, Instituto de Biodesign e Escola de Ciências da Vida, Arizona State University, Tempe, AZ, Estados Unidos da América foi cultivado em caldo Luria-Bertani (LB) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) a uma temperatura de 37°C por 18 horas (CURTISS et al., 1989).

3.3 Atividade antimicrobiana do sobrenadante

3.3.1 Obtenção do sobrenadante

Para a realização dos testes, inicialmente realizou-se a extração do sobrenadante. A cepa de *Lactobacillus*, foi semeada em um tubo contendo 10mL caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) à 37°C por 18 h. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 7000 rpm por 10 min. o sobrenadante obtido foi aspirado e dividido em três microtubos da seguinte forma:

- I. O sobrenadante obtido foi esterilizado por filtração através de uma membrana de microporos de 0,22 μm e 25 mm de diâmetro (Millipore, Billerica, MA, EUA).
- II. O pH do sobrenadante foi ajustado para pH 6,5 - 7,0 com 0,1 NaOH (hidróxido de sódio) e esterilizado por filtração.
- III. O sobrenadante foi submetido a um tratamento térmico a 100°C durante 10 e 20 min, e esterilizado por filtração (ASLIM et al., 2005).

3.3.2 Concentração Inibitória Mínima

Após a obtenção do sobrenadante (I, II, III), o teste de suscetibilidade foi realizado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição, conforme padronizado pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico - CLSI (2011). O teste foi realizado em triplicata em uma placa de 96 poços, com formato em U-bottom.

S. Typhimurium foi inicialmente cultivado em ágar nutriente AN (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) a 37°C por 18 h, padronizado contra o padrão McFarland 0,5 e diluído 1:100 em salina (NaCl a 0,9%) até atingir a concentração de 10^6 UFC / mL. No controle positivo, o caldo Müller-Hinton (MH) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) e as bactérias foram adicionadas, enquanto no controle negativo apenas o caldo MH foi adicionado. Na primeira linha horizontal da placa foram adicionados 60 μL de caldo MH e 40 μL de sobrenadante e no restante da prancha foram adicionados 50 μL de caldo de MH. As microdiluições foram feitas com as concentrações de sobrenadante variando de 20 a 0,62%. Depois disso, em cada poço foi inoculado com 50 μL da suspensão de *S. Typhimurium* preparada anteriormente e finalmente a placa foi incubada a 37°C durante 24 h e o crescimento bacteriano foi avaliado visualmente.

3.3.3 Ensaio de time-kill curve

Após a análise da CIM do sobrenadante (I), foi realizada a curva de crescimento e morte. *S. Typhimurium* foi cultivado em meio Agar Nutriente (NA) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) e incubado a 37°C por 18 h após o crescimento bacteriano. Foi

ajustado para uma concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias / mL e 10 μ L colocados em três microtubos variando a concentração do sobrenadante, 20%, 10%, e o controle, contendo a bactéria e o caldo MH.

Os microtubos foram incubados a 37°C e avaliados nos momentos seguintes; 0h, 2h, 4h, 7h, 10h e 24h. Em cada período realizou-se diluição seriada e plaqueamento em triplicata no meio MH agar. A contagem de CFU foi realizada após 24 h de incubação a 37°C.

3.4 Antagonismo, “spot on the lawn”

A atividade antimicrobiana de lactobacilos contra *S. Typhimurium* foi determinada pelo método de antagonismo “spot on the lawn”, realizado de acordo com a metodologia descrita por Lima e colaboradores (2007). Os lactobacilos foram cultivados em caldo MRS e incubados a uma temperatura de 37°C por 24 h sob condições aeróbicas. Posteriormente, alíquotas desta cultura foram adicionadas em forma de ponto à placa de ágar MRS. Após a secagem estar completa, a placa foi incubada sob condições aeróbicas a uma temperatura de 37°C, durante 8 h.

S. Typhimurium foi previamente semeado em Agar Nutriente (NA) a 37°C por 24 h, e padronizado de acordo com a escala de McFarland 0,5 (correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC / mL). Em seguida, 250 μ L da bactéria foram transferidos para um frasco de Erlenmeyer contendo 25 mL de ágar semi-sólido Muller-Hinton (MH), onde foi homogeneizado para ser vertido na placa de cultura de *Lactobacillus*. Após completa solidificação da camada superior, a placa foi incubada por mais 24 h a 37°C sob condições aeróbicas. A presença de halos de inibição indica a produção de substâncias com atividade antimicrobiana.

3.5 Análise estatística

Para análise dos dados da curva de crescimento e morte, análise de variância (ANOVA) foi realizado, e o teste de Tukey para comparar as médias, considerando um planejamento fatorial, os fatores sendo os tratamentos, e os níveis os tempos. O nível de significância adotado foi de 5%, e as análises foram realizadas utilizando o software R versão 3.4.4 (2018).

4 | RESULTADOS

4.1 Identificação do *Lactobacillus rhamnosus* V5

A caracterização molecular da espécie foi realizada por meio de PCR em que a região amplificada foi o gene RNA ribossomal 16S cuja sequência foi depositada em Banco de dados do GenBank sob o número de acesso MG209517.

4.2 Atividade antimicrobiana do sobrenadante

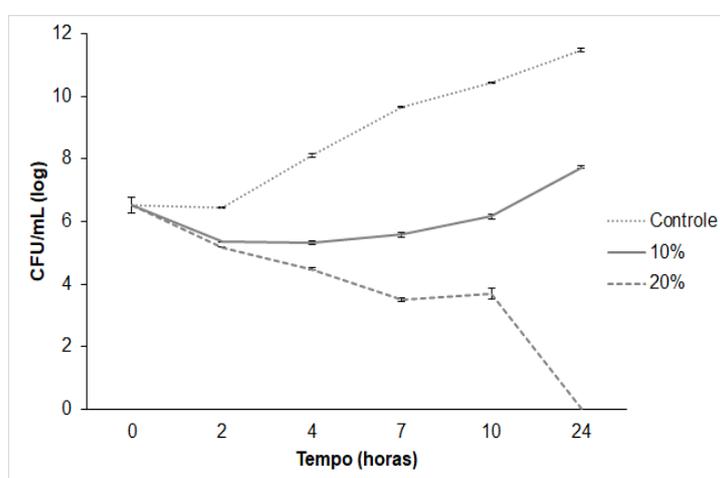
4.2.1 Concentração Inibitória Mínima

No presente estudo, o sobrenadante (I) demonstrou atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima do sobrenadante contra *S. Typhimurium* foi de 10%. O sobrenadante (II) foi sensível à neutralização com solução de NaOH 1N, perdendo totalmente a atividade antimicrobiana. O sobrenadante (III) não foi resistente a tratamentos térmicos.

A concentração inibitória mínima do sobrenadante contra *S. Typhimurium* foi de 10%, demonstrando que a atividade antimicrobiana verificada no experimento pode ser devido à presença de ácidos. Durante o crescimento de bactérias do ácido láctico, ocorre uma queda no pH, tornando o ambiente bastante ácido, principalmente devido à produção de ácidos como o ácido láctico. A bacteriocina produzida por LAB (bactérias ácido lácticas) tem baixo peso molecular e são facilmente desnaturadas por tratamentos térmicos.

4.3 Ensaio de time-kill curve

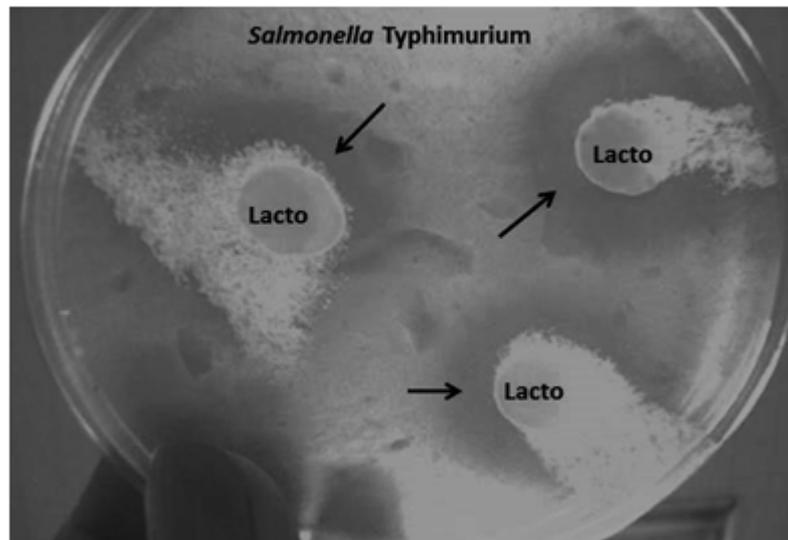
Após determinar a concentração inibitória mínima do sobrenadante contra *S. Typhimurium*, foi realizado o ensaio de time-kill curve. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas considerando ($p < 0,10$). O sobrenadante à 10% foi capaz de inibir o crescimento da bactéria, mas após o período de 10h a bactéria começou a se multiplicar e ao final do tempo de 24h teve um aumento de 1 log em relação do inoculo inicial, mostrando-se bacteriostático. Mas em comparação ao controle, no tempo de 24h teve uma diferença de 4 logs. O sobrenadante à 20% teve ação bactericida, diminuindo gradativamente o número de células viáveis, eliminando 100% da população bacteriana em 24 h (Figura 1).



Curva de crescimento e morte de *Salmonella Typhimurium* na presença de sobrenadante não neutralizado de *L. rhamnosus* (Figura 1).

4.4 Antagonismo, “spot on the lawn”

O método de antagonismo mostrou que os lactobacilos possuem atividade antimicrobiana capaz de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* formando um halo de inibição de 21mm de diâmetro (Figura 2).



Ensaio de antagonismo por “Spot-on-the-lawn” entre *Salmonella Typhimurium* e *L. rhamnosus*. As setas indicam halos de inibição em torno do inóculo de *L. rhamnosus* (Lacto) (Figura 2).

5 | DISCUSSÃO

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos de probióticos. Por exemplo, as bacteriocinas produzidas pelos probióticos podem inibir as bactérias patogênicas, prevenindo a infecção em humanos ou outros animais (Gómez et al., 2016). No entanto, nossos resultados sustentam que a atividade inibidora observada nos ensaios *in vitro* ocorreu devido à produção de ácidos orgânicos, o que reduziu o pH do meio. Este efeito foi semelhante aos estudos de Ogawa e colaboradores (2001) e Pereira e Gómez (2007).

Portanto, concluímos que *L. rhamnosus* V5 pode ser um potencial probiótico para controlar a salmonelose, para isso serão necessários testes em culturas de células, desafio *in vivo* em camundongos com análise microbiológica e histopatológica para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação benéfica de *L. rhamnosus* V5 como probiótico.

REFERENCIAS

ALVARÉZ-ORDÓÑEZ, A.; BEGLEY, M.; PRIETO, M.; MESSENS, W.; LÓPEZ, M.; BERNARDO, A.; HILL, C. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. **Microbiology**, v.157, p. 3268-3281, 2011.

- ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z.N.; SARIKAYA, E.; BEYATLI, Y. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, p. 691-694, 2005.
- CURTISS, R.; KELLY, S.M.; GULIG, P.A.; NAKAYAMA, K. Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.146, p.35-49, 1989.
- FÀBREGA, A.; VILA J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n.2, p.308-341, 2013.
- FERREIRA, C.L.L.F.; SILVA, A.C. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**, 1ed.RJ, Editora Rubio Ltda. 2012.v.9, p.145-160.
- FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 16, p. 5129–5135, 1991.
- GÓMEZ, N.C.; RAMIRO, J.M.P.; QUECAN, B.X. V.; de MELO FRANCO, B.D.G. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Frontiers in Microbiology** v.7, p.1-15, 2016.
- HASSAN, A. N. ADSA Foundation Scholar Award: possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1282-1298, 2008.
- HAYEK, S.A.; IBRAHIM, S.A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A review. **Food and Nutrition Sciences**, v.4, p.73-87, 2013.
- JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **Journal of Experimental Medicine**, v.180, p.15-23, 1994.
- KLOPPER, K.B.; DEANE, S.M.; DICKS, L.M.T. Aciduric Strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus*, Isolated from Human Feces, Have Strong Adhesion and Aggregation Properties. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.10, n.1, p.89-97, 2018.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C. J. de. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.4, p.728-764, 2008.
- LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C. BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.103-107, 2007.
- MAHAJAN, B.; SINGH, V. Recent trends in probiotics and health management: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, p.1643-1652, 2014.
- OCHOA, I.M.F; RODRÍGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, n.1-2, p. 25-42, 2005.
- OELSCHLAEGER, T.A. Mechanism of probiotic action – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, n.1, p. 57-62, 2010.
- OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology** v.68, p.135-140, 2001.

PEREIRA, V.G.; GÓMEZ, R.J.H.C. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. **Semina Ciências Agrárias** v.28, p.229–240, 2007.

RUBY, T.; McLAUGHLIN, L.; GOPINATH, S.; MONACK, D. *Salmonella's* long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.3, p.600-615, 2012.

SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: o Estado da Arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, 2006

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-358-3



9 788572 473583